



## اثرات آنتی اکسیدانی آلفا توکوفرول (ویتامین E) در بازسازی بافت بیضه موش‌های تیمار شده با بوسولفان

فاطمه روح نواز<sup>۱</sup>، طوبا میرزاپور<sup>۱\*</sup>، ابوالفضل بایرامی<sup>۱</sup>، ماریا ظهیری<sup>۲ و ۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۹/۲۱ - پذیرش مقاله: ۹۵/۳/۲۶)

### چکیده

زمینه: بوسولفان یک داروی شیمی درمانی برای درمان سرطان است. این دارو اثرات سائتوتوکسیک در اندام‌های مختلف حیوان ایجاد می‌کند. از آنجائی که امروزه مصرف داروهای شیمی درمانی به دلیل ابتلای افراد به بیماری سرطان رو به افزایش است لذا حفظ سیستم تولید مثل جهت ادامه باروری در این بیماران ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی با دوزهای مختلف بوسولفان (۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به بیضه موش‌ها انجام گرفت. پس از گذشت ۳۰ روز تأثیر آن بر روند تخریب بافت بیضه، پارامترهای سمن و فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پس از مشخص شدن دوز مؤثر بوسولفان، ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان آنزیمی برای درمان به موش‌ها تزریق شد و پس از گذشت یک ماه تأثیر آن بر پارامترهای سمن و بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، در بیضه موش‌های تیمار شده با بوسولفان، استرس اکسیداتیو در طی ۳۰ روز از تیمار افزایش یافت. فعالیت آنزیمی کاتالاز به طور معنی‌داری در مقایسه با کنترل در طی فاز تیمار کاهش یافت. مطابق با تیمار با بوسولفان یک کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم مشاهده شد. پس از یافتن مخرب‌ترین دوز بوسولفان در تخریب بافت بیضه (دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) این موش‌ها مورد تزریق ویتامین E قرار گرفتند. نتایج نشان داد در موش‌های بوسولفان زده‌ای که در معرض دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E قرار گرفتند، استرس اکسیداتیو و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی کاهش یافتند. تعداد اسپرم‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم کاتالاز نیز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: ویتامین E باعث تجدید فرایند اسپرماتوژنز در این بیماران شده و پارامترهای بیضه را بهبود می‌بخشد.

واژگان کلیدی: بوسولفان، ویتامین E، آنتی اکسیدان، کاتالاز، پارامترهای سمن

\* اردبیل، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی

## مقدمه

اسپریم‌زایی فرایندی پیچیده است که از تعداد زیادی مراحل پی در پی و منظم تشکیل شده و طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تقسیم و تمایز می‌یابد که حاصل آن ایجاد اسپرم فعال است (۱).

این فرایند پیچیده که در بافت پوششی منی ساز بیضه پستانداران اتفاق می‌افتد، از زمان بلوغ شروع شده و در این بافت به عنوان بافت تجدید شونده تا آخر عمر ادامه پیدا می‌کند. مطالعات گذشته نشان می‌دهد ترکیبات شیمیایی با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen species) و تولید استرس اکسیداتیو، باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در بافت بیضه شده و بر این بافت اثر تخریبی می‌گذارد (۲). در واقع اکسید شدن اسیدهای چرب غشاء منجر به از دست رفتن سیالیت غشاء و کاهش در فعالیت آنزیم‌ها و کانال‌های یونی اسپرم خواهد شد. سلول‌های زایای اسپرم به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع، چندین پیوند دوگانه در غشای پلاسمایی و میزان ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی، در برابر آسیب‌های اکسیداتیوی بسیار حساس هستند (۳).

سرطان یک بیماری است که روابط و نظم بین سلولی را مختل کرده و باعث نافرمانی ژن‌های حیاتی می‌شود. این بیماری در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها که به علت آسیب یا جهش در ماده ژنتیکی سلول‌ها در اثر عوامل محیطی یا ژنتیکی ایجاد می‌شود به وجود می‌آید. از آنجا که سلول‌های سرطانی می‌توانند به بافت‌های اطراف حمله کرده و به سایر نقاط بدن مهاجرت کنند، شیمی درمانی به عنوان یک درمان سیستمیک برای درمان سرطان‌های متاستاتیک استفاده می‌شود. (۴). یکی از داروهایی که به عنوان داروی

شیمی درمانی در درمان سرطان استفاده می‌شود بوسولفان است (۵). این دارو دارای فرمول  $[\text{CH}_3\text{SO}_2\text{O} (\text{CH}_2)_4\text{OSO}_2 \text{CH}_3]$  و وزن مولکولی ۲۴۶/۳ است. از طریق دستگاه گوارش به راحتی جذب شده و با نیمه عمری حدود ۲-۳ ساعت از طریق خون دفع می‌شود (۶). یک داروی سیتوتوکسیک (۷) و عامل آلکیل کننده که در داخل سلول با نوکلئوفیل‌ها و پروتئین‌ها واکنش می‌دهد و منجر به کراس لینک بین DNA-DNA و DNA-PROTEIN شده و باعث آسیب DNA می‌شود.

معمولاً برای درمان لوسمی مزمن، سرطان تخمدان و قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی استفاده می‌شود (۸ و ۹). این دارو سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را از بین می‌برد و باعث ایجاد اختلال در اتصالات بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونی به لایه قاعده‌ای می‌شود (۱۰ و ۱۱). درمان با بوسولفان باعث آزواسپرمی و آتروفی بیضه در مردان جوان بیمار شده و در بعضی مواقع باعث نازایی در آنها نیز می‌شود (۱۲). تنوع زیادی در دوز نابارور کننده بوسولفان در گروه‌های مختلف وجود دارد. این دوز در جوندگان ۶-۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در خوک‌ها ۴۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در شغال‌ها ۴-۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد (۱۳).

گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species)، عبارتی برای توصیف تعدادی از مولکول‌های واکنش‌پذیر و رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیژن مولکولی است. این گونه‌های واکنش‌پذیر طی اکسید و احیای بیوشیمیایی به عنوان بخشی از متابولیسم طبیعی یک سلول تولید می‌شوند. آنها نقش مهمی در هومئوستاز و سیگنالینگ سلولی دارند و در هنگام استرس محیطی (مانند UV، قرار گرفتن در

معرض گرما) به طور چشمگیری افزایش می‌یابند. تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد و ROSها باعث آسیب DNA، چربی و پروتئین می‌شود (۱۴). در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها منجر به استرس اکسیداتیو و بروز تغییرات پاتولوژیک متعدد در سطح ماکرومولکول‌های سلولی می‌گردد (۱۵). در شرایط عادی آنتی اکسیدان‌ها قادر به مقابله با اثرات مضر ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند، بنابراین می‌توانند از استرس اکسیداتیو جلوگیری کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها به انواع آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شوند. از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی می‌توان به سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و غیره اشاره کرد. آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل آنتی اکسیدان‌های متابولیک و غذایی است. آنتی اکسیدان‌های غذایی شامل ویتامین‌های A، E، C، بتاکاروتن و مواد معدنی (Zn, Cu, Mn, Se) می‌شوند (۱۶ و ۱۷). یافته‌های جدید نشان می‌دهد که آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی نقش مهمی در تکوین سیستم تولید مثلی انسان و باروری دارند.

ویتامین E فیزیولوژیک (آلفا - توکوفرول) در غشاهای زیستی قرار دارد و نقش مهمی در کاهش آسیب اکسیداتیو در غشاء سلولی ایفا می‌کند (۱۸). از طریق تبدیل رادیکال آزاد اسید چرب پراکسیل به هیدروپراکسی سبب توقف انتشار آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌شود (۱۹). در حالی که محصولات پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد به طور قابل توجهی باعث افزایش محتوای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند گلوکاتایون، سوپراکسید دسموتاز و نیز افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود (۲۰).

از آنجایی که در جوامع کنونی بیماری سرطان در حال افزایش است و روزانه داروهای شیمی درمانی متعددی جهت افزایش شانس بهبود این بیماری روانه بازار می‌گردند که در دراز مدت به بافت‌های مختلف آسیب می‌رساند، لذا شناسایی این داروها و بررسی تأثیر آنها بر سیستم‌های مختلف خصوصاً سیستم‌های تولید مثلی به جهت نقش آنها در تولید زاده‌ها ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی شناسایی داروها و غذاهایی که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند و می‌توانند استرس اکسیداتیو ناشی از شیمی درمانی را کاهش دهند نیز می‌تواند در بهبود بیماری سرطان مؤثر باشد. در مطالعه حاضر به بررسی اثر دوزهای مختلف بوسولفان بر روند تخریب بافت بیضه و کاهش پارامترهای سمن پرداخته می‌شود و در نهایت پس از مشخص شدن دوز مؤثر بوسولفان، ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان آنزیمی برای درمان به موش‌ها تزریق شده و پس از گذشت یک ماه تأثیر آن بر پارامترهای سمن و بافت بیضه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

### مواد و روش‌ها

موش‌های سوری نر بالغ ۶-۴ هفته‌ای نژاد Balb C (n=۲۵) با میانگین وزنی ۳۰-۲۷ گرمی خریداری و تحت شرایط مناسب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و آب و غذای کافی نگهداری شدند. موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم‌بندی شدند:

گروه کنترل که موش‌های این گروه هیچ دارویی دریافت نکردند.

گروه دریافت کننده بوسولفان با دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک دوز به مدت ۳۰ روز.

جداگانه وزن شد و میانگین حاصل مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی بافت‌شناسی قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت آنها، غده بیضه مورد آماده‌سازی و سپس برش بافتی قرار گرفت. میانگین قطر بیضه و قطر لوله‌های سمینی فروس و غیره با قرار دادن یک عقربه مدرج در ناحیه چشمی میکروسکوپ بر حسب میکرومتر برای هر بیضه تعیین گردید.

#### روش مطالعه پارامترهای اسپرم در اپی‌دیدیم با استفاده از میکروسکوپ نوری

برای این منظور ابتدا بخش دم اپی‌دیدیم از بیضه‌ها جدا شد و توسط قیچی و پنس به صورت قطعات کوچک در آمد. در محیط کشت سلولی DMEM/F حاوی ۱۲ درصد سرم گاوی (FBS) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار داده شد. سوسپانسیون به دست آمده جهت آنالیز پارامترهای اسپرم شامل، تعداد، تحرک‌پذیری و مورفولوژی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت.

#### شمارش تعداد اسپرم‌های اپی‌دیدیم

بهترین روش برای مطالعه تعداد اسپرم، استفاده از لام هموسیستمتر نئوبار است زیرا روش آسانی بوده و از سرعت و دقت بالایی برخوردار است. برای مطالعه تعداد اسپرم، ۱۰ دقیقه پس از خروج اسپرم‌ها از اپی‌دیدیم، یک میلی‌لیتر از مخلوط محیط کشت و اسپرم با ۹ میلی‌لیتر فرمالین ۲ درصد رقیق و فیکس شد. به کمک سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی روی لام نئوبار قرار داده شد و روی آن یک لامل قرار گرفت و سپس در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰X شمارش اسپرم‌هایی که دارای ناحیه سر، ناحیه میانی و دم بودند انجام شد. سپس تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر محاسبه گردید. شمارش اسپرم بر اساس

گروه دریافت‌کننده بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک دوز به مدت ۳۰ روز. گروه دریافت‌کننده بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز و بعد از آن دریافت ویتامین E (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۳۰ روز. گروه دریافت‌کننده بوسولفان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز و بعد از آن دریافت الکل به مدت ۳۰ روز که حلال ویتامین E بود (گروه شم ویتامین E). تزریق بوسولفان در همه گروه‌ها به صورت داخل صفاقی (IP) بود و تزریق ویتامین E و الکل به صورت عضلانی بود. در تمام مراحل کار نکات اخلاقی کار با حیوانات از قبیل حفظ حقوق حیوانات، کنترل استرس و درد، دفع استاندارد اجساد حیوانات، تراکم آنها در قفس و نظافت مراکز نگهداری آنها مورد توجه قرار گرفت.

#### روش آماده‌سازی بوسولفان و تزریق آن

برای آماده‌سازی موش‌ها جهت تزریق بوسولفان، ابتدا آنها را وزن کردیم و سپس متناسب با وزن آنها مقداری از پودر بوسولفان (Sigms b2635) را در DMSO حل کردیم. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول بوسولفان آماده شده متناسب با دوز مصرفی را همراه با ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق کردیم.

