مجله طب دامپزشکی جایگزین | زمستان ۱۴۰۱ |دوره ۵ | شماره ۱۵

مقاله پژوهشی

JOAVM
Journal of
Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

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

آرش پایه‌دار[۱،۲*]، احمد مظفر[۲]

[۱]گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

[۲]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 آلکیله 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 نکرند 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>۰/۰۵). 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.

نتیجه‌گیری: 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 آزواسپرمی 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.

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

Orcid: https://orcid.org/ 0000-0001-5281-6114 ,Email: arash2347@gmail.com

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

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 می‌تواند پس از بروز اختلالات ناشی از ناهنجاری‌های مادرزادی یا ژنتیکی، عوامل فیزیکی، شیمیایی و محیطی که به ناباروری موقت یا دائمی کمک می‌کنند، 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 تقریبا 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 می‌توانند به طور قابل توجهی فیزیولوژی طبیعی اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم را تغییر دهند. همچنین شیمی درمانی می‌تواند 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 شده‌ی Myleran و Busilvex یک ماده‌ی آنتی نئوپلازی و آلکیله‌کننده‌ی دو عاملی است که تقسیم سلولی را با چسبیدن به رشته‌ی DNA مهار می‌کند. این دارو یک ماده‌ی 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 سلول‌های بنیادی برای انواع دیگر سرطان یا لوسمی مورد استفاده قرار می‌گیرد (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 متابولیت‌های حاوی گوگرد به طور کامل از طریق ادرار دفع می گردد. بوسولفان دارای تاثیرات جانبی زیادی بر روی اندام‌های 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 رشته‌ی منفرد چندین رده از اسپرماتوگونی‌ها را از بین می‌برد. برخلاف مواد شیمیایی دیگر که اسپرماتوگونی‌های تمایز یافته را از بین می برند، بوسولفان ترجیحا سلول‌های 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 اسپرماتوگونی‌ها از بین نمی‌روند اما می‌تواند باعث ناباروری موقت یا دائم شود (Zohni *et al.,* 2012). مهمترین تاثیر بوسولفان در تخریب سلول‌های زایا، عدم توازن میان تکثیر و آپاپتوزیس اپیتلیوم زایا می‌باشد (Mobarak *et al.,* 2022).

آنتی مولرین هورمون یک گلیکوپروتئین همودایمری ۱۴۰ کیلودالتونی است که از ۵۳۵ اسید آمینه تشکیل یافته و متعلق به ابر خانواده‌ی TGF-β می‌باشد. این هورمون در جنس نر توسط سلول‌های سرتولی نابالغ طی تمایز جنسی تولید می‌شود و باعث پسرفت مجرای مولر می‌شود سپس تولید آن توسط بیضه‌ها در سراسر زندگی ادامه می‌یابد (Pellatt *et al.,* 2010). در بالغین اثرات اتوکراین آنتی‌مولرین هورمون بر

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

روی سلول‌های سرتولی و پاراکراین بر روی سلول‌های لیدیگ و زایا مشخص شده است. آنتی‌مولرین هورمون بعنوان یکی از شاخصه های مهم عملکرد سلولهای سرتولی می تواند به طور مستقیم می‌تواند 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 آنتی‌مولرین هورمون سلول های سرتولی و سلول های لیدیگ را به ترتیب به صورت اتوکرین و پاراکرین 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 اگزوژن، 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 ۲±۳۰ 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 پلی‌کربنات با سقف مشبک از جنس استیل نگهداری شدند. در تمام طول آزمایش موش‌ها تحت شرایط یکسان با دمای ۲±۲۲ 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 (۳۵+۲۱ 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 ۰/۰۰۱ 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 میلی گرم 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

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

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 آزواسپرمی حیوانات مدل از دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بطور معمول استفاده می شود (Karimaghai *et al.*, 2018; Mehrabani *et al.*, 2015) 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 Radioimunoassay و آنتی مولرین هورمون (Bioassay Technology Laboratory-Shanghai, China, Catalog No: E1096Mo) به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) در فریزر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از خونگیری، بیضه ها از محوطه شکمی خارج گردید و تا زمان برش گیری 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 قالب‌گیری شدند و از هر بیضه ۵ برش به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. برش‌های بافتی با هماتوکسیلین و ائوزین 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 گروه ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی استفاده شد. P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین و خطای معیار (Mean±SE) بیان و از نرم افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) ورژن ۲۰ برای آنالیز داده ها و از نرم افزار GraphPad Prism (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA, USA) ورژن ۵ برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

