

بررسی تغییرات بافت بیضه، سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون در موشهای تیمار شده با بوسولفان

آرش پایه‌دار^{۱*}، احمد مظفر^۲

گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ اصلاح نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: تجویز داروهای آنتی نئوپلاستیک و آلکیل کننده مانند بوسولفان می تواند باعث کاهش باروری گردد. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی تغییرات بافت بیضه، سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون به دنبال تجویز بوسولفان در موش بود.

مواد و روش‌ها: سی و دو سر موش سوری نر بالغ از نژاد Balb/C بصورت تصادفی به دو گروه (n=۱۶) کنترل و بوسولفان تقسیم شدند. حیوانات گروه کنترل تیمار دارویی دریافت نکردند اما حیوانات گروه بوسولفان دو دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به فاصله ۲۱ روز دریافت نمودند. ۳۵ روز پس از تزریق دوم حیوانات گروه بوسولفان و کنترل بیهوش شدند و جهت سنجش هورمون های تستوسترون و آنتی مولرین خونگیری شدند. بافت بیضه نیز جهت ارزیابی هیستوپاتولوژیک خارج گردید. داده های هورمونی با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD تجزیه و تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: داده های هورمونی نشان داد که سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون در گروه بوسولفان اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$). همچنین ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت بیضه در گروه کنترل نشان داد که لوله های سمینی فروس ساختاری منظم دارند و اسپرماتوژنز طبیعی است اما در گروه بوسولفان فضای لومنی در لوله های سمینی فروس گسترده بود، ضخامت اپی تلیوم زایا از بین رفته بود و اسپرماتوژنز بطور کامل تخریب شده بود.

نتیجه گیری: تجویز بوسولفان با دو دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم تاثیری بر سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون ندارد اما می تواند باعث تخریب بافت بیضه و القای آزو اسپرمی در موش شود.

واژه‌های کلیدی: بوسولفان، تستوسترون، آنتی مولرین هورمون، بیضه، موش سوری

آرش پایه‌دار، احمد مظفر. بررسی تغییرات بافت بیضه، سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون در موشهای تیمار شده با بوسولفان. مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۱؛ ۵(۱۵): ۹۰۶-۹۱۶.

مقدمه

اسپرماتوژنز شامل مجموعه ای از تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی است که منجر به پلاریزاسیون سلول های اجدادی به اسپرم های بالغ می شود. این تغییرات می تواند پس از بروز اختلالات ناشی از ناهنجاری های مادرزادی یا ژنتیکی، عوامل فیزیکی، شیمیایی و محیطی که به ناباروری موقت یا دائمی کمک می کنند، مختل شود (Huang et al., 2018; Katz et al., 2017). بر اساس آخرین گزارش منتشر شده توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO)، عدم وجود اسپرم در انزال به عنوان آزواسپرمی شناخته می شود که تقریباً ۱٪ از جمعیت مردان و ۱۰-۲۰٪ از مردان نابارور را تحت تاثیر قرار می دهد (Alfano et al., 2017; Organization WH, 2010). صرف نظر از علل ژنتیکی و مادرزادی آزواسپرمی، عوامل شیمی درمانی می توانند به طور قابل توجهی فیزیولوژی طبیعی اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم را تغییر دهند. همچنین شیمی درمانی می تواند تمایز سلول های اجدادی اسپرماتوگونی را متوقف کند و مخزن سلول های زایا را تخلیه کند (Gandini et al., 2006).

بوسولفان (1, 4-butanediol dimethanesulfonate) با نام ثبت شده Myleran و Busilvex یک ماده ای آنتی نئوپلازی و آلکیل کننده دو عاملی است که تقسیم سلولی را با چسبیدن به رشته ی DNA مهار می کند. این دارو یک ماده ی شیمی درمانی است که می تواند با هدف قرار دادن سلول ها در فاز G1، میزان تکثیر را کاهش دهد. بوسولفان به صورت طولانی مدت با دوز پایین برای درمان لوسمی میلوئید مزمن یا با دوز بالا قبل از پیوند مغز استخوان یا سلول های بنیادی برای انواع دیگر سرطان یا لوسمی مورد استفاده قرار

