زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره دوم، زمستان ۹۹، صفحات ۷۳- ۶۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر محافظتی و درمانی بزاق زالو بر پارامترهای اسپرماتوژنز و ترشح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون به دنبال تجویز بوسولفان در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

طیبه صادقی[۱]، سید ابراهیم حسینی[۱*]، محمدامین عدالت منش[۱]، محمد خاکساری[۳]

۱- گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۳- گروه فیزیولوژی وفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

*مسئول مکاتبات: ebrahim.hossini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۹

چکیده

بوسولفان دارویی است که باعث اختلال در عملکرد بیضه می‌گردد. با توجه به اثرات درمانی بزاق زالو در درمان بیماری‌های مختلف، این مطالعه با هدف بررسی اثر بزاق زالو بر پارامترهای اسپرماتوژنز و LH، FSH وتستوسترون به دنبال تجویز بوسولفان در موش‌های صحرایی انجام گردید. از ٦٠ سر موش صحرایی نر بالغ استفاده گردید که به ٤ گروه ۱۵ تایی شامل گروه کنترل (دریافت کننده حلال)، گروه دریافت‌کننده ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم بزاق زالو، گروه دریافت‌کننده ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بوسولفان و گروه تحت تیمار همزمان بوسولفان و بزاق زالو تقسیم شدند. در گروه بوسولفان، تزریق به صورت درون صفاقی دوبار و به فاصله ۲۱ روز تزریق انجام گردید. در گروه بزاق زالو، بزاق زالو، ۳۵ روز بعد از دومین تزریق بوسولفان به مدت ٥٦ روز به صورت زیرجلدی تزریق شد. در گروه بوسولفان همراه با بزاق زالو، ۳۵ روز بعد از دومین تزریق بوسولفان به مدت ٥٦ روز بزاق زالو تجویز گردید. سپس تعداد ۵ موش در هر گروه در روزهای ١٤، ۲۸ و ٥٦ بعد از تزریق، پس از خونگیری جهت سنجش تستوسترون، LH و FSH از بیضه و اپیدیدیم سمت چپ نمونه‌برداری گردید. داده‌ها در سطح $p <$ ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که تیمار با بوسولفان باعث کاهش هورمون‌های تستوسترون و FSH و تعداد، میزان تحریک‌پذیری و تغییرمورفولوژیک اسپرم می‌گردد، در حالی‌که تیمار با بزاق زالو باعث افزایش تستوسترون، FSH، تعداد اسپرم، درصد تحریک پذیری و بهبود ساختار مورفولوژیک اسپرم می‌گردد. بوسولفان با اثر بر سلول‌های ژرمینال وترشحی بیضه باعث تخریب اسپرماتوژنز و کاهش هورمون‌های جنسی می‌گردد درحالی‌که بزاق زالو با اثر محافظتی بر بیضه باعث کاهش اثر بوسولفان بر پارامترهای اسپرماتوژنز و میزان هورمون‌های جنسی در موش‌های دریافت‌کننده بوسولفان می‌گردد.

کلمات کلیدی: بوسولفان، بزاق زالو، اسپرماتوژنز، LH، FSH، تستوسترون.

مقدمه

بوسولفان با نام تجاری Myleran یک داروی الکیله کننده که با اتصال به مولکول‌های DNA مانع همانندسازی آن و در نتیجه مانع تکثیر سلولی می شود (11). سرطان یکی از بیماری های شایع در سراسر جهان است که در بسیاری از موارد برای درمان این بیماری از داروهایی نظیر بوسولفان استفاده می شود (۳۲). مطالعه دیگر ما نشان داده که یکی از عوارض نامطلوب استفاده از بوسولفان ایجاد عارضه

آزواسپرمی و اختلال در روند اسپرماتوژنز وکاهش شدید ضخامت لایه اپی تلیوم زایا در بیضه‌ها می‌باشد (۲۵).

بوسولفان باعث تشدید آپوپتوزیس و کاهش وزن بیضه می‌شود (۲۸). بوسولفان به عنوان یک داروی ضد سرطان بر روی فرایند اسپرماتوژنز دارای اثرات سوء است (۱۰، ١٦). عقیده بر این است که اختلال ایجاده شده در روند اسپرماتوژنز در اثر تیمار با بوسولفان به دلیل خاصیت الکلیه کنندگی آن بر سلول های اسپرماتوگونی می باشد (١٦).

استفاده از داروهای شیمی‌درمانی سبب کاهش تعداد اسپرم با حرکت پیش رونده و افزایش تعداد اسپرم-های بی‌حرکت و با حرکت درجا می‌شود (٦).

درمان با بوسولفان از طریق تخریب سلول‌های زاینده در بیضه ها، باعث به خوردن توازن بین تکثیر و آپوپتوز اپیتلیوم زایا می‌گردد (۷). در طب سنتی از روش های درمانی مختلفی مانند ماساژ، گیاه درمانی، بادکش، حجامت و زالودرمانی استفاده می‌شود (۱۰).

زالودرمانی که به عنوان یکی از روش های درمانی طب سنتی به حساب می‌آید از زمان های قدیم در ایران کاربرد فراوان داشته است (۱۷).