#### مطالعه بافتی بیضه و مجرای اپی‌دیدیم

پس از گذشت ۳۰ روز از تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف بوسولفان به موش‌ها، آنها را با محلول کتامین - زایلازین بیهوش و شکم حیوان را باز کردیم و بعد از پیدا کردن بیضه‌ها، به کمک قیچی و پنس جراحی، بیضه‌ها را جدا کردیم. پس از جدا کردن چربی و اپی‌دیدیم از آنها، هر بیضه به طور

### تست آنزیم کاتالاز

برای تست آنزیم کاتالاز به عنوان یک آنتی اکسیدان آنزیمی از کیت کاتالاز (زل بیو آلمان) استفاده شد. تعیین فعالیت کاتالاز با روش رنگ سنجی و در طول موج ۴۰۵nm انجام می‌شود (۲۱). فعالیت آنزیم کاتالاز توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Catalase activity } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}}\right) = (\text{OD blank} - \text{OD sample}) \times 271 \times \left(\frac{1}{60} \times \text{Sample Volume}\right)$$

### نحوه خون‌گیری برای تست آنزیم کاتالاز

برای تست آنزیم کاتالاز، ابتدا نمونه‌های خونی با استفاده از روش قطع سر جمع‌آوری شد. ابتدا موش‌ها با استفاده از ترکیب کتامین - زایلایزین بیهوش شدند و سپس با قطع سر خون داخل میکروتیوپ جمع‌آوری شد. نمونه‌های خونی برای جداسازی سرم ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm در دستگاه میکروسانتریفوژ قرار گرفت تا سلول‌های خونی ته‌نشین شده و سرم جدا شود. سرم جدا شده را جمع‌آوری کرده و برای تست داخل فریزر ۲۰°C- قرار دادیم.

### آنالیز آماری

نتایج حاصل از محاسبه وزن بیضه، قطر طولی و عرضی لوله‌های منی ساز، تعداد و درصد زنده ماندن اسپرم و فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های آزمایش و کنترل مورد بررسی آماری قرار گرفت. برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ویرایش ۱۶ و آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Anova) استفاده شد.

دستورالعمل ارائه شده از طرف سازمانی جهانی بهداشت WHO (World Health Organization) انجام شد.

### قابلیت تحرک اسپرم

سنجش حرکات اسپرم نیز بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط WHO انجام شد. به‌طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر مخلوط محیط کشت و اسپرم بر روی لام مخصوص ارزیابی حرکات اسپرم قرار گرفت.

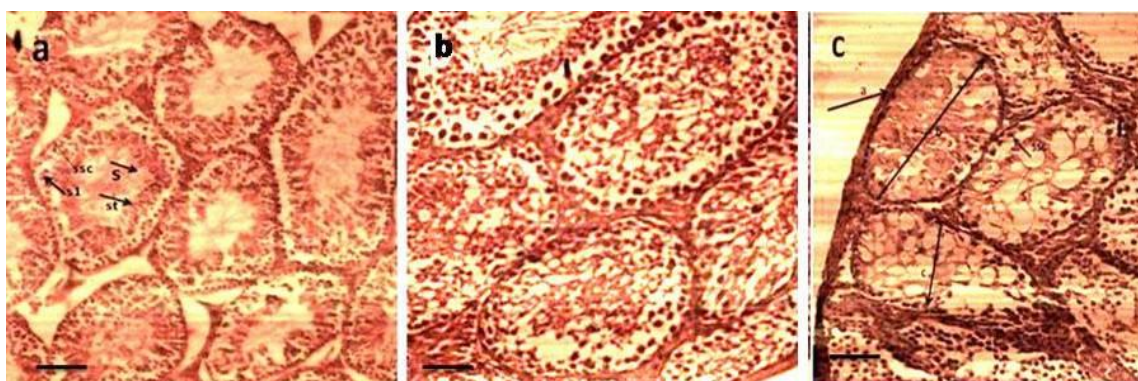
حداقل ۴ میدان میکروسکوپی جهت ارزیابی حرکت حداقل ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. سپس درصد اسپرم‌های متحرک توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰، میزان اسپرم‌های زنده و مرده مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده، می‌توان از رنگ‌آمیزی اتوزین استفاده کرد. برای این منظور ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم نمونه اسپرم روی لام قرار گرفت و سپس با ۱۰ میکرولیتر رنگ اتوزین مخلوط شد و بلافاصله لامل روی قطره قرار داده شد. سپس با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. در این رنگ‌آمیزی سر اسپرم‌های مرده به دلیل نقص در غشاء، رنگ اتوزین را جذب کرده و قرمز می‌شوند در حالی که اسپرم‌های زنده رنگ اتوزین را به خود نمی‌گیرند. لذا به این طریق تعداد اسپرم‌های زنده و مرده در ۴ میدان دید مطالعه شد و با محاسبه میانگین، درصد اسپرم‌های زنده محاسبه گردید.

### نحوه آماده سازی ویتامین E

ویتامین E به شکل مایع غلیظ (Sigma T3251) خریداری شد. برای انجام تزریق رقیق‌سازی با الکل انجام گرفت. ویتامین E با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل عضلانی به ناحیه ران موش‌ها تزریق شد.

## یافته‌ها

پس از تزریق دوزهای ۳۵ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان به عنوان یک داروی مؤثر شیمی درمانی به موش‌ها و مطالعه ساختار بافتی بیضه‌ها، تفاوت آشکاری در شکل لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. همان طوری که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در گروه کنترل در محوطه لوله‌های منی‌ساز فرایند اسپرماتوژنیزس به طور کامل انجام شده



شکل (۱) نمایی از لوله‌های منی‌ساز بیضه موش در گروه‌های (a) کنترل، در وسط هر لوله اسپرم‌ها (S) قابل رؤیت می‌باشند. (b) تیمار شده با دوز ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان، واکوئل دار شدن سلول‌های سرتولی آغاز شده است. و (c) تیمار شده با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان. ضخامت کپسول بیضه نسبت به گروه‌های قبل افزایش یافته است. داخل لوله‌های منی‌ساز سلول‌های سرتولی به شکل حباب‌دار مشاهده می‌شود. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSC) بعد از تزریق بوسولفان در حاشیه لوله‌ها قابل مشاهده هستند. بزرگ نمایی ۱۰X