می گیرد (Gutierrez et al., 2016; Chen et al., 2018). به سرعت از دستگاه گوارش جذب می شود و با نیمه عمر ۲ تا ۳ ساعت به سرعت از جریان خون حذف می شود. این دارو به صورت گسترده متابولیزه می شود و به صورت متابولیت های حاوی گوگرد به طور کامل از طریق ادرار دفع می گردد. بوسولفان دارای تاثیرات جانبی زیادی بر روی اندام های بدن مانند مثانه، کبد، پوست، سیستم عصبی و عملکرد گنادها دارد و به طور بالقوه سرطانزا و تراتوژن می باشد. بوسولفان برای القای آزواسپرمی طولانی مدت در حیوانات مدل به کار می رود که از طریق تشکیل اتصالات عرضی DNA-DNA، DNA-protein و شکستن رشته ی منفرد چندین رده از اسپرماتوگونی ها را از بین می برد. برخلاف مواد شیمیایی دیگر که اسپرماتوگونی های تمایز یافته را از بین می برند، بوسولفان ترجیحاً سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را هدف قرار می دهد و از بین می برد (Anjamrooz et al., 2007; Mobarak et al., 2022). اگرچه با بوسولفان درمانی تمامی اسپرماتوگونی ها از بین نمی روند اما می تواند باعث ناباروری موقت یا دائم شود (Zohni et al., 2012). مهمترین تاثیر بوسولفان در تخریب سلول های زایا، عدم توازن میان تکثیر و آپاتوزیس اپیتلیوم زایا می باشد (Mobarak et al., 2022).

آنتی مولرین هورمون یک گلیکوپروتئین همودایمری ۱۴۰ کیلودالتونی است که از ۵۳۵ اسید آمینه تشکیل یافته و متعلق به ابر خانواده ی TGF- β می باشد. این هورمون در جنس نر توسط سلول های سرتولی نابالغ طی تمایز جنسی تولید می شود و باعث پسرقت مجرای مولر می شود سپس تولید آن توسط بیضه ها در سراسر زندگی ادامه می یابد (Pellatt et al., 2010). در بالغین اثرات اتوکراین آنتی مولرین هورمون بر

روی سلول‌های سرتولی و پاراکراین بر روی سلول‌های لیدیگ و زایا مشخص شده است. آنتی مولرین هورمون بعنوان یکی از شاخصه های مهم عملکرد سلولهای سرتولی می تواند به طور مستقیم می تواند تمایز سلول‌های لیدیگ و اسپرماتوژنز را مهار کند و ممکن است در تحرک اسپرم درگیر باشد (Matuszczak *et al.*, 2013; Lindhardt *et al.*, 2013). گزارش شده است که در مردان بالغ آنتی مولرین هورمون سلول‌های سرتولی و سلول‌های لیدیگ را به ترتیب به صورت اتوکراین و پاراکراین تحت تأثیر قرار می دهد (Lindhardt *et al.*, 2013). اگر چه تستوسترون و FSH اسپرماتوژنز را القا می کنند اما می توانند سطح آنتی مولرین هورمون را کاهش می دهند بنابراین به نظر می رسد این دو هورمون نقشی متضاد در تنظیم آنتی مولرین هورمون دارند. پیشنهاد شده است که سطح سرمی و بیضه‌ای آنتی مولرین هورمون پس از شیمی درمانی در موش و انسان افزایش می یابد. چنین استنباط می شود که فقدان سلول‌های زایا به دلیل آسیب اگزوزن، ممکن است باعث بازگشت تمایز و بلوغ سلول‌های سرتولی شود (Levi & Hasky, 2015). هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر بوسولفان بر ساختار بافت بیضه و تغییرات سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه‌ی تجربی ۳۲ سر موش سوری با وزن 30 ± 2 گرم و محدوده سنی ۱۰ تا ۱۱ هفته از نژاد Balb/C از خانه حیوانات مرکز تحقیقات فناوری ترانس ژنیک شیراز وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی استان فارس تهیه گردید و در ۲ گروه ۱۶ تایی در قفس‌های استاندارد (هر ۴

موش در یک قفس) از جنس پلی کربنات با سقف مشبک از جنس استیل نگهداری شدند. در تمام طول آزمایش موش‌ها تحت شرایط یکسان با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در تمام مدت مطالعه آب و غذا (شرکت دام و طیور پارس، ایران) به میزان کافی و بدون هیچ محدودیتی در اختیار حیوانات قرار گرفت. طول دوره‌ی مطالعه ۵۶ روز (۲۱+۳۵ روز) در نظر گرفته شد و حیوانات با رفتاری انسانی و مطابق با توصیه‌های کمیته‌ی مراقبت از حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تحت درمان قرار گرفتند. همچنین پروتکل اخلاقی این مطالعه در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید (شماره کد اخلاقی: IR.Miau 13952009).