از بین ٦۵۰ گونه زالو در سراسر جهان گونه هیرودو مدیسینالیس بیش از همه در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۱). زالودرمانی دارای ریشه بسیار قدیمی در طب سنتی ایران است که علاوه بر استفاده در اختلالات مختلف،در درمان پرفشاری خون، آنژین صدری و انفارکتوس میوکارد استفاده شده است و دارای اثرات ضدانعقادی است (۱۲).

از زالو درمانی از گذشته های دور در درمان بیماری های مختلفی نظیر اختلالات سیستم های عصبی،اداری و تولیدمثلی، پوستی و التهاب دندان استفاده می شود (۱). نشان داده شده است که هیرودین یکی از ترکیبات موجود در بزاق زالو قادر است جریان خون را بهبود و به گشادی رگ‌های بدن و بهبود سیستم قلبی عروقی کمک کند، به علاوه زالو توانایی درمان گروه متنوعی از بیماری‌ها نظیر زخم معده، کولیت، پروستاتیت، برونشیت، التهابات کبدی و کیسه صفرا، گاستریت، هموروئید، بیماری‌های پوستی، اسپاسم عضلانی، واریس، نازایی، آدنوم پروستات، ناباروری مردان، کاهش میل جنسی، الکلیسم و ترک اعتیاد به مواد مخدر را دارد (۱۹).

با توجه به شیوع بیماری سرطان در سنین مختلف وبه ویژه در کودکان و در افرادی که در سنین باروری قراردارند و با توجه به آن که در بسیاری موارد چاره ای جز استفاده از داروی بوسولفان در درمان این بیماران وجود ندارد و با عنایت به اثرات زیانبار و مخرب این دارو بر سیستم تولیدمثلی که یکی از نگرانی های عمده جامعه پزشکی می‌باشد (۲۱)، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر بزاق زالو بر ساختار بافتی بیضه و پارامترهای اسپرماتوژنز و ترشح هورمون‌های، تستوسترون، LH و FSH در موش‌های صحرایی نر بالغ تحت تیمار با بوسولفان انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ٦۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با سن ۲/۵ تا ۳ ماه و وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. در این بررسی حیوانات در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی گراد و در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه داری شدند. در این پژوهش حیوانات بطور تصادفی به ٤ گروه ۱۵ تایی، شامل گروه کنترل (تیمار با حلال دارو)، و ۳ دسته تجربی تحت تیمار با بزاق زالو، تحت درمان با بوسولفان و تحت تیمار همزمان با بوسولفان به همراه بزاق زالو تقسیم شدند. در این مطالعه به حیوانات گروه بوسولفان،تزریق بوسولفان به صورت درون صفاقی و با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر

کیلوگرم به صورت دوبار تزریق و به فاصله ۲۱ روز انجام شد و حیوانات گروه بزاق زالو نیز بعد از ۳۵ روز بعد از دومین تزریق بوسولفان، به مدت ٥٦ روز تحت تیمار زیر جلدی بزاق زالو با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم قرار گرفتند و حیوانات گروه تجربی تحت تیمار همزمان بوسولفان همراه با بزاق زالو نیز ۳۵ روز بعد از تک دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان، بزاق زالو را با دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم (۲)، بعد از ۳۵روز بعد از دومین تزریق بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ٥٦ روز نیز تحت تیمار زیرجلدی دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم قرار گرفتند. سپس در روزهای ١٤، ۲۸ و ٥٦ بعد از تزریق بزاق زالو، تعداد ۵ سر موش از هرگروه انتخاب و بعد از بی هوش نمودن حیوانات به کمک کتامین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و خونگیری از قلب آنها جهت سنجش میزان سرمی هورمون های تستوسترن، LH و FSH، بیضه سمت چپ و اپیدیدیم حیوانات جهت ارزیابی‌های مورفومتری از بدن جدا گردید. در این بررسی برای تهیه سرم مورد نیاز جهت سنجش میزان سرمی هورمون‌های تستوسترن، LH و FSH، خون به دست آمده در دستگاه سانتریفیوژمدل Eppendorf ساخت کشور آلمان با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سرم تهیه شده تا زمان سنجش هورمونی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. در این مطالعه برای اندازه‌گیری میزان هورمون‌های فوق از روش رادیو امونواسی (RIA) و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اتوماتیک ساخت کشور آلمان و با استفاده از کیت-های هورمونی تولید شرکت آمریکایی Enzo Life استفاده شد. همچنین در این مطالعه جهت شمارش تعداد اسپرم‌ها، بیضه‌های سمت چپ و اپیدیدیم به دقت خارج گردید و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرارداده شدند. تا ضمن تثبیت بافت و تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین نمونه‌ها، توسط میکروسکوپ دوربین دار مدل نیکون ساخت ژاپن و با استفاده از فیلم کونیکا، فوتومیکروگراف‌های مربوط تهیه و سلول‌های جنسی لوله‌های اسپرم‌ساز در مرکز استریولوژی دانشکده علوم پزشکی کرمان با مشاهده مقاطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز با سطح یکسان از طریق پروب یا شبکه صلیبی مورد استفاده جهت شمارش سلول‌ها، تعداد سلول‌های دودمانی جنسی مشخص گردید (۱۵) (شکل ۱).