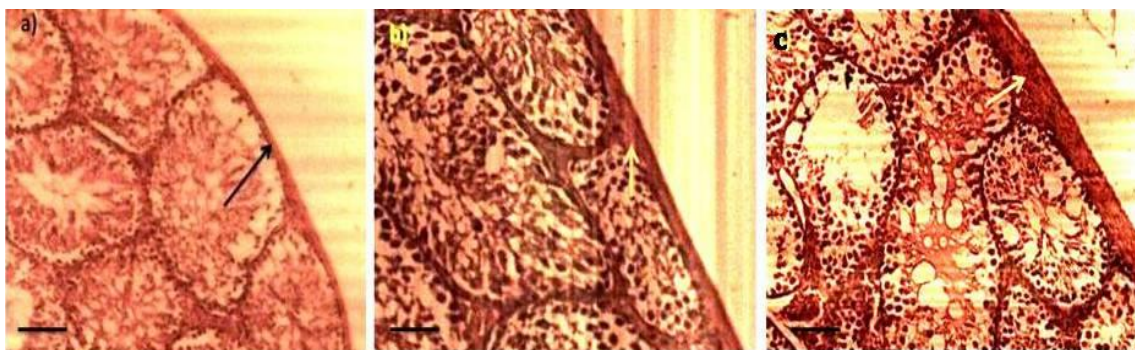
واکوئل دار پوشیده شدند. اسپرم‌ها قابل رؤیت نمی‌باشند (شکل ۱c).

پس از تزریق بوسولفان وزن بیضه در گروه دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ( $P \leq 0.05$ ). این اختلاف با وجودی که در دوز ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم نیز نسبت به گروه کنترل وجود داشت، اما معنی‌دار نبود ( $P \geq 0.05$ ). در دوزهای ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان افزایش معنی‌دار در ضخامت کپسول بیضه نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P \leq 0.05$ ). (شکل ۲).

در دوز ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان، فرایند اسپرماتوژنیزس دچار نقص شد. به نظر می‌رسد سلول‌های جرم به سلول‌های سرتولی نچسبیده‌اند. فضای خالی در داخل لوله‌های منی‌ساز افزایش یافته و اسپرم‌ها به تعداد محدودی دیده می‌شوند. واکوئل دار شدن سلول‌های سرتولی آغاز شده است (شکل ۱b).

در گروه تیمار شده با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان در مقایسه با دو گروه قبلی سلول‌های اسپرماتوژنیک فوق‌العاده کاهش یافته و تنها سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به شکل یک لایه در حاشیه داخلی اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز دیده می‌شوند. بقیه فضای داخل لوله‌ها توسط سلول‌های سرتولی





شکل ۲) مقایسه ضخامت کپسول بیضه در گروه کنترل (a) و گروه دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان (b) و دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان (c). در گروه سوم ضخامت بیضه نسبت به دو گروه قبلی افزایش یافته است. درشت‌نمایی ۱۰X

در دوزهای ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان قطر طولی و عرضی بیضه نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۱) مقایسه پارامترهای بیضه، لوله‌های منی‌ساز و اسپرم در گروه کنترل با گروه‌های آزمون پس از گذشت ۳۰ روز که آزمایش برای هر گروه حداقل ۵ بار تکرار شده است.

| پارامترها   | کنترل     | دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان | دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان |
|---|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| وزن بیضه (میلی‌گرم)                               | ۱۴۵/۳±۴   | ۸۷±۴                                | ۶۷۰±۵ <sup>a</sup>                  |
| ضخامت کپسول بیضه (میکرون)                         | ۵۴۰±۲۸    | ۶۱۰±۳۹ <sup>a</sup>                 | ۶۷۰/۲±۳۴ <sup>a</sup>               |
| قطر طولی بیضه (میکرون)×۱۰ <sup>۳</sup>            | ۴/۵±۰/۵   | ۳/۱±۰/۴ <sup>a</sup>                | ۲/۸۵±۰/۲ <sup>a</sup>               |
| قطر عرضی بیضه (میکرون)×۱۰ <sup>۳</sup>            | ۱/۷۵±۰/۰۷ | ۱/۱۴±۰/۰۳ <sup>a</sup>              | ۱/۰۵±۰/۰۳ <sup>a</sup>              |
| ضخامت اپی‌تلیوم لوله منی‌ساز (میکرون)             | ۴۲/۶±۲    | ۱۹/۴±۲                              | ۱۳/۳±۲ <sup>a</sup>                 |
| قطر داخلی لوله‌های منی‌ساز (میکرون)               | ۳۲۵±۱۰    | ۱۶۰±۶                               | ۱۱۰±۷ <sup>a</sup>                  |
| تعداد اسپرم زنده در واحد حجم (ml)×۱۰ <sup>۶</sup> | ۱۷±۱.۵    | ۷±۱                                 | ۴±۱.۵ <sup>a</sup>                  |
| قدرت زیست اسپرم بر حسب درصد                       | ۷۰±۴      | ۱۵±۳ <sup>a</sup>                   | ۱۰±۲ <sup>a</sup>                   |

<sup>a</sup> در مقایسه با گروه کنترل در همان ردیف از نظر آماری معنی‌دار است ( $P \leq 0.05$ ). اطلاعات به صورت (انحراف معیار ± میانگین) ثبت شده‌اند.