گروه بندی و طراحی مطالعه

حیوانات برای گروه‌بندی ابتدا وزن‌کشی شدند. بدین منظور حیوانات در دستگاه مقید کننده قرار داده شدند و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت 0.001 گرم اندازه‌گیری شدند. سپس موش‌ها در ۲ گروه ۱۶ تایی بصورت کاملا تصادفی گروه بندی شدند:

۱- گروه کنترل: در مدت ۵۶ روز هیچگونه درمان دارویی دریافت نکردند.

۲- گروه بوسولفان: دو دوز بوسولفان (Busilvex, Pierre Fabre Medicament, Boulogne, France) ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به فاصله ۲۱ روز دریافت کردند و ۳۵ روز پس از تزریق دوم نمونه‌گیری شدند (Panahi *et al.*, 2015).

در تمام طول مدت مطالعه، موش‌ها از نظر وضعیت عمومی و بالینی تحت مراقبت بودند. به دلیل این که دوره اسپرماتوژنز در

قالب‌گیری شدند و از هر بیضه ۵ برش به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. برش‌های بافتی با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند و سپس در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 10X مورد ارزیابی هیستوپاتولوژیک قرار گرفتند.

ارزیابی آماری داده‌ها

پس از ارزیابی نرمال بودن توزیع داده‌های هورمونی با آزمون کولموگروف اسمیرنوف، برای مقایسه گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین و خطای معیار ($Mean \pm SE$) بیان و از نرم افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) ورژن ۲۰ برای آنالیز داده‌ها و از نرم افزار GraphPad Prism (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA, USA) ورژن ۵ برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

یافته‌های هورمونی

داده‌های حاصل از مقایسه میانگین و خطای معیار سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون نشان داد (به ترتیب شکل ۱ الف و ب) که گروه‌های کنترل و بوسولفان اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند ($P > 0.05$).

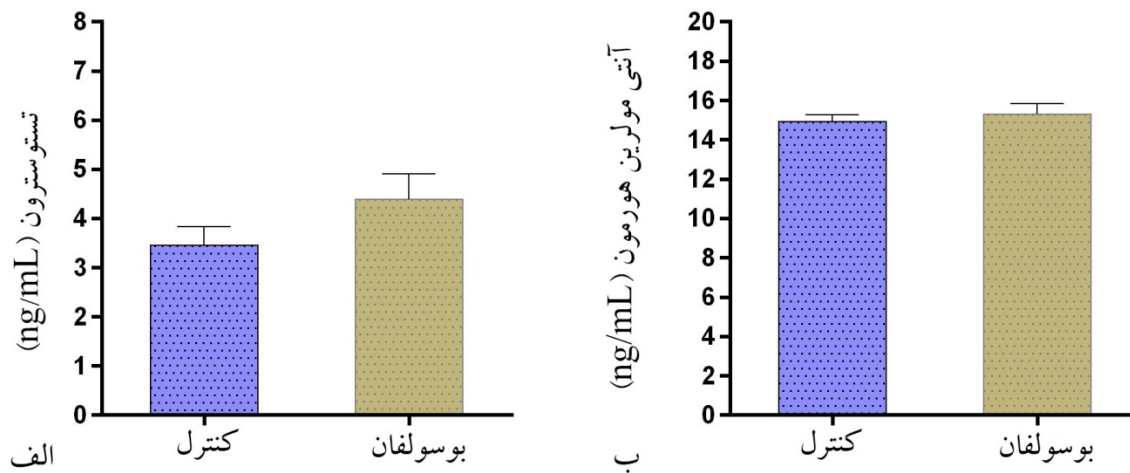
یافته‌های هیستوپاتولوژیک

یافته‌های حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک نشان داد که در گروه کنترل اسپرماتوژنز بصورت فعال مشاهده گردید و فضای لومنی و ضخامت اپیتلیوم زایا طبیعی بود (شکل ۲ الف). در گروه بوسولفان لوله‌های سمینی فرس دچار چروکیدگی شده بودند و تعداد آنها در واحد سطح افزایش یافته بود، فضای لومنی گسترده شده بود و ضخامت اپی تلیوم زایا به شدت

