

## بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک گاز خردل بر روی پارانشیم بیضه موش بزرگ آزمایشگاهی

\* لعلیا قهاری<sup>۱</sup>، دکتر محمد رضا صفری نژاد<sup>۲</sup>، دکتر افسانه مرادی<sup>۳</sup>، دکتر نادر مرکزی مقدم<sup>۴</sup>، دکتر معصومه دادپی<sup>۵</sup>، دکتر منوچهر صفری<sup>۶</sup>

### خلاصه:

**سابقه و هدف:** گاز خردل از جمله گروه مواد تاول زا بوده و از طریق آلکیلته کردن عوامل موجود در بدن انسان باعث فلج شدن فعالیت های فیزیولوژیک و اختلال در اعمال غشاء سلولی و در نتیجه انهدام سلولها میگردد.

در این مطالعه تاثیر دو دوز متفاوت از سولفور موستارد بر روی بیضه موش بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روشها:** در این تحقیق ۴۰ راس رات نر بالغ، سه ماهه، از نژاد Albino-NMRI را در ۴ گروه آزمایشی مورد مطالعه قرار گرفت. گروههای مورد بررسی شامل: نرمال، حلال، سولفور موستارد با دوز ۵ mg/kg، نو سولفور موستارد با دوز ۱۰ mg/kg بوده است. تزریقها در ناحیه ایلپاک راست و بصورت داخل صفاقی صورت گرفت و گروههای مذکور بعد از سپری شدن ۸ هفته کشته و پس از تثبیت در فرمالین ۱۰٪ و رنگ آمیزی H&E مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** افزایش فواصل بین توبولهای سمینفر در گروههای آزمایشی، کاهش تعداد لوله های سمینفر در مرحله اسپرم سازی، تغییر موقعیت هسته سلولهای سرتولی، نامنظم شدن توبولهای سمینفر، پر شدن لومن توبولهای سمینفر از دبریاها و مواد نکروتیک سلولی، وجود سلولهای نکروزه با هسته های پیکنوتیک.

**نتیجه گیری و توصیه ها:** تغییرات ایجاد شده در گروه سولفور موستارد با دوز ۱۰ mg/kg شدت بیشتری داشت و وابسته به دوز بوده است با توجه به اینکه نتایج حاصل از بررسی های مختلف تغییرات متعددی را در نسج بیضه در نتیجه تاثیر این ماده مخرب نشان میدهد همچنین با عنایت به مطالعات محدود و اندکی که در این زمینه صورت گرفته پیشنهاد میگردد کسانی که در سنین باروری به سر می برند و در معرض گاز خردل بوده اند قبل از اثبات ناباروری، مورد ارزیابی قرار بگیرند.

**کلمات کلیدی:** بیضه، تغییرات هیستوپاتولوژیک، گاز خردل

### مقدمه:

گاز خردل در گروه مواد آلکیلته کننده قرار دارد. این مواد ترکیباتی هستند که از طریق آلکیلته کردن عوامل موجود در بدن انسان همچون عوامل نوکلئوفیل (مثل آنزیمها پروتئین های غشاء سیتوپلاسم و هسته) که در تمام قسمتهای سلول قرار دارند، باعث فلج شدن فعالیت های فیزیولوژیک از قبیل نقصان گلیکولیز - تنفس - سنتز پروتئین - سنتز اسیدهای نوکلئوفیلیک و اختلال در اعمال غشاء سلولی و در نتیجه انهدام سلولها میگرددند. (۲ و ۱) تقسیمات و رویدادهای اسپرماتوزن در رات در یک چرخه ۱۲ روزه صورت

گاز خردل بهترین ماده شناخته شده گروه مواد تاول زامی باشد که در سال ۱۸۲۲ توسط Despretz سنتز گردید. (۱ و ۲) گاز خردل بصورت مایع روغنی شکل بی رنگ تا کهربایی با واکنش خنثی می باشد و از لحاظ فیزیکی و شیمیایی یک ماده تقریباً پایدار است. (۳ و ۲) حلالیت این گاز در مواد آلی بسیار خوب است. گاز خردل در نوع خالص بدون بو می باشد ولی به علت همراه بودن با ناخالصی ها مانند سولفور اتیل بوی سیر می دهد.