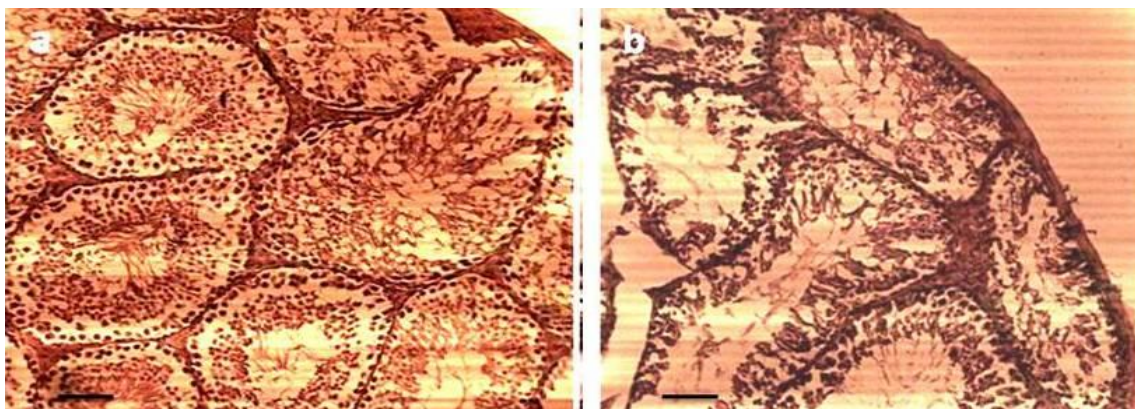
از آنجایی که دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان در تمام پارامترهای بیضه، لوله منی‌ساز و اسپرم کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد؛ لذا این دوز برای بررسی اثرات حفاظتی ویتامین E انتخاب شد. لازم به ذکر است دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان در همه موارد تأثیر معنی‌دار روی بافت بیضه نسبت به گروه کنترل نداشت؛ لذا تأثیر ویتامین E بر روی بیضه‌هایی که در معرض این دوز از بوسولفان بودند سنجیده نشد. برای این منظور موش‌هایی که به

پس از تزریق بوسولفان تعداد اسپرم‌های زنده در واحد حجم (۱ میلی‌لیتر) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. این کاهش در هر دو دوز ۴۰ و ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود. قطر لوله‌های منی‌ساز در دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $P \leq 0.05$ ). ضخامت اپی‌تلیوم لوله منی‌ساز در دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود ( $P \leq 0.05$ ).

معیاری برای اثر بخشی ویتامین E در نظر گرفته شود. از آنجایی که حلال ویتامین E الکل می‌باشد، لذا در یک گروه دیگر نیز تزریق الکل یک ماه پس از تزریق بوسولفان انجام گرفت و به عنوان گروه شم در نظر گرفته شد.

نتایج نشان داد استفاده از ویتامین E باعث احیای لوله‌های منی‌ساز و از سرگیری فرایند اسپرماتوژنز در آنها شد به طوری که در بیشتر لوله‌ها اسپرم‌ها حضور داشتند. با این وجود همان طوری که در شکل ۳a مشاهده می‌شود در بعضی نقاط گسیختگی اپی تلیوم لوله‌های منی‌ساز و بزرگ شدن حفره وسط لوله مشاهده می‌شد.

مدت ۳۰ روز در معرض دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان قرار گرفته بودند انتخاب شدند و این بار برای مدت یک ماه دیگر در معرض دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E قرار گرفتند تا اثر ویتامین E بر پارامترهای بیضه‌ای در آنها مورد بررسی قرار گیرد. در واقع یک ماه پس از تزریق دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان، ویتامین E با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به شکل عضلانی به موش‌ها تزریق شد و پس از یک ماه تأثیر آن بر پارامترهای بیضه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. پس از یک ماه، فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در خون این موش‌ها نیز مورد محاسبه قرار گرفت تا به عنوان

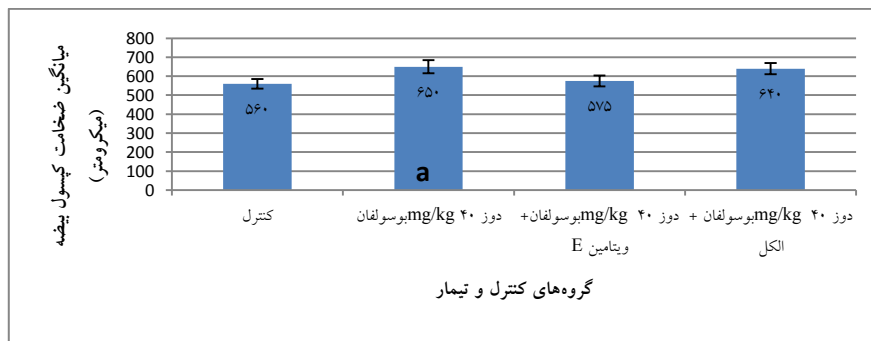


شکل ۳) مورفولوژی لوله‌های منی‌ساز (a) یک ماه پس از تزریق ویتامین E در موش‌هایی که قبلاً به مدت ۳۰ روز در معرض دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان بودند. فرایند اسپرماتوژنز از سر گرفته شده است. (b) یک ماه پس از تزریق الکل به موش‌هایی که به مدت ۳۰ روز در معرض بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. اثر احیایی ناچیزی در بافت لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد.

مقایسه میانگین ضخامت کپسول بیضه (میکرومتر) در گروه‌های کنترل و تیمار نشان داد، پس از تزریق ویتامین E به موش‌هایی که قبلاً به مدت ۳۰ روز در معرض دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان بودند، ضخامت کپسول بیضه نسبت به گروه دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان کاهش معنی‌داری داشت ( $P \leq 0.05$ ) (نمودار ۱).

تزریق الکل به عنوان حلال ویتامین E به موش‌های گروه شم طی مدت ۳۰ روز، تأثیر زیادی بر پارامترهای اسپرم و لوله‌های منی‌ساز نداشت. البته در بعضی از لوله‌ها اسپرماتوژنز انجام شده و اسپرم حضور داشت که می‌تواند به گذشت زمان و خود تجدیدی بافت بیضه اشاره داشته باشد (شکل ۳b).





نمودار ۱) مقایسه میانگین ضخامت کپسول بیضه (میکرومتر) در گروه کنترل و گروه‌های تیمار (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) پس از گذشت دو ماه. آزمایش برای هر گروه حداقل ۵ بار تکرار شد. <sup>a</sup> در مقایسه با گروه کنترل در همان ردیف از نظر آماری معنی‌دار است

کیلوگرم بوسولفان شد ( $P < 0.05$ ). با وجودی که تزریق ویتامین E بر تعداد اسپرم‌های زنده و فعال افزود، اما این اختلاف نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود ( $P \geq 0.05$ ).