به علاوه در این بررسی جهت سنجش قابلیت تحرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمانی جهانی بهداشت، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم بر روی لام چمبر منتقل و حرکات اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰* در حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک ۲۰۰ اسپرم برای هر موش بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیشرونده، حرکات درجا و بدون حرکت محاسبه گردید (8) و شمارش اسپرم‌ها نیز بر اساس دستورالعمل ارائه شده از طرف سازمانی جهانی بهداشت انجام شد (۳۳). در این بررسی نمونه های بافتی تهیه شد توسط رنگ های ائوزین-نکروزین تهیه شده از شرکت مرکل المان رنگ‌آمیزی گردیدند و با استفاده از میکروسکوپ نیکون ساخت ژاپن با عدسی ۱۰۰ * ، تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه گردید (۸).

در پایان داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌های این مطالعه نشان داد که تیمار با بوسولفان باعث کاهش معنادار تعداد اسپرم، قدرت تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی سالم و همچنین کاهش میزان سرمی هورمون های تستوسترون و FSH در سطح ۰/۰۵ > p نسبت به گروه کنترل می گردد و بر روی میزان سرمی LH تاثیر معناداری ندارد. هم چنین نتایج نشان داد که تجویز بزاق زالو به تنهایی تاثیر معناداری بر اسپرم،قدرت تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی سالم و هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH ندارد. به علاوه نتایج این بررسی نشان داد که تجویز بزاق زالو به مدت ١٤ و ٢٨ روز در موش‌های تیمار شده با بوسولفان بر تعداد و قدرت تحرک اسپرم و میزان سرمی هورمون تستوسترون تاثیر معناداری نداشته درحالی که باعث افزایش معنادار درصد اسپرم‌های با مورفولوژی سالم و هورمون FSH در سطح ۰/۰۵ p > نسبت به گروه تحت تیمار با بوسولفان به تنهایی می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که تجویز ٥٦ روزه بزاق زالو در موش‌های تیمار شده با بوسولفان باعث افزایش معنادار در تعداد اسپرم، قدرت تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های با مورفولوژی سالم و هورمون‌های تستوسترون و FSH در سطح ۰/۰۵ > p نسبت به گروه تحت تیمار با بوسولفان به تنهایی می‌شود (جداول ١ و ٢ و نمودارهای ١ تا ٦). به علاوه تصاویر بافتی تهیه شده از بیضه‌ها و لوله‌های اسپرم ساز نشان داد که در گروه‌های کنترل و تحت تیمار با بزاق زالو به تنهایی، ساختار بافتی بیضه‌ها و لوله‌های اسپرم در شرایط اسپرماتوژنز طبیعی هستند (اشکال ١ و ٢). همچنین نتایج نشان داد که در حیوانات تحت تیمار با داروی بوسولفان به تنهایی ضمن مشاهده آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، روند اسپرماتوژنز به شدت کند شده است (شکل ٣). از طرف دیگر استفاده توام از تیمار ١٤ روزه بزاق زالو و بوسولفان باعث احیاء غشای بازال کامل و سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه حاصل از تخریب بوسولفان می شود (شکل ١). همچنین نتایج نشان داد که تیما ر ٢٨ روزه بزاق زالو در موش‌های تیمار شده با بوسولفان باعث احیاء روند اسپرماتوژنز کامل و مشاهده لوله-های اسپرم ساز سالم حاوی اسپرماتوزوا می گردد (شکل ٢). همچنین تیمار ٥٦ روزه بزاق زالو در موش‌های تیمار شده با بوسولفان باعث احیاء روند اسپرماتوژنز کامل و مشاهده سلول‌های اسپرماتوگونی با هسته درشت بر روی غشای پایه، اسپرماتیدهای بیضوی شکل، و تعداد زیاد اسپرماتوزوئیدهای با شکل کشیده، دم مشخص و تراکم زیاد در حفره لومن و سلول‌های سرتولی با شکل طبیعی می‌گردد (شکل٣)

جدول ١- مقایسه میانگین مقادیر تغییرات پارامترهای اسپرماتوژنز در گروه‌های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو

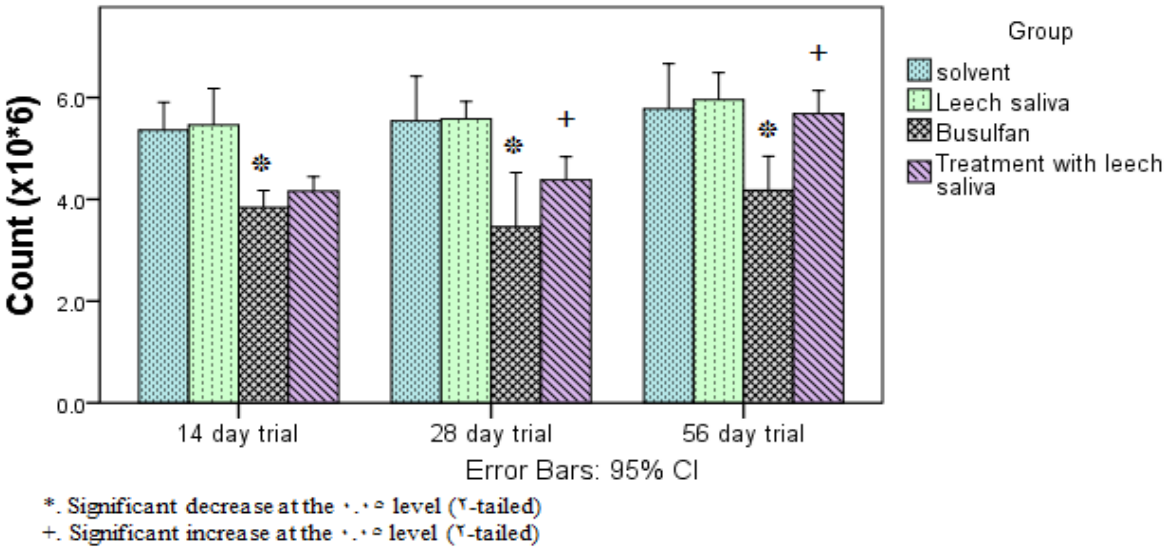
روز	١٤				٢٨				٥٦			
گروه‌ها	S	S+L	S+B	L+B	S	S+L	S+B	L+B	S	S+L	S+B	L+B
تعداد اسپرم ($\times 10^6$)	٥/٣٦^a	٥/٤٦^a	٣/٨٤^b	٤/١٦^{ab}	٥/٥٤^a	٥/٥٨^a	٣/٤٦^b	٤/٣٨^{ab}	٥/٧٨^a	٥/٩٦^a	٤/١٨^b	٥/٦٨^a
تحریک‌پذیری اسپرم(٪)	٦٠/٢^a	٦٠/٦^a	٣٨/٢^b	٤١/٨^b	٦٢/٢^a	٦٢/٦^a	٤٠/٨^b	٤٦/٤^{ab}	٦٣/٤^a	٦٦/٢^a	٥٣^b	٦١/٤^a
مورفولوژی اسپرم (٪)	٩٢/٢^a	٨٨/٢^a	٦٢/٢^b	٨٣/٦^a	٩١/٢^a	٨٨/٨^a	٦٣/٦^b	٨٢/٤^a	٩٠/٢^a	٨٦/٦^a	٧٣/٢^a	٨٣/٨^a

S: گروه کنترل دریافت کننده حلال.S+L :(Leech Saliva) گروه دریافت کننده بزاق زالو. S+B: (Busulfan) گروه دریافت کننده بوسولفان .L+B :(Busulfan+Leech Saliva) گروه دریافت کننده بوسولفان وبزاق زالو. a,b,c : میانگین‌های هر ستون برای هر اثر (اصلی)که حرف مشترک ندارند دارای اختلاف معنی‌داری هستند (۰/۰۵ > p).

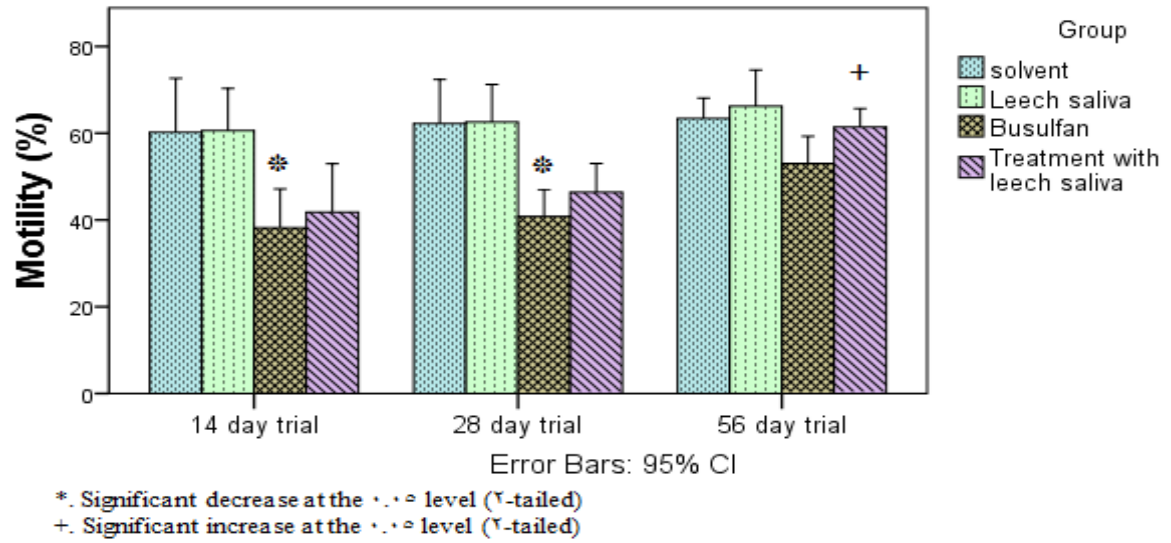
جدول ۲- مقایسه مقادیر تغییرات سرمی هورمون‌های محور هیپوفیز گناد در گروه‌های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو

روز	١٤				٢٨				٥٦			
گروه‌ها	S	S+L	S+B	L+B	S	S+L	S+B	L+B	S	S+L	S+B	L+B
تستوسترون (ng/ml)	٤/٩٤^{a}	٥/١٢^{a}	٣/٨٨^{b}	٣/٩٤^{b}	٤/٨٨^{a}	٥/١٤^{a}	٣/٥٢^{b}	٤/٠٨^{b}	٥/١٢^{a}	٥/٦٦^{a}	٤/٤٨^{b}	٥/٤^{a}
FSH (mlU/ml)	٣/٦٦^{a}	٣/٢٢^{a}	٢/٧٢^{b}	٢/٨٤^{a}	٣/٥^{a}	٣/٥^{a}	٢/١٦^{b}	٣/٢٢^{a}	٣/٥٢^{a}	٣/٦^{a}	٣/١^{a}	٣/٩^{a}
LH (mlU/ml)	٢/٣^{a}	٢/٧٢^{a}	٢/١٨^{a}	١/٨٨^{a}	٢/٤٦^{a}	٢/٥٢^{a}	١/٧٢^{a}	٢/٠٦^{a}	٢/٥٤^{a}	٢/٣^{a}	٢/٢^{a}	٢/٤٤^{a}

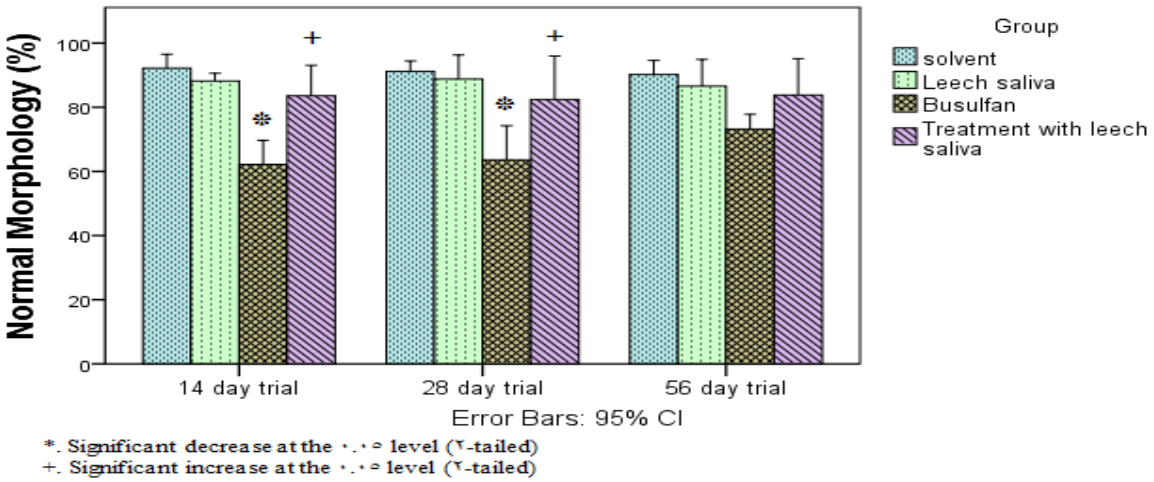
S: گروه کنترل دریافت کننده حلال .S+L : گروه دریافت کننده بزاق زالو. S+B: گروه دریافت‌کننده بوسولفان .L+B: گروه دریافت کننده بوسولفان و بزاق زالو. a,b,c: میانگین‌های هر ستون برای هر اثر (اصلی)که حرف مشترک ندارند دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($p<$ ۰/۰۵).



نمودار ۱- تفاوت میانگین مقادیر تغییرات تعداد اسپرم در گروه های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو

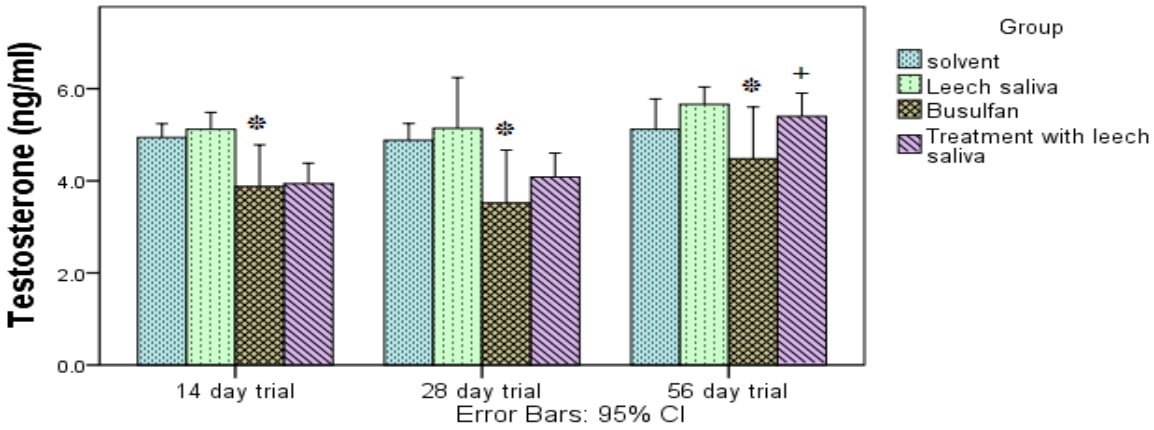


نمودار ۲- تفاوت میانگین مقادیر تغییرات درصد تحریک پذیری اسپرم در گروه های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو



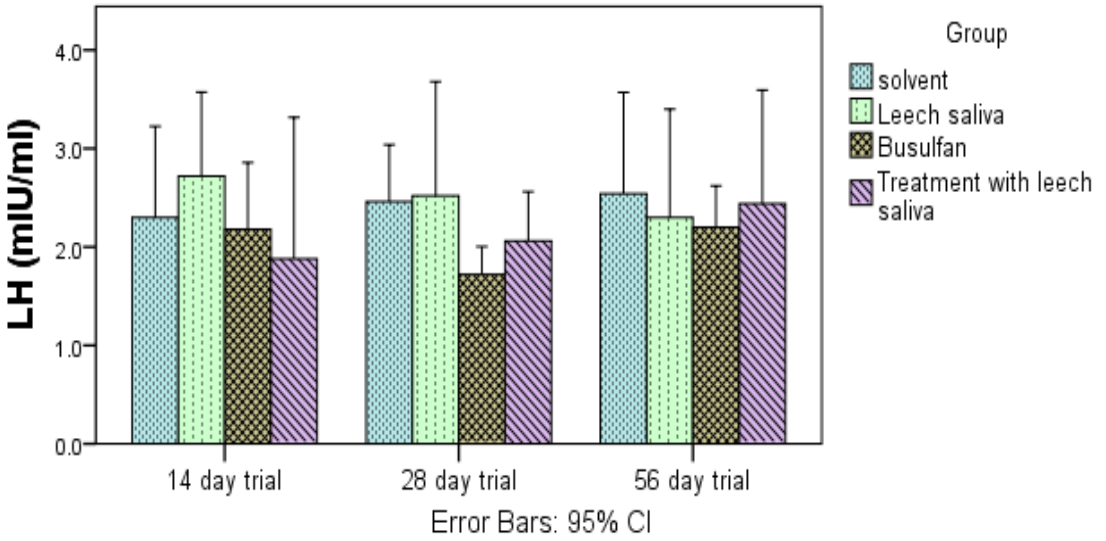
*. Significant decrease at the ۰.۰۵ level (۲-tailed)
+. Significant increase at the ۰.۰۵ level (۲-tailed)

نمودار ۳- تفاوت میانگین مقادیر تغییرات درصد مورفولوژی اسپرم در گروه های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو

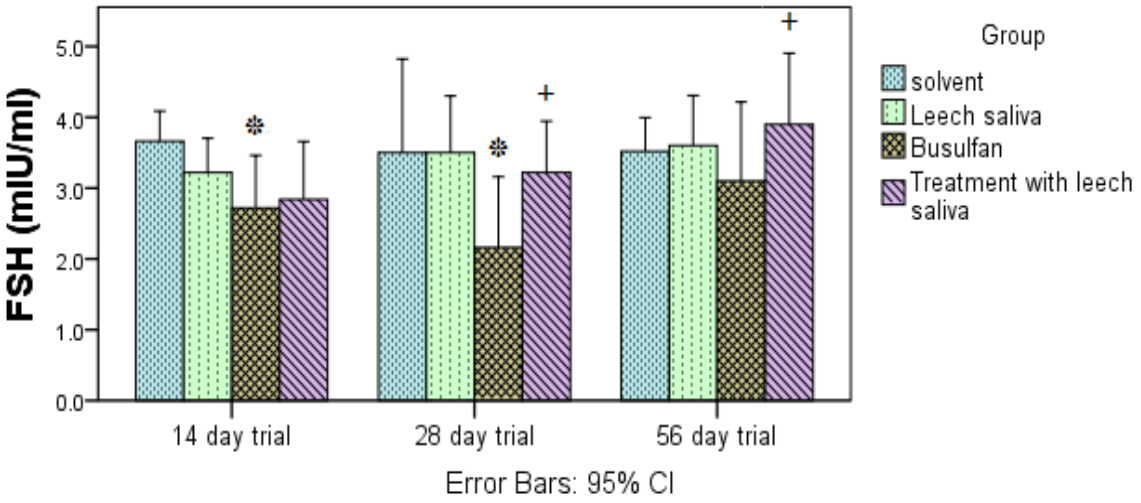


*. Significant decrease at the ۰.۰۵ level (۲-tailed)
+. Significant increase at the ۰.۰۵ level (۲-tailed)

نمودار ٤- تفاوت میانگین مقادیر سرمی هورمون تستوسترون در گروه های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو

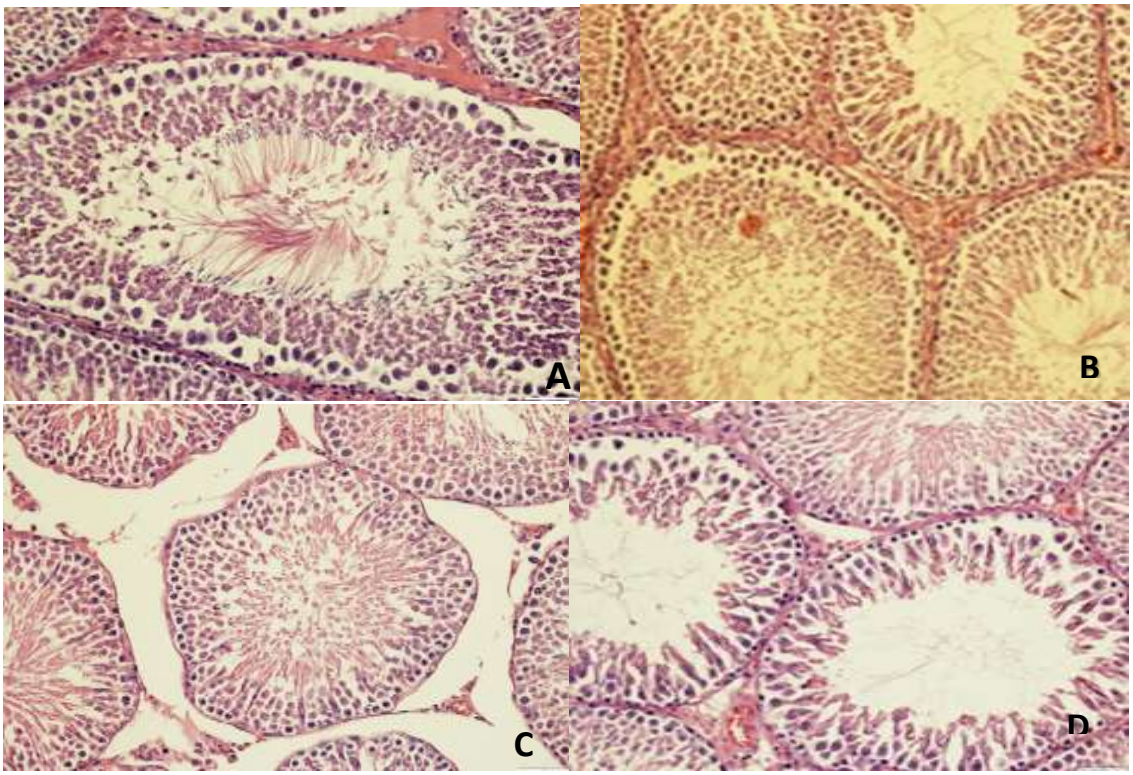


نمودار ۵- تفاوت میانگین مقادیر سرمی هورمون LH در گروه های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو



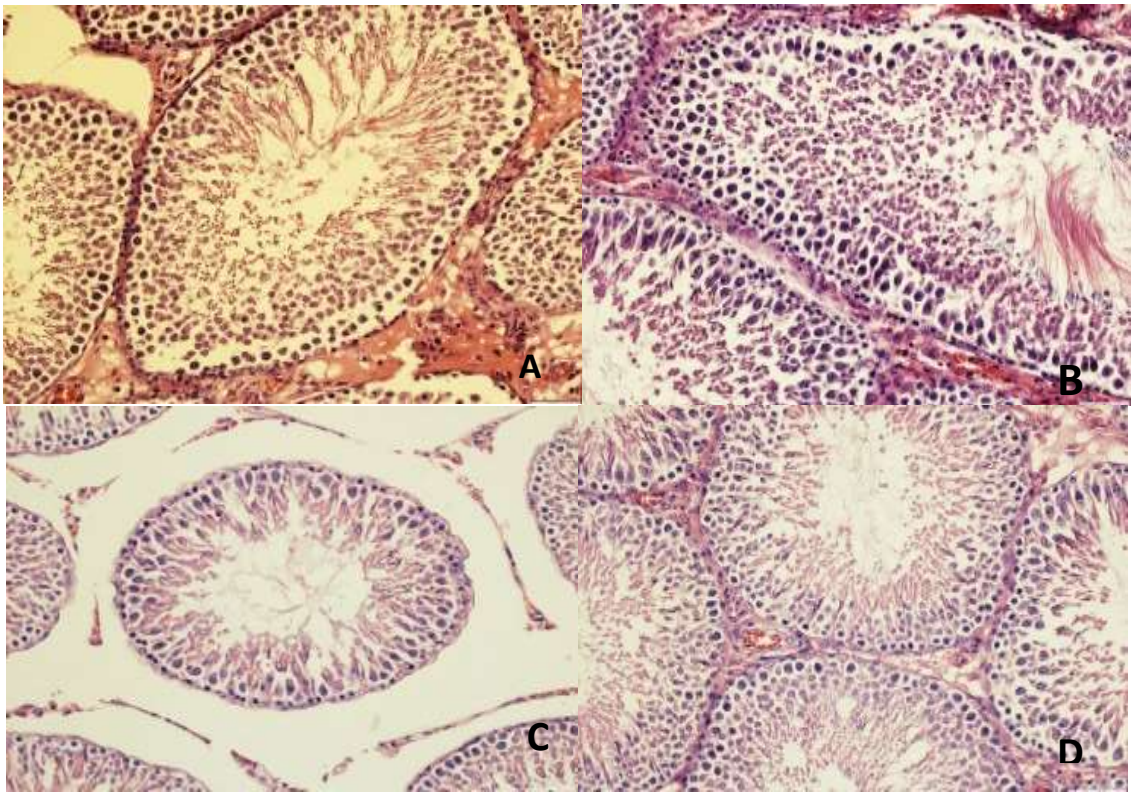
*. Significant decrease at the ۰.۰۵ level (۲-tailed)
+. Significant increase at the ۰.۰۵ level (۲-tailed)