۱- مربی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی (\*نویسنده مسئول)

۲- استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه اورولوژی

۳- دکترای حرفه ای پزشکی، دانشکده علوم پزشکی ارتش

۴- دکترای حرفه ای پزشکی، مدیر پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

۵- استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه آسیب شناسی، بیمارستان ۵۰۱ آجا

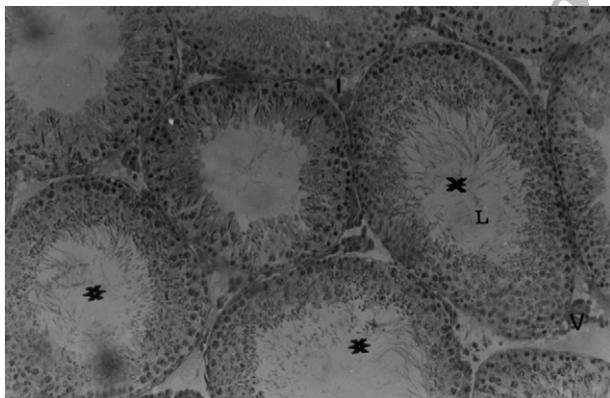
۶- استادیار دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

رتها در قفسهای سه تایی و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند و غذا و آب به طور آزادانه در اختیار آنها بود. درجه حرارت ۲۲ درجه سانتیگراد و میزان رطوبت ۴۷ درصد و برای تمامی رتها یکسان بوده است.

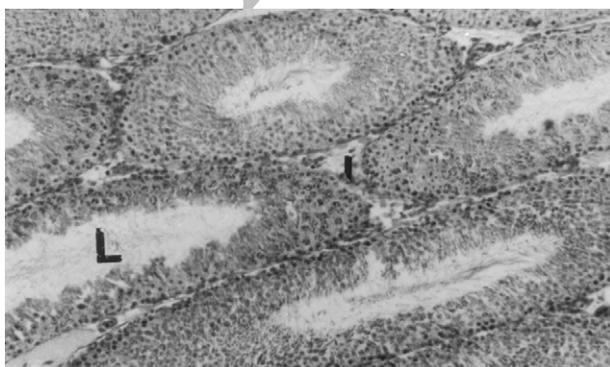
زمان تشریح ۸ هفته پس از تزریق بود که پس از سپری شدن آن رتها را بیهوش نموده و آنقدر بیهوشی را ادامه داده تا بمیرد سپس رتها را به زیر هود منتقل نموده و با ایجاد برش بر روی اسکروتوم بیضه را کاملاً جدا نموده و پس از توزین در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند نمونه های آماده پس از طی مراحل بافتی با H&E رنگ آمیزی شده و برای مطالعات میکروسکوپ نوری آماده شد.

#### یافته ها:

یکی از بارزترین عوارض قابل مشاهده در مقاطع میکروسکوپ نوری گروه های آزمایشی A و B در مقایسه با گروه های نرمال و حلال از بین رفتن انسجام طبیعی بافت بیضه بود. بطوریکه فواصل بین توبولهای سمینفر کاملاً افزایش یافته و خالی بنظر میرسد و لومن لوله ها بصورت توپر دیده شده است. (تصویر ۱ و ۲)



تصویر ۱



تصویر ۲

می پذیرد و دستجات اسپرماتوزون آزاد خواهند شد که میتوانند منجر به ایجاد یک الگوی باروری دوره ای در رت شود. زمان نسبی ورود هر یک از کلنی ها به فرآیند اسپرماتوژنز متناوب بوده و بنابر این آزاد سازی اسپرماتوزون ها بصورت ضربانی نبوده بلکه جریان پیوسته و مداومی دارند. (۴)

#### مواد و روش ها:

حیوان آزمایشگاهی رات از نژاد Albino - NMRI انتخاب شد که از موسسه رازی خریداری گردید و تمامی آنها سه ماهه، نر، حداقل وزن آنها ۲۰۰ گرم بود.

جهت بدست آوردن دوزهای مختلف از عامل HD (عامل شیمیایی که توسط دستگاه GC (گاز کروماتوگراف) درصد خلوص آن تعیین شد. عامل دارای خلوص معادل ۹۹٪ است و بنام سولفور مستارد شناسایی شد) میبایست حلالی انتخاب میشد که اثرات سمی و یا تحریک ایمنولوژیک نداشته باشد تا اثر عامل اصلی HD بوضوح مشخص شود. جهت حل این مهم از بافر تیرو دز استفاده شد. برای شروع ۴۰ راس رات با مشخصات فوق به ۴ دسته ۱۰ تایی دسته بندی شد. گروههای مذکور عبارت بودند از: گروه حلال (الف) - گروه نرمال (ب) - گروه آزمایشی A با دوز ۵ mg/kg عامل (ج) - گروه آزمایشی B با دوز ۱۰ mg/kg عامل (د)