پس از تزریق ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان غذایی، تأثیر آن بر فعالیت یک آنتی اکسیدان آنزیمی به نام کاتالاز در خون بررسی شد. برای این منظور یک ماه پس از تزریق دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان، ویتامین E با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به شکل عضلانی به موش‌ها تزریق شد و پس از یک ماه، نمونه خون موش‌ها استخراج شد. سپس پس از انجام مراحل آزمایشگاهی و جدا کردن سرم خون، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شد. از آنجایی که برای هر گروه حداقل پنج تکرار وجود داشت و برای هر تکرار سه بار جذب نوری به فواصل سه دقیقه خوانده می‌شد، لذا برای فعالیت آنزیم کاتالاز برای هر گروه یک محدوده عددی به دست آمد. نتایج نشان داد که پس از تزریق ویتامین E فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته است و این افزایش نسبت به گروه ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان معنی‌دار بوده است ( $P \leq 0.05$ ).

مقایسه میانگین وزن بیضه (میلی‌گرم) در گروه‌های کنترل و تیمار نشان داد، پس از تزریق ویتامین E افزایش چشمگیری در وزن بیضه گروه تیمار نسبت به گروه دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان به وجود آمده است ( $P \leq 0.05$ ).

تزریق دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان به موش‌ها باعث کاهش قطر طولی و عرضی بیضه‌ها نسبت به گروه کنترل شد. پس از تزریق ویتامین E بافت بیضه احیا شد و میانگین قطر طولی بیضه از گروه کنترل هم بیشتر شد اما اختلاف بین آنها معنی‌دار نبود. در مقابل، پس از تزریق ویتامین E قطر طولی بیضه‌ها در مقایسه با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان اختلاف معنی‌داری پیدا کرد ( $P \leq 0.05$ ). در مورد قطر عرضی بیضه با وجودی که ویتامین E سبب احیای بیضه شد ولی اختلاف آن نسبت به گروه ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان معنی‌دار نبود ( $P \geq 0.05$ ). ویتامین E موجب افزایش معنی‌داری در ضخامت اپی تلیوم و نیز قطر لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان شد ( $P < 0.05$ ).

ویتامین E، موجب افزایش معنی‌داری در قدرت زیست اسپرم‌ها نسبت به گروه ۴۰ میلی‌گرم بر

جدول ۲) مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های کنترل و تیمار پس از گذشت دو ماه از آزمایش که برای هر گروه حداقل ۵ بار تکرار شد.

| گروه کنترل           | دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان | دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان و ویتامین E | دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان و الکل |
|----------------------|-------------------------------------|---|--|
| فعالیت آنزیم کاتالاز | ۹/۶۶±۲                              | ۸/۱۴±۱/۵ <sup>b</sup>                           | ۴/۹۳±۱/۲ <sup>a</sup>                      |
| واحد بر میلی لیتر    | (۷-۱۲)*                             | (۶-۱۰)*   | (۳-۷)*                                     |

a: در مقایسه با گروه کنترل در همان ردیف از نظر آماری معنی دار است ( $P \leq 0.05$ ).

b: در مقایسه با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان در همان ردیف از نظر آماری معنی دار است ( $P \leq 0.05$ ).

\* از آنجاییکه در محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز برای هر گروه ۵ تکرار وجود داشت لذا محدوده‌ای از فعالیت آنزیم به دست آمد که داخل پراشت از کوچک‌ترین عدد به سمت بزرگ‌ترین آنها در داخل پراشت نوشته شده میانگین آنها به شکل یک عدد در بالا بیان شد.

## بحث

ناباروری یکی از مشکلات بهداشتی جهان است که آثار سوء خود را در زمینه‌های فردی، اجتماعی و اقتصادی بر جا می‌گذارد. علل ناباروری در مردان را مربوط به اختلالات اسپرم شامل تعداد کم، عدم بلوغ، شکل غیرطبیعی و عدم توانایی در حرکت مناسب اسپرم برشمرده‌اند.

در مطالعه حاضر پس از تزریق هر دو دوز بوسولفان (۳۵ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تعداد اسپرم‌ها و درصد زنده ماندن آنها کاهش چشمگیری نسبت به گروه کنترل داشت. اما دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان اثر مخرب‌تری داشت به طوری که تعداد اسپرم‌های زنده به ۴ میلیون در میلی لیتر کاهش یافت. با تزریق ویتامین E بر تعداد اسپرم‌ها افزوده شد و درصد اسپرم‌های متحرک با مورفولوژی خوب افزایش یافت. تحرک اسپرم‌ها یکی از فاکتورهای مهم در ایجاد باروری به روش طبیعی است و علت بسیاری از ناباروری‌ها تحرک پایین اسپرم بوده است (۲۲). در مطالعه حاضر تزریق بوسولفان با افزایش رادیکال‌های آزاد نقش منفی بر تحرک اسپرم و پارامترهای بیضه و

لوله منی‌ساز داشت به طوری که این پارامترها نسبت به گروه کنترل کاهش داشتند.

مطالعات چوی (Choi) در سال ۲۰۰۴، نشان داد که دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان اثر نامطلوبی بر روی بیضه و پارامترهای آن دارد و باعث کاهش وزن بیضه شده و همچنین سلول‌های زایا در بیضه به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. بسیاری از سلول‌های زایای اسپرم به غیر از اسپرماتوگونی در بافت بیضه وجود نداشتند (۲۳).

انجم‌روز و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر دوزهای متفاوت بوسولفان (۳۰، ۲۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بر روی بیضه و اپی‌دیدیم را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که افزایش دوز بوسولفان باعث کاهش تعداد و تحرک اسپرم در لوله‌های منی‌ساز بیضه موش‌ها می‌شود (۶).

میرزاپور و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات دوز ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان بر بافت بیضه موش را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از کاهش تعداد سلول‌های زایا و نیز تغییر شکل سلول‌های سرتولی بود (۲۴).

یونگ (Jung) و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی بوسولفان گزارش کردند که این دوز از بوسولفان دارای اثر منفی روی سیستم تولید مثلی جنس نر است که مصرف همزمان این دارو با یک آنتی اکسیدان، دارای اثر محافظتی در برابر آسیب‌های ناشی از این دارو بر سیستم تولید مثلی در مردان است (۸).