یافته‌های هورمونی

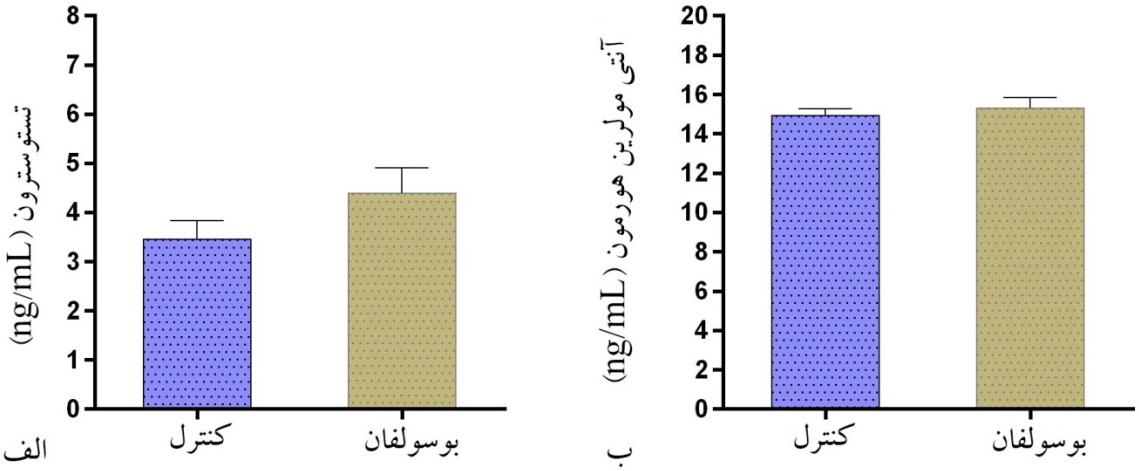
داده های حاصل از مقایسه میانگین و خطای معیار سطوح سرمی تستوسترون و آنتی مولرین هورمون نشان داد (به ترتیب شکل ۱ الف و ب) که گروه های کنترل و بوسولفان اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند (P>۰/۰۵).

یافته‌های هیستوپاتولوژیک

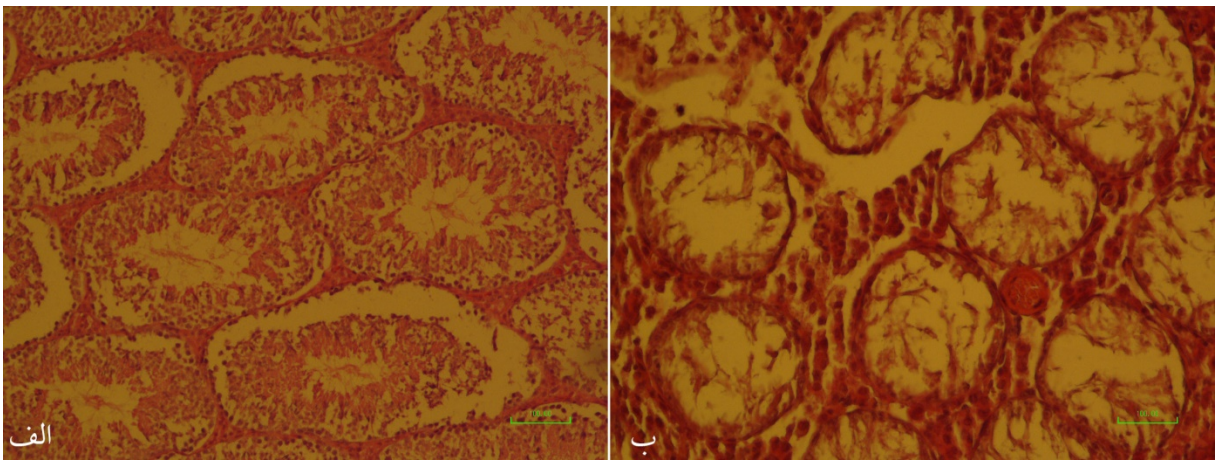
یافته های حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک نشان داد که در گروه کنترل اسپرماتوژنز بصورت فعال مشاهده گردید و فضای لومنی و ضخامت اپیتلیوم زایا طبیعی بود (شکل ۲ الف). در گروه بوسولفان لوله‌های سمینی‌فروس دچار چروکیدگی شده بودند و تعداد آنها در واحد سطح افزایش یافته بود، فضای لومنی گسترده شده بود و ضخامت اپی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

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

تحلیل رفته بود. فضاهای واکوئله‌ی وسیعی در اپی تلیوم زایا مشاهده گردید و اسپرماتوژنز به صورت کامل تخریب شده بود. فقط سلولهای سرتولی مشاهده شد و آزواسپرمی محقق شده بود (شکل ۲ ب).



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 سمینی‌فروس در گروه های کنترل و بوسولفان. الف) در گروه کنترل، لوله‌های سمینی‌فروس 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-ائوزین. بزرگنمایی 10X. مقیاس (نوار سبز رنگ) ۱۰۰ میکرومتر.