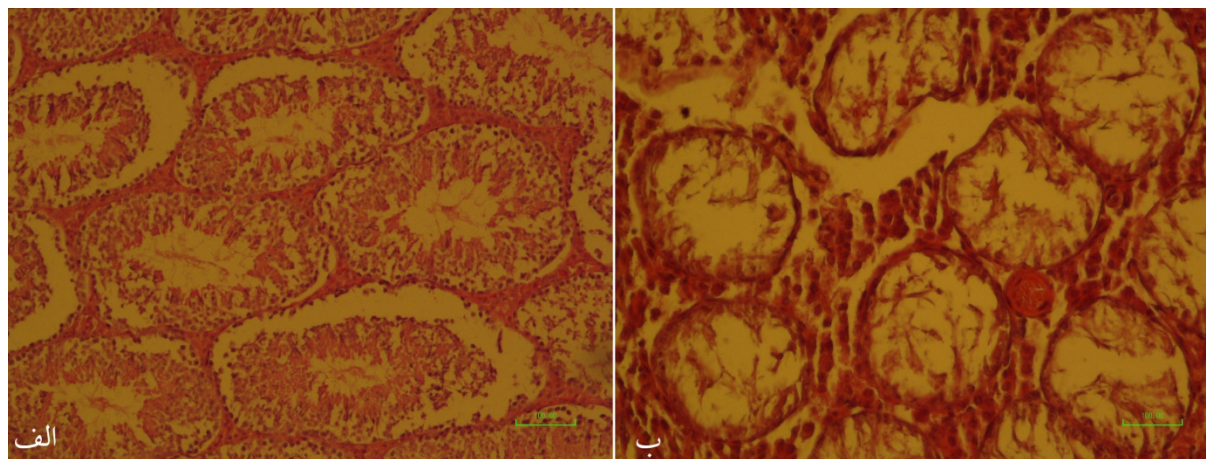
موش ۳۵ روز (۴ سیکل ۸/۶ روز) است برای مشاهده حداکثر میزان تخریب اسپرماتوژنز، روزی که تزریق دوم انجام گرفت روز صفر در نظر گرفته شد. به دلیل اینکه در طراحی آزاواسپرمی حیوانات مدل از دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بطور معمول استفاده می‌شود (Karimaghai *et al.*, 2015; Mehrabani *et al.*, 2018) بنابراین در این مطالعه از دوزهای حداقل و حداکثر استفاده نگردید. در انتهای مطالعه، همه‌ی حیوانات تحت تاثیر بی هوشی خفیف با اتر (Sigma-Aldrich, USA) قرار گرفتند و خونگیری مستقیم از بطن چپ قلب با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی و به میزان ۲ الی ۳ سی‌سی انجام شد. حدود ۲۰ الی ۳۰ دقیقه خون در محیط آزمایشگاه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا فرآیند آگلوتیناسیون انجام شود. سپس نمونه‌های خونی به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند تا سرم جدا شود. سرم‌ها تا قبل از اندازه‌گیری هورمون تستوسترون (Institute of Isotopes Ltd. Budapest, Hungary, Catalog No: RK-61MACE040614) به روش Radioimmunoassay و آنتی مولرین هورمون (Bioassay Technology Laboratory- Shanghai, China, Catalog No: E1096Mo) به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) در فریزر در دمای $-70^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از خونگیری، بیضه‌ها از محوطه شکمی خارج گردید و تا زمان برش‌گیری در فرمالین ۱۰٪ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) قرار داده شدند. پس از آن، بیضه‌ها به قطعات ۲ میلی‌متر مکعب تقسیم شدند و برای فیکس مجدد درون فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. پس از طی مراحل مرسوم بافتی، نمونه‌ها با پارافین

بود. فقط سلولهای سرتولی مشاهده شد و آزواسپرمی محقق شده بود (شکل ۲ ب).

تحلیل رفته بود. فضاهای واکوتله‌ی وسیعی در اپی تلیوم زایا مشاهده گردید و اسپرماتوژنز به صورت کامل تخریب شده



شکل ۱. مقایسه میانگین و خطای معیار (Mean±SE) سطوح سرمی تستوسترون (الف) و آنتی مولرین هورمون (ب) در گروه های کنترل و بوسولفان.