در مطالعه حاضر ویتامین E با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای مدت یک ماه به موش‌های سوری نژاد Balb/c تجویز شد. در تجویز آنتی اکسیدان‌ها دوز مصرفی بسیار مهم است، چرا که مطالعات محققان دیگر نشان داده است. موش‌هایی که دوز بالای ویتامین E دریافت کرده بودند، تعداد واکوئل‌های زیادی در مقاطع بافتی بیضه داشتند که این نشان می‌دهد مقادیر بالای این ویتامین سمی است. در این موارد ویتامین E با تولید ROS باعث توقف سیکل سلولی و افزایش فرایند آپوپتوز می‌شود. پس، آنتی‌اکسیدان‌ها شمشیر دو لبه‌ای هستند که دوز و مدت زمان مصرف آنها مهم است. استفاده از دوز نامناسب یا دوره کوتاه درمان آنها، حتی اثر معکوس دارد (۲۵).

ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان میزان فعالیت آنزیم کاتالاز که یک آنزیم آنتی اکسیدانی قوی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد می‌باشد را افزایش داد. ویتامین E (توکوفرول) یک آنتی اکسیدانت غیرآنزیمی قوی محسوب می‌شود که قادر است واکنش پراکسیداسیون لیپید را در غشاهای سلولی به وسیله محدود نمودن عمل رادیکال‌های آزاد مهار و بدین ترتیب غشاهای سلولی را از آسیب القا شده به وسیله آنها محافظت نماید. در واقع ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و با افزایش بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی

باعث بهبود کیفیت اسپرم می‌شود (۲۶). در دستگاه تناسلی نر، نقش آنتی اکسیدانتی این ویتامین در مهار نمودن اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در بیضه (۲۷) و اسپرم (۲۸) گزارش شده است. به نظر می‌رسد پاکسازی عوامل اکسیداتیو توسط موادی نظیر ویتامین E بتواند در درمان و جلوگیری از بروز بیماری‌های مربوط به اسپرم مفید باشد. علاوه بر این، ویتامین E با قابلیت ذکر شده قادر است سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول‌های بیضه و اسپرم را تقویت نماید.

از جمله پژوهش‌هایی که در آنها به بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی دوزهای مختلف ویتامین E در کاهش استرس اکسیداتیو پرداخته شده می‌توان به کارهای ساهو (Sahoo) و همکاران در سال ۲۰۰۸ با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و نیز آیبک (Aybek) و همکاران در سال ۲۰۰۸ با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E اشاره کرد. در این پژوهش‌ها به اثر محافظتی ویتامین E در برابر استرس اکسیداتیو و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدان بعد از استفاده تأکید شده است (۱۸ و ۲۹). کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه موجودات زنده و در اکثر ارگان‌های بدن یافت می‌شود. این آنزیم دارای قدرت تجزیه بالا می‌باشد، به طوری که یک مولکول کاتالاز قادر به تجزیه میلیون‌ها مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن در هر ثانیه می‌باشد (۳۰). افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز و بهبود ساختار لوله‌های منی‌ساز بیضه توسط پژوهش‌های کلندر (Kalender) در سال ۲۰۱۳ گزارش شده است (۳۱).

یکی از مشکلات کار با موش‌ها در این تحقیق افزایش سن آنها و تأثیر آن بر پارامترهای بیضه و تعداد اسپرم بدون تزریق هیچ دارویی بود. به طوری که در این تحقیق پس از گذشت دو ماه از آزمایش تعداد اسپرم‌ها

نیز مشاهده می‌شود، لذا حفظ سیستم تولید مثلی و فراهم کردن شرایط جهت ادامه باروری در این بیماران ضروری به نظر می‌رسد. تحقیق حاضر نشان داد دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E باعث تجدید فرایند اسپرماتوژنز در موش‌هایی که در معرض دوزهای بالای داروی شیمی درمانی بودند می‌شود، لذا نتایج این تحقیق می‌تواند برای حفظ باروری و بهبود شرایط تولید مثلی در بیمارانی که به دلیل ابتلا به سرطان‌های مختلف در معرض شیمی درمانی بوده‌اند شده و پارامترهای بیضه را بهبود می‌بخشد.

### سپاس و قدردانی

از زحمات مسئولین محترم آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه محقق اردبیلی که زمینه انجام این پروژه را فراهم کردند تشکر و قدردانی می‌گردد. از آنجایی که بعضی کاستی‌ها در زمینه سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در آزمایشگاه وجود داشت (نبود دستگاه لازم جهت سنجش)، بدین‌وسیله از زحمات جناب آقای دکتر حمیدی جهت انجام ریزنی‌های لازم برای انجام این کار در سایر مراکز آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

در موش‌های گروه کنترل نسبت به حالتی که یک ماه از آزمایش گذشته بود، دچار کاهش شد. در واقع افزایش سن موش‌ها بدون هیچ گونه تزریق دارویی باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌شود. که باید در مقایسه‌ها به این نکته توجه کرد. پس از تزریق ویتامین E بهبود در شرایط اسپرماتوژنز رخ داد و تعداد اسپرم‌ها افزایش یافت و از گروه کنترل نیز بیشتر شد. با توجه به مطالعات آگاروال (Agarwal) افزایش سن موش‌ها تغییرات دژنراتیوی در بافت بیضه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم ایجاد می‌کند. از جمله عواملی که اثر سمی روی کیفیت اسپرم دارد زیاد شدن رادیکال‌های آزاد است. بیشتر آنتی‌اکسیدان‌ها در طول حیات موجودات زنده با افزایش سن دچار تغییر می‌شوند (۳۲). تحقیقات لوپز (Lopez) و همکاران نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در پوست موش‌های جوان و پیر مشابه است، در حالی که فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با افزایش سن کاهش می‌یابد (۳۳ و ۳۴).

### نتیجه‌گیری

نتیجه آنکه امروزه مصرف داروهای شیمی درمانی به دلیل ابتلای فراوان افراد به بیماری سرطان رو به افزایش است. با پیشرفت شیوه‌های درمان در بسیاری از موارد بهبود بیماری سرطان و به دنبال آن ناباروری

### References:

1. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004; 25(5): 747-806.
2. Gong Y, Han XD. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 2006; 22(4): 623-30.
3. Rao MV, Sharma PS. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reprod Toxicol* 2001; 15(6): 705-12.
4. Zhu J, Liu R, Jiang Z, et al. Optimization of drug regimen in chemotherapy based on semi-mechanistic model for myelosuppression. *J Biomed Inform* 2015; 57: 20-7.