بحث

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

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

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 آزواسپرمی، به عنوان چالشی بزرگ در علوم پزشکی به حساب می‌آیند (Chen *et al.*, 2015) فاکتورهای متعددی بر روی فرآیند اسپرماتوژنز تاثیر دارند که منجر به ناباروری یا کاهش باروری می شوند. یکی از مهمترین فاکتورها شیمی درمانی است که با ایجاد اثرات سوء بر فرآیند تقسیم سلولی در نهایت موجب آزواسپرمی می شود. بوسولفان یک ماده شیمی درمانی آلکیله کننده است که به منظور درمان لوکمیای مزمن، سرطان تخمدان، اختلالات لنفوما و میلوپرولیفریتیو و همچنین قبل از پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی استفاده می شود. بوسولفان به صورت غیراختصاصی به DNA متصل می شود و با مهار DNA، چرخه سلولی را متوقف می کند. 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 اسپرماتوژنز تخریب می شود (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 اسپرماتوژنز در حیوانات مدل شود (Panahi *et al.*, 2015; Mehrabani *et al.*, 2015). گزارش شده است که تیمار با بوسولفان می تواند به سلولهای سوماتیک بیضه مانند سلولهای سرتولی و لیدیگ آسیب بزند. سلولهای سرتولی که بعنوان سلول‌های پرستار نیز شناخته می‌شوند، در بسیاری از مراحل تکوین اسپرماتوژنز 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 می تواند باعث تخریب اسکلت سلولی سلولهای سرتولی با تغییر در بیان ژن ویمنتین شود. این تغییر در بیان ژن ویمنتین می تواند باعث آپاپتوزیس گسترده در اپیتلوم زایا شود (Kopcky *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007). 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)، کادهرین ها، لامینین ها، کلاژن نوع I و IV و پروتئوگلیکان‌ها شامل کندروئیتین و هپارین تولید می کنند. این پروتئین‌ها برای حفظ ساختار یکپارچه و حمایت از سلول‌های زایای در حال تکوین، تشکیل سد خونی- بیضه ای، میانجی گری در برهمکنش‌های سلول-سلول و حفظ ترشح قطبی تولیدات توسط سلول‌های سرتولی ضروری هستند (Melmed *et al.*, 2016). بوسولفان با تاثیر بر سلول های سرتولی و با از میان بردن اتصالات و یکپارچگی سلول های زایا و همچنین از بین بردن سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موجب تخریب اسپرماتوژنز می شود. با از میان رفتن اتصالات سلول های زایا این سلول ها به درون فضای لومنی آزاد می شوند و به درون آن ریزش می کنند. با توجه به اینکه در این مطالعه سلولهای سرتولی در لوله های سمینی‌فروس حیوانات تیمار شده با دو دوز بوسولفان مشاهده شد و همچنین تغییری در سطح ترشح آنتی مولرین هورمون مشاهده نگردید بنابراین بنظر نمی رسد 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

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

بلوغ، سلولهای سرتولی معمولا 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 تلیوم زایا و همچنین کاهش فشار هیدرواستاتیکی لوله های سمینی فروس باعث می شود تا تعداد لوله‌های سمینی‌فروس 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 گروه‌ها اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند. براساس مطالعات قبلی بوسولفان درمانی تاثیری بر تعداد کل سلول‌های لیدیگ ندارد. مطالعات مبتنی بر PCR نشان می‌دهد که بعد از القای ناباروری با بوسولفان و سپس سلول درمانی، سطح mRNAهای کد کننده‌ی پروتیین‌های استروئیدسازی تغییری نمی‌یابد و بنابراین سطوح تستوسترون بدون تغییر باقی می‌ماند (Zohni *et al.*, 2012; O'Shaughnessy *et al.*, 2008). در مطالعه‌ی حاضر نیز تغییری در سطح هورومونی تستوسترون مشاهده نمی‌شود که با مطالعات قبلی منطبق است.

سطح آنتی مولرین هورمون در هیچ یک از گروه‌ها 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 سلول‌های زایا به دلیل آسیب اگزوژن و بازگشت تمایز و بلوغ سلول‌های سرتولی باشد. تستوسترون و FSH تنظیم کننده‌ی 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 لوتئیزه کننده (LH)، هورمون محرک فولیکول (FSH) و اینهیبین 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم به فاصله ۲۱ روز باعث تخریب بافت بیضه و ایجاد آزواسپرمی 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 لیدیگ 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 آزواسپرمی در موش سوری و دیگر حیوانات مدل پیشنهاد می گردد.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

تشکر و قدردانی

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

تضاد منافع

نویسندگان تضاد منافعی 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. annd 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;

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

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.

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

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

Panahi M., Karimaghai N., Rahmanifar F., Tamadon A., Vahdati A., Mehrabani D., et al. Stereological evaluation of testes in busulfaninduced 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.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

JOAVM
Journal of Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Research Article

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

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

Arash Payehdar[1*], Ahmad Mozafar[2]

[1]Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
[2]Department 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.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2025-02-01]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2022.5.15.5.1]

**** 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