شکل ۲. فتومیکروگراف لوله‌های سمینی فروس در گروه های کنترل و بوسولفان. الف) در گروه کنترل، لوله‌های سمینی فروس با تراکم بالا و منظم قابل مشاهده اند. اسپرماتوژنز به صورت فعال مشاهده می گردد. ب) در گروه بوسولفان، فضای لومنی باز شده و ضخامت اپی تلیوم زایا به شدت تحلیل رفته است و فقط سلولهای سرتولی دیده می شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین. بزرگنمایی 10X. مقیاس (نوار سبز رنگ) ۱۰۰ میکرومتر.

سرتولی آن‌ها را احاطه کرده‌اند. این مجموعه، محیطی را فراهم می‌آورد که باعث عملکرد و بقای اسپرماتوژنز می‌شود (Griswold, 2016). هر گونه تغییر در این محیط باعث اختلال در اسپرماتوژنز می‌شود که به نوبه‌ی خود می‌تواند

بحث
اسپرماتوژنز فرآیندی است که با تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی صورت می‌پذیرد. این سلول‌ها بر روی غشای پایه لوله‌های سمینی فروس واقع شده‌اند و سلول‌های

باعث ناباروری موقت یا دائم گردد (Gutierrez *et al.*, 2016). ناباروری در مردان یکی از دلایل شایع ناباروری است که برخی از انواع آن را می‌توان به کمک روش‌های کمک باروری درمان نمود اگرچه درمان ناباروری‌های ناشی از آژواسپرمی، به عنوان چالشی بزرگ در علوم پزشکی به حساب می‌آید (Chen *et al.*, 2015) فاکتورهای متعددی بر روی فرآیند اسپرماتوزنز تاثیر دارند که منجر به ناباروری یا کاهش باروری می‌شوند. یکی از مهمترین فاکتورها شیمی درمانی است که با ایجاد اثرات سوء بر فرآیند تقسیم سلولی در نهایت موجب آژواسپرمی می‌شود. بوسولفان یک ماده شیمی درمانی آلکیله کننده است که به منظور درمان لوکمای مزمن، سرطان تخمدان، اختلالات لنفوما و میلوپرولیفریتو و همچنین قبل از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود. بوسولفان به صورت غیراختصاصی به DNA متصل می‌شود و با مهار DNA، چرخه سلولی را متوقف می‌کند. در واقع اثرات سیتوکسیک بوسولفان با دخالت در همانندسازی DNA و رونویسی RNA است. پس از یک یا دو تزریق درون صفاقی، به میزان زیادی اسپرماتوزنز تخریب می‌شود (Hosseini Ahar *et al.*, 2014).

در این مطالعه از دو دوز بوسولفان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به فاصله ۲۱ روز استفاده شد که در مطالعات قبلی نشان داده است که می‌تواند باعث از بین رفتن اپیتلیوم زایا و توقف اسپرماتوزنز در حیوانات مدل شود (Panahi *et al.*, 2015; Mehrabani *et al.*, 2015). گزارش شده است که تیمار با بوسولفان می‌تواند به سلولهای سوماتیک بیضه مانند سلولهای سرتولی و لیدینگ آسیب بزند. سلولهای سرتولی که بعنوان سلول‌های پرستار نیز شناخته می‌شوند، در بسیاری از مراحل تکوین اسپرماتوزنز نقش اساسی دارند. یکی از اجزای

اصلی اسکلت سلولی سلولهای سرتولی، فیلامنت‌های حدواسط ویمنتین است که اطراف هسته این سلولها قرار گرفته‌اند. مشخص شده است که بوسولفان می‌تواند باعث تخریب اسکلت سلولی سلولهای سرتولی با تغییر در بیان ژن ویمنتین شود. این تغییر در بیان ژن ویمنتین می‌تواند باعث آپاتوزیس گسترده در اپیتلیوم زایا شود (Kopcky *et al.*, 2007; He *et al.*, 2005). سلول‌های سرتولی تعدادی اتصالات پیچیده و پروتئین‌های ساختاری و ماتریکس خارج سلولی مانند مولکول‌های چسبندگی سلول (مانند کلادین ۳ که برای یکپارچگی اتصالات محکم سلول سرتولی مهمی است)، کادهرین‌ها، لامینین‌ها، کلاژن نوع I و IV و پروتئوگلیکان‌ها شامل کندروئیتین و هپارین تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها برای حفظ ساختار یکپارچه و حمایت از سلول‌های زایای در حال تکوین، تشکیل سد خونی-بیضه ای، میانجی‌گری در برهمکنش‌های سلول-سلول و حفظ ترشح قطبی تولیدات توسط سلول‌های سرتولی ضروری هستند (Melmed *et al.*, 2016). بوسولفان با تاثیر بر سلول‌های سرتولی و با از میان بردن اتصالات و یکپارچگی سلول‌های زایا و همچنین از بین بردن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موجب تخریب اسپرماتوزنز می‌شود. با از میان رفتن اتصالات سلول‌های زایا این سلول‌ها به درون فضای لومنی آزاد می‌شوند و به درون آن ریزش می‌کنند. با توجه به اینکه در این مطالعه سلولهای سرتولی در لوله‌های سمینی‌فروس حیوانات تیمار شده با دو دوز بوسولفان مشاهده شد و همچنین تغییری در سطح ترشح آنتی مولرین هورمون مشاهده نگردید بنابراین بنظر نمی‌رسد که بوسولفان تاثیری بر سلولهای سرتولی داشته باشد. در تایید نتایج این مطالعه، گزارش شده است که بوسولفان درمانی تاثیری بر سلولهای سرتولی ندارد زیرا پس از تولد و