5. Qu N, Hirayanagi Y, Hayashi S, et al. Goshajinkigan completely recover the severe aspermatogenesis after busulfan treatment in mice. *J Reprod Immunol* 2014; 106: 11-21.
6. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, et al. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. *Iran Biomed J* 2007; 11(1): 15-22.
7. Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of busulfan dosing guidelines for pediatric hematopoietic stem cell transplant conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(8): 1471-8.
8. Jung SW, Kim HJ, Lee BH, et al. Effects of Korean red ginseng extract on busulfan-induced dysfunction of the male reproductive system. *J Ginseng Res* 2015; 39(3): 243-9.
9. Ohira T, Ando R, Okada Y, et al. Sequence of busulfan-induced neural progenitor cell damage in the fetal rat brain. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65(5): 523-30.
10. Wang DZ, Zhou XH, Yuan YL, et al. Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. *Asian J Androl* 2010; 12(2): 263-70.
11. van der Kaaij MA, van Echten-Arends J, Simons AH, et al. Fertility preservation after chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2010; 28(4): 168-79.
12. Baazm M, Darabi MR, Babaei S, et al. Improvement in sperm parameters after using gonadotropin releasing hormone analogue in busulfan treated prepubertal mice. *Arak University of Medical Sciences Journal* 2014; 16(10): 11-8. (Persian)
13. Tagirov M, Golovan S. The effect of busulfan treatment on endogenous spermatogonial stem cells in immature roosters. *Poult Sci* 2012; 91(7): 1680-5.
14. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 2015; 6: 183-97.
15. Dong H, Zhang Q, Li L, et al. Antioxidant activity and chemical compositions of essential oil and ethanol extract of Chuanminshen violaceum. *Industrial Crops and Products* 2015; 76(15): 290-7.
16. Vélez-Alavez M, De Anda-Montañez J, Galván-Magaña F, et al. Comparative study of enzymatic antioxidants in muscle of elasmobranch and teleost fishes. *CBP: A Physiology* 2015; 187: 61-5.
17. Do TD, Cozzolino D, Muhlhausler B, et al. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. *Food Chem* 2015; 187: 65-74.
18. Sahoo DK, Roy A, Chainy GB. Protective effects of vitamin E and curcumin on L-tyroxine-induced rat testicular oxidative stress. *Chemico Biol Interact* 2008; 176(2-3): 121-8.
19. Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, et al. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 972-9.
20. Ayinde OC, Ogunnowo S, Ogedegbe RA. Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats. *BMC Pharmacol Toxicol* 2012; 13: 17.
21. Zelen I, Mitrović M, Jurišić-Škevin A, et al. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Med Pregl* 2010; 63(9-10): 624-9.
22. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4): 659-68.
23. Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL-and p53-independent manner. *FEBS Lett* 2004; 575(1-3): 41-51.
24. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, et al. Effect of basic fibroblast growth factor and leukemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia* 2012; 44(1): 41-5.
25. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(6): 616-27.



26. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2005; 20(4): 1006-12.
27. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Vioque J, et al. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril* 2010; 93(4): 1128-33.
28. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 1-21.
29. Aybek H, Aybek Z, Rota S, et al. The effects of diabetes mellitus, age, and vitamin E on testicular oxidative stress. *Fertil Steril* 2008; 90(3): 755-60.
30. Arockiaraj J, Easwaran S, Vanaraja P, et al. Molecular cloning, characterization and gene expression of an antioxidant enzyme catalase (MrCat) from *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 32(5): 670-82.
31. Kalender S, Uzun FG, Demir F, et al. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 456-62.
32. Agarwal A, Durairajanayagam D, Halabi J, et al. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014; 29(1): 32-58.
33. Lopez-Torres M, Shindo Y, Packer L. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. *J invest Dermatol* 1994; 102(4): 476-80.
34. Gholizadeh S, Moghimbeigi A, Poorolajal J, et al. Study of risk factors affecting both hypertension and obesity outcome by using multivariate multilevel logistic regression models. *Iran South Med J* 2016; 19(3): 385-97.

*Original Article*

## Antioxidant effects of alpha-tocopherol (vitamine E) on testis regeneration in busulfan-treated mice

*F. Rohnavaz<sup>1</sup>, T. Mirzapour<sup>1\*</sup>, A. Bayrami<sup>1</sup>, M. Zahiri<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> *Department of biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

<sup>2</sup> *Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*

<sup>3</sup> *The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran*

(Received 12 Dec, 2015      Accepted 15 Jun, 2016)

### *Abstract*

**Background:** Busulfan is a chemotherapy medicine for treatment of cancer. This medicine has cytotoxic effects on different organs of animal. Since the use of chemotherapy medicine are increasing due to individuals get involved to cancer, thus preserving of reproductive system in these patients is essential to continue fertility.

**Materials and Method:** In present study the testis of mice were injected with different doses of busulfan (35, 40 mg/kg body weight intraperitoneally. The effects of busulfan was examined on destruction of testis tissue, semen parameters and catalase enzymatic activity compared with control group after 30 days. Finally, after determining the effective dose of busulfan, Vitamin E was injected to the mice as an antioxidant enzyme and its effects on semen parameters and testis tissue was examined after one month.

**Results:** The results showed that oxidative stress was increased in busulfan-treated mice during 30 days. Catalase enzymatic activity decreased significantly in testis of Busulfan-treated mice in comparison with control group. A significant decrease of sperm number was observed according to treatment by Busulfan. After finding the most damaging dose of busulfan (40 mg/kg) in destruction of testis tissue, these mice were injected by vitamin E. The results showed that the oxidative stress and percentage of abnormal sperm were decreased in Busulfan-treated mice that exposed a dose of 100 mg/kg vitamin E. The number of sperm and antioxidant activity of catalase was increased.

**Conclusion:** Vitamin E improves a revival of spermatogenesis and improves testicular parameters in these patients.

**Key words:** Busulfan, Vitamin E, Antioxidant, Catalase, Semen Parameter

©Iran South Med J. All rights reserved.

---

*Cite this article as: Rohnavaz F, Mirzapour T, Bayrami A, Zahiri M. Antioxidant effects of alpha-tocopherol (vitamine E) on testis regeneration in busulfan-treated mice. Iran South Med J 2016; 19(4): 511-525*

Copyright © 2016 Rohnavaz, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

\*Address for correspondence Department of biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.  
Email: Dr.tooba72@gmail.com

Website: <http://bpums.ac.ir>  
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>