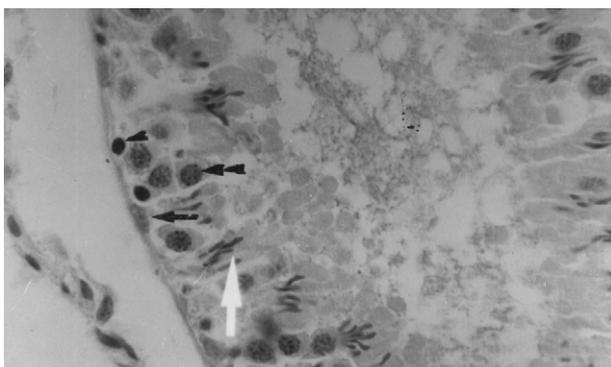
بدلیل خطرناک بودن کار با عامل در یک ویال کوچک ۴ml بافر تیرو دز را بوسیله سرنگ میکرولیتری مدل MS-10u بنام Exmire Microsyringy آماده نموده و در آن بمیزان نیاز عامل را وارد و برای تزریق آماده نمودیم

پس از آماده سازی محلول و تعیین دوز مورد نظر رتها را به صورت کاملاً تصادفی انتخاب کرده و در داخل بشری که محتوی پنبه آغشته به اتر است قرار داده پس از آنکه بیهوشی حاصل گشت روی میز کار حیوان به پشت خوابانده شد و تزریق از بالای ران به داخل حفره صفاق انجام شد و سرنگ در محلول هیپو کلریت کلسیم (این پودر دارای خلوص ۶۴٪ بوده و هنگام ترکیب با عامل یک واکنش گرما زای شدیدی ایجاد کرده و ترکیب آن را تغییر میدهد) انداخته شد (۲) جهت اینکه محلول در محوطه شکم قرار گیرد و وارد اعضای دیگر نشود تزریق با زاویه ۴۵ درجه انجام شد.

بعد از علامت گذاری رتها درون قفس قرار گرفته و مشخصات آنها روی قفس ثبت گردید.

عوارض دیگر در این گروه شامل: بی نظمی و کاهش تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه و ریزش سلولی در اپی تلیوم سمینفر بوده است.

تصویر ۶، توبول سمینفر را در چرخه مشابه و گروه آزمایشی B نشان میدهد. در این گروه بی نظمی های وسیع در ردیف سلولی اسپرماتوسیت اولیه مشاهده میشود که با کاهش تعداد این سلولها و نکروز و دژنراسیون سلولی و نیز وجود مواد و ترشحات ائوزینوفیلیک در بخش میانی لومن همراه است.



تصویر ۶

### بحث و نتیجه گیری:

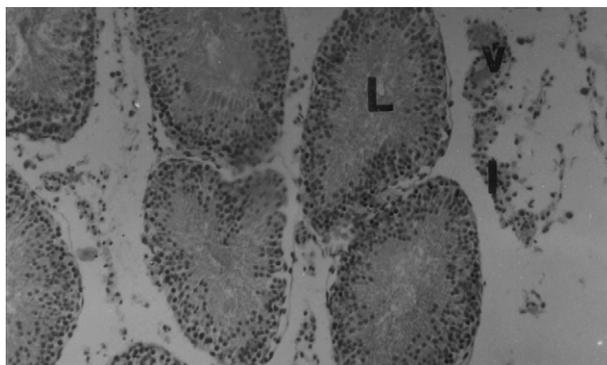
اسپرماتوژنز فرآیندی بسیار سازمان یافته و پیچیده می باشد و عوامل خارجی و هورمونها تاثیری بر روند رویدادهای این فرایند ندارند بلکه در وقوع یا عدم آن موثرند.

در این تحقیق تاثیرات مخرب هیستوپاتولوژیک سولفور مستارد بر روی بیضه موش بزرگ آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. نتایجی که در این تحقیق بدست آمد عبارت بود از:

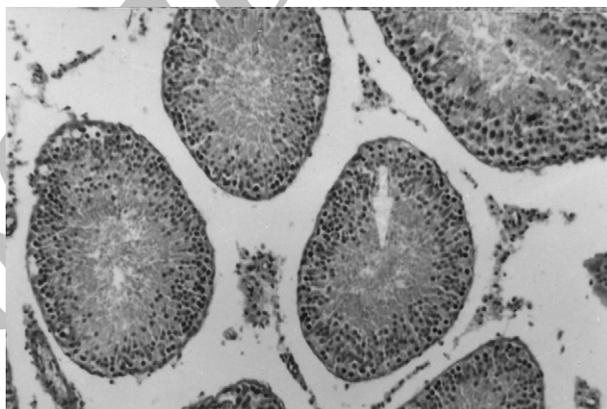
از بین رفتن انسجام طبیعی بافت بیضه در هر دو گروه آزمایشی A و B - افزایش فواصل بین توبولهای سمینفر در دو گروه فوق - کاهش تعداد اسپرماتوسیت ها - تغییر موقعیت هسته سلولهای سرتولی نسبت به گروه حلال و نرمال - وجود اشکال نکروزه سلولهای اسپرماتوسیت - سلولهای نکروزه با هسته های پیکنوتیک که در گروه آزمایشی B بیشتر بوده است.

Sasser LB و همکاران در سال ۱۹۹۳ طی تحقیقاتی که بر روی سولفور مستارد انجام دادند گزارش کردند که سولفور مستارد در طی مراحل اسپرماتوژنز عموماً اسپرماتیدهای حساس را در گیر میکند نتایج بدست آمده از تحقیقات ما نیز اثر مخرب بر روی اسپرماتیدها

در گروه حلال و نرمال، لومن لوله ها کاملاً واضح و بزرگ بوده است (تصویر ۳ و ۴)

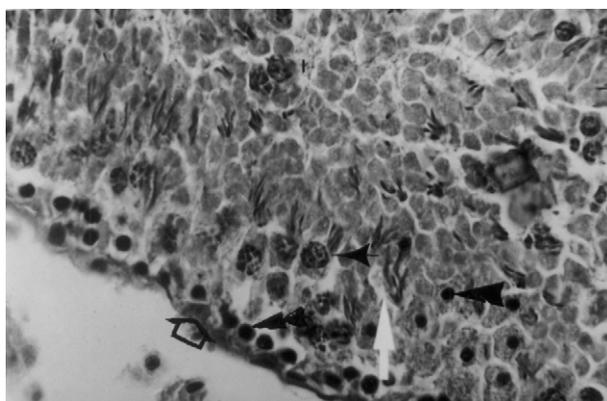


تصویر ۳



تصویر ۴

تصویر ۵، لوله سمینفر را در گروه آزمایشی A نشان میدهد بارزترین عارضه قابل مشاهده در این مقطع وجود اشکال نکروزه سلولهای اسپرماتوسیت اولیه در آن میباشد سلولهای نکروزه با هسته پیکنوتیک در میان سلولهای اپی تلیوم سمینفر بخوبی قابل تشخیص هستند و توبول توپر بنظر میرسد و لومن مشاهده نمی شود.



تصویر ۵

آمده از بیماران توقف نسبی یا کامل فرایند اسپرماتوژنز را گزارش کردند که مطالعات میکروسکوپ نوری ما نیز نشانگر تاثیرات مخرب بر روی مراحل اسپرماتوژنز بوده است. (۸)

از آنجایی که مطالعات انجام شده ما در دو گروه A و B صورت گرفته است تغییرات مشاهده شده در گروه B شدت بیشتری داشته است پس میتوان گفت که تغییرات ایجاد شده وابسته به دوز بوده و گروهی که در معرض این گاز با دوز بیشتری قرار گرفته اند تغییرات شدیدتری را نشان دادند بنابراین با توجه به اینکه نتایج حاصل از بررسی های مختلف تغییرات متعددی را در نسج بیضه در نتیجه تاثیر این ماده مخرب نشان میدهد همچنین با عنایت به مطالعات محدود و اندکی که در این زمینه صورت گرفته پیشنهاد میگردد که عزیزانی را که در سنین باروری به سر می برند و در معرض گاز خردل بوده اند قبل از اثبات ناباروری، مورد ارزیابی قرار داد.

#### References:

- ۱- الیاسی حسین. آسیب بدنی در جنگ خردل گوگردی، ۱۳۷۲، چاپ اول، مرکز اطلاع رسانی و خدمات علمی جهاد سازندگی.
- ۲- قهاری لغیا، بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی سولفور موستارد بر روی پارانثیم کبک موش بزرگ آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تابستان ۱۳۷۶، شماره ۷۶/۲۱
3. Dacre & Goldman; Toxicology and pharmacology of sulfur mustard, Pharmacology journal, 1996, number 2 : 290 – 320.
4. Johnson M H, Everitt B J, Essential Reproduction, Blackwell, scientific publicaftion, second Edition, chapter 3, 1984. P: 51-70.
5. Sasser LB, Cushing JA, Dacre JC, Dominant lethal study of sulfur mustard in male and female rats, J Appl Toxicol, 1993 Sep-Oct;13(5):359-68.
6. Vojvodic V, Milosavljevic Z, Boskovic B, Bojanic N, The protective effect of different drugs in rats poisoned by sulfur and nitrogen mustard, fundam, Appl Toxicol, 1985 Des; 5(6 pt 2):S 160-8.