بلوغ، سلولهای سرتولی معمولاً تقسیم نمی شوند و فرآیند تکثیر و تمایز را کامل کرده اند (Jung & Yoon, 2021). در این مطالعه تعداد لوله های سمینی فروس در واحد سطح افزایش یافته بود و لوله ها دچار چروکیدگی شده بودند. چروکیدگی و روی هم خوابیدگی لوله های سمینی فروس به دلیل تخریب اسپرماتوژنز و از بین رفتن اپی تلوم زایا و همچنین کاهش فشار هیدرواستاتیکی لوله های سمینی فروس باعث می شود تا تعداد لوله های سمینی فروس در واحد سطح بیضه افزایش یابد. مطالعات نشان می دهند که در بیضه تیمار شده با بوسولفان قطر لوله های سمینی فروس کوچک می باشد که این تغییر می تواند ناشی از تخریب سلول های اسپرماتوژنیک باشد در نتیجه قابل پیش بینی است که با کوچک شدن لوله ها تعدادشان در واحد سطح افزایش یابد (Anjamrooz et al., 2007).

سطح هورمون تستوسترون در هیچ یک از گروه ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند. براساس مطالعات قبلی بوسولفان درمانی تاثیری بر تعداد کل سلول های لیدینگ ندارد. مطالعات مبتنی بر PCR نشان می دهد که بعد از القای ناباروری با بوسولفان و سپس سلول درمانی، سطح mRNA های کد کننده پروتئین های استروئیدسازی تغییری نمی یابد و بنابراین سطوح تستوسترون بدون تغییر باقی می ماند (Zohni et al., 2012; O'Shaughnessy et al., 2008). در مطالعه حاضر نیز تغییری در سطح هورمونی تستوسترون مشاهده نمی شود که با مطالعات قبلی منطبق است.

سطح آنتی مولرین هورمون در هیچ یک از گروه ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند. مطالعات قبلی بر روی موش و انسان تایید کننده این مساله که پس از شیمی درمانی سطح سرمی و بیضه ای آنتی مولرین هورمون افزایش می یابد که

دلیل آن می تواند فقدان سلول های زایا به دلیل آسیب آگزوزن و بازگشت تمایز و بلوغ سلول های سرتولی باشد. تستوسترون و FSH تنظیم کننده اسپرماتوژنز هستند و سطح آنتی مولرین هورمون را کاهش می دهند بنابراین به نظر می رسد این دو هورمون نقشی متضاد در تنظیم آنتی مولرین هورمون دارند (Levi & Hasky et al., 2015). با توجه به اینکه آنتی مولرین هورمون از سلول های سرتولی ترشح می شود بنابراین می تواند کاندیدای مناسبی برای تشخیص عملکرد سلول های سرتولی و میزان آسیب وارد با این سلول ها به دنبال تجویز بوسولفان باشد. از محدودیتهای این مطالعه می توان به عدم اندازه گیری فاکتورهای هورمونی دیگر مانند هورمون لوتئینه کننده (LH)، هورمون محرک فولیکول (FSH) و اینهیین B که مرتبط با هورمونهای تستوسترون و آنتی مولرین هستند و همچنین عدم استفاده از دوزهای حداقل و حداکثر بوسولفان اشاره نمود.

نتیجه گیری

تزریق دو دوز بوسولفان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به فاصله ۲۱ روز باعث تخریب بافت بیضه و ایجاد آرواسپرمی در موش سوری در مدت انجام این مطالعه گردید که نتایج هیستوپاتولوژیک این مطالعه تایید کننده این مساله است. همچنین، بوسولفان در دوز مورد استفاده تاثیری بر سطح هورمون تستوسترون ندارد که نشان می دهد بوسولفان درمانی تاثیری بر سلول های لیدینگ نداشته است. همچنین، بوسولفان در دوز مورد استفاده، تاثیری بر سطح آنتی مولرین هورمون نداشت که نشان می دهد سلولهای سرتولی تحت تاثیر بوسولفان قرار نگرفته اند. بوسولفان در دوز مورد استفاده در این مطالعه برای ایجاد مدل آرواسپرمی در موش سوری و دیگر حیوانات مدل پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری و حمایت نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان تضاد منافی ندارند.

References

- Aboul Fotouh GI., Abdel-Dayem MM., Ismail DI. and Mohamed HH. Histological study on the protective effect of endogenous stem cell mobilization in Busulfan-induced testicular injury in albino rats. *J Microscop Ultrastruct*, 2018; 6(4): 197-204. doi: 10.4103/jmau.jmau_35_18.
- Alfano M., Ventimiglia E., Locatelli I., Capogrosso P., Cazzaniga W., et al. Anti-Mullerian hormone-to-testosterone ratio is predictive of positive sperm retrieval in men with idiopathic non-obstructive azoospermia. *Sci Rep*, 2017; 7(1): 17638. doi: 10.1038/s41598-017-17420-z.
- Anjamrooz SH., Movahedin M., Mowla SJ. and Bairanvand SP. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. *Iran Biomed J*, 2007; 11(1): 15-22.
- Chen H., Tang QL., Wu XY., Xie LC., Lin LM., Ho GY., et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Mol Med Rep*, 2015; 12(1): 819-28.
- Chen X., Liang M. and Wang D. Progress on the study of the mechanism of busulfan cytotoxicity. *Cytotechnology*, 2018; 70(2): 497-502. doi: 10.1007/s10616-018-0189-5.
- Gandini L., Sgrò P., Lombardo F., Paoli D., Culasso F., Toselli L., et al. Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Hum Reprod (Oxford, England)*, 2006; 21(11): 2882-2889. doi: 10.1093/humrep/del167.
- Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, 2016; 96: 1-17.
- Gutierrez K., Glanzner WG., Chemeris RO., Rigo ML., Comim FV., Bordignon V., et al. Gonadotoxic effects of busulfan in two strains of mice. *Reprod Toxicol*, 2016; 59: 31-9. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.
- He D., Zhang D., Wei G., Lin T. and Li X. Cytoskeleton vimentin disruption of mouse sertoli cells injured by nitrogen mustard in vitro. *J Androl*, 2007; 28(3): 389-96.
- Hosseini Ahar N., Khaki A., Akbari G. and Ghaffari Novin M. The Effect of busulfan on body weight, testis weight and MDA enzymes in male rats. *Int J Women's Health Reprod Sci*, 2014; 2(5): 316-319.
- Huang Y., Zhao L., Yao C., Yang C., Zhu Z., Li P., et al. Effect of Kallikrein-related peptidase KLK1 on ameliorating spermatogenesis regeneration in busulfan-induced azoospermic mice and promoting mouse spermatogonial stem cell proliferation in vitro. *Urology*, 2018;

122 :89-96. doi:
10.1016/j.urology.2018.08.025.

Jung H. and Yoon M. Effects of intravenous multiple busulfan injection on suppression of endogenous spermatogenesis in recipient stallion testes. *J Anim Sci Technol*, 2021; 63(5): 1194-1203. doi: 10.5187/jast.2021.e80.

Karimaghai N., Tamadon A., Rahmanifar F., Mehrabani D., Raayat Jahromi A., Zare S., et al. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster. *Iran J Basic Med Sci*, 2018; 21(7): 660-667. doi: 10.22038/IJBMS.2018.29040.7010.

Kopcky M., Semecky V. and Nachtigal P. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochem*, 2005; 107(4): 279-89.

Levi M., Hasky N., Stemmer SM., Shalgi R. and Ben-Aharon I. Anti-müllerian hormone is a marker for chemotherapy-induced testicular toxicity. *Endocrinology*, 2015; 156(10): 3818-27.