و در نتیجه کاهش اسپرمها را نشان میدهد که با نتایج اعلام شده توسط Sasser و همکاران هماهنگی و مطابقت دارد. (۵) Vojvodic و همکاران با تحقیقاتی که بر روی سولفور و نیتروژن موستارد در سال ۱۹۸۵ انجام دادند کاهش وزن بدن و تغییرات پاتولوژیکی اساسی را در ارگانها گزارش کردند که نتایج بدست آمده با دوز های متفاوت این گاز نیز این مطلب را تایید می کند. (۶)

صفری نژاد نیز طی بررسی هایی که در سال ۲۰۰۱ بر روی مجروحین شیمیایی انجام داد ۴۲/۵٪ آزواسپرمیا و ۵۷/۵٪ الیگواسپرمیای شدید را گزارش کرد که با نتایج بدست آمده از تحقیق ما که کاهش توبولهای سمینفر مرحله هفتم و در نتیجه کاهش اسپرماتوزوئید بوده است مطابقت دارد. (۷)

عزیزی و همکارانش با تحقیقی که در ال ۱۹۹۵ بر روی مجروحین شیمیایی انجام دادند کاهش میزان اسپرم کمتر از ۳۰ میلیون (در مقایسه با ۶۰ میلیون اسپرم در افراد عادی) و در بیوپسی بعمل

7. Safarinejad MR, Testicular effect of mustard gas, Urology, 2001; 58 (1) : 90-4.
8. Azizi F, Keshavarz A, Roshanzamir F, Nafarabadi M. Reproductive function in men following exposure to chemical warfare with sulphur mustard. Med War, 1995. Jan-Mar; 11(1):34-44.
9. Sasser LB, Cushing JA , Dacre JC, Two-generation reproduction study of sulfur mustard in rats, Reprod Toxicol, 1996 Jul-Aug; 10(4):311-9.
10. Dube SN, Husain K, Sugendran K, Vijayaraghavan R, Somani SM, Dose response of sulphur mustard: behavioral and Toxic signs in rats, Indian J Physiol Pharmacol, 1998 Jul; 42(3): 389-94.
11. Russell LD, Russell J A. Short Term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agent, Am J Anat.1991;192:142-168.
12. Wright W, Karazi AW, Germ cell-Sertoli interactions. Studies of cyclic protein-2 in the seminiferous tubule. Ann Ny Acad Sci.1989; 594:173

## The evaluation of histopathologic effects of mustard gas on testis paranchyme in rat

\* Ghahari, L; MS<sup>1</sup>, Safari Nezhad' MR; MD<sup>2</sup>, Moradi, A; MD<sup>3</sup>, Markazi Moghaddam, N; MD<sup>4</sup>, Dadpey, M; MD<sup>5</sup>, Safari, M; PhD<sup>6</sup>

### Abstract :

**Background:** Sulfur mustard(HD) (bis(2-chloroethyl) sulfide) is a strong alkylating agent with known mutagenic and suspected carcinogenic properties.

**Materials &Methods:** 40 Albino-Nmari male rats , 3 months' old , were divided into four groups (10 in each group) and injected with 5 , 10 mg /kg sulfur mustard in tyrods buffer .After 8 weeks rats were killed. The samples were fixed in formaldehyde solution (%10) , stained with H&E and studied with light microscope.

**Results :** Increased distance between seminiferous tubules. Accumulation of necrotic materials of the cells in the lumen of seminiferous , oligospermia, displacement of somniferous tubules and changing the situation of sertoli nuclei from the abdominal positioning to basal in both groups of sulfur mustard that compared with normal and tyrods groups.

**Conclusion :** Presence of necrotic form of spermatocytes and necrotic cells with picnotic nuclei in both sulfur mustard groups but more in 10 mg/kg HD.

**Keywords :** Sulfur mustard , Testis , Rat.

1-(<sup>\*</sup>Correspondence author) Histologist , Army university of medical sciences.

2- Assistant professor , Army university of medical sciences.

3- General physician.

4- General physician, Army university of medical sciences, Research office manager.

5- Assistant professor , pathology Department, Army university of medical sciences.

6- Anatomist, Semnan university of medical sciences.