Levi M., Hasky N., Stemmer SM., Shalgi R. and Ben-Aharon I. Anti-Müllerian Hormone Is a Marker for Chemotherapy-Induced Testicular Toxicity. *Endocrinology*, 2015; 156(10): 3818-27.

Lindhardt Johansen M., Hagen CP., Johannsen TH., Main KM., Picard JY., Jørgensen A., et al. Anti-müllerian hormone and its clinical use in pediatrics with special emphasis on disorders of sex

development. *Int J Endocrinol*, 2013; 2013: 198698. doi: 10.1155/2013/198698.

Matuszczak E., Hermanowicz A., Komarowska M. and Debek W. Serum AMH in physiology and pathology of male gonads. *Int J Endocrinol*, 2013; 2013: 128907.

Mehrabani D., Hassanshahi MA., Tamadon A., Zare S., Keshavarz S., Rahmanifar F., et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *J Hum Reprod Sci*, 2015; 8(2): 103-10. doi: 10.4103/0974-1208.158618.

Melmed S., Polonsky KS., Larsen R. and Kronenberg HM. *Williams textbook of endocrinology*, 13th ed, Philadelphia: Elsevier, 2016.

Mobarak H., Rahbarghazi R., Nouri M., Heidarpour M. and Mahdipour M. Intratesticular versus intraperitoneal injection of Busulfan for the induction of azoospermia in a rat model. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2022; 23(1): 50. doi: 10.1186/s40360-022-00587-1.

O'Shaughnessy PJ., Hu L. and Baker PJ. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. *Reproduction*, 2008; 135: 839-850.

Organization WH. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5. Geneva: WHO Press; 2010.

Panahi M., Karimaghai N., Rahmanifar F., Tamadon A., Vahdati A., Mehrabani D., et al. Stereological evaluation of testes in busulfan-induced infertility of hamster. *Comp Clin Path*, 2015; 24: 1051-6.

Pellatt L., Rice S. and Mason HD. Anti-Mullerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high? *Reproduction*, 2010; 139: 825-833.

Zohni K., Zhang X., Tan SL., Chan P. and Nagano MC. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the

recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum Reprod*, 2012; 27(1): 44-53. doi: 10.1093/humrep/der357.

Zohni K., Zhang X., Tan SL., Chan P. and Nagano MC. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum Reprod*, 2012; 27: 44-53.



Investigating Changes in Serum Levels of Testosterone and Antimullerin Hormone in Busulfan-Treated Mice

Arash Payehdar^{1*}, Ahmad Mozafar²

¹Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

²Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received: 22/Nov/2022

Revised: 23/Dec/2022

Accepted: 28/Dec/2022

Abstract

Background and aim: Administrating antineoplastic and alkylating drugs such as busulfan can cause subfertility. The purpose of this study was to evaluate changes in testicular tissue, serum testosterone and anti-Mullerian hormone levels following busulfan administration in mice.

Materials and Methods: Thirty-two adult male mice of the Balb/C strain were randomly divided into two groups (n=16), control and busulfan. The animals of the control group did not receive drug treatment, but the animals of the busulfan group received two doses of busulfan (10 mg/kg body weight) at an interval of 21 days. 35 days after the second injection, the animals of the busulfan and control groups were anesthetized and blood was taken to measure testosterone and antimullerin hormones. The testicular tissue was also removed for histopathological evaluation. Hormonal data were analyzed using one-way variance test and LSD post hoc test.

Results: Hormonal data showed that the serum levels of testosterone and antimullerin hormone in the busulfan group were not significantly different from the control group ($P>0.05$). Also, the histopathological evaluation of the testicular tissue in the control group showed that the seminiferous tubules have a regular structure and spermatogenesis is normal, but in the busulfan group, the lumen space in the seminiferous tubules was wide, the thickness of the germinal epithelium was lost, and spermatogenesis was completely destroyed.

Conclusion: Administration of busulfan with two doses of 10 mg/kg has no effect on the serum levels of testosterone and antimullerin hormone, but it can cause testicular tissue destruction and azoospermia induction in mice.

Keywords: *Busulfan, Testosterone, Antimullerin hormone, Testis, Mouse*

Cite this article as: Arash Payehdar, Ahmad Mozafar. Investigating changes in serum levels of testosterone and antimullerin hormone in busulfan-treated mice. *J Altrn Vet Med.* 2022; 5(15): 906-916.

* Corresponding Author

Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

E-mail: arash2347@gmail.com, Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5281-6114>