نمودار ٦- تفاوت میانگین مقادیر سرمی هورمون FSH در گروه‌های مورد مطالعه پس از تیمار با بزاق زالو



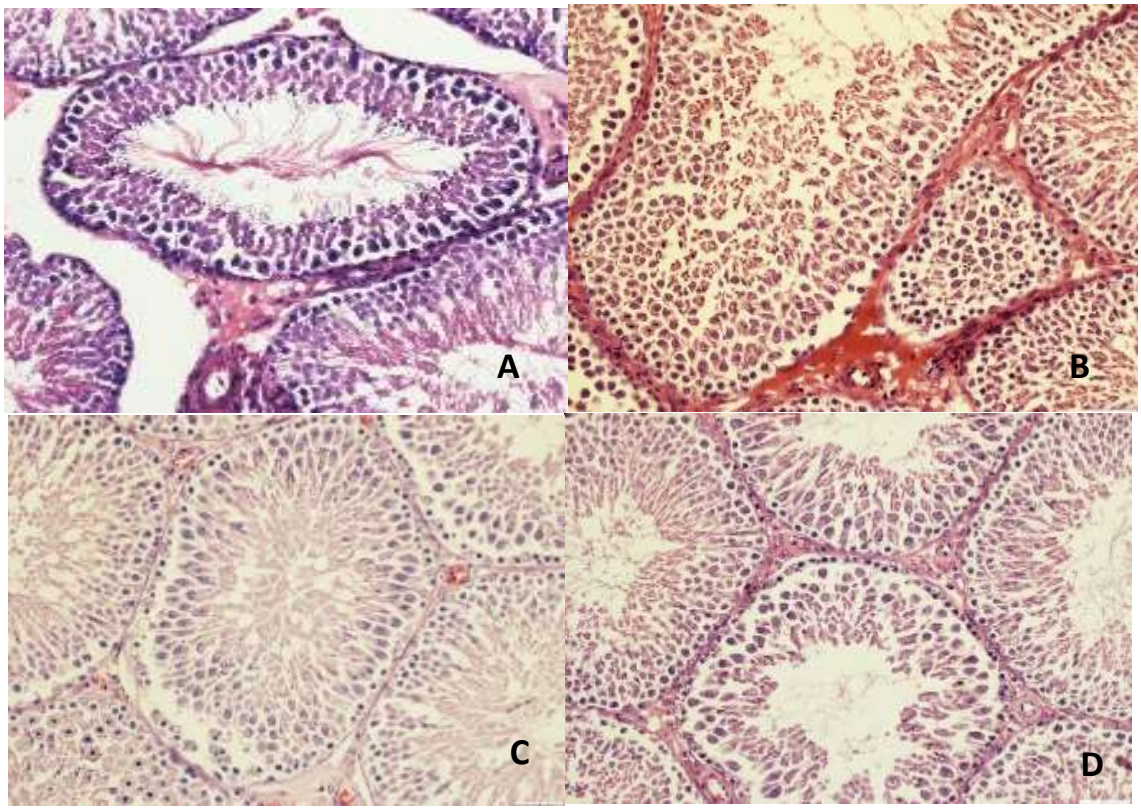
شکل ۱- فتومیکروگراف لوله‌های منی ساز روز ١٤ آزمایش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(100x)

A) تیمارکنترل، B) تیمار بزاق زالو، C) تیمار بوسولفان، D) تیمار بوسولفان+ بزاق زالو



شکل ۲- فتومیکروگراف لوله‌های منی ساز روز ۲۸ آزمایش با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(100x)

A) تیمارکنترل، B) تیمار بزاق زالو، C) تیمار بوسولفان، D) تیمار بوسولفان+ بزاق زالو.



شکل ۳- فتومیکروگراف لوله‌های منی ساز روز ٥٦ آزمایش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (100x)
A) تیمارکنترل، B) تیمار بزاق زالو، C) تیمار بوسولفان، D) تیمار بوسولفان+ بزاق زالو

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که داروی بوسولفان باعث آسیب به ساختار بافتی بیضه و کاهش شدید سلول-های جنسی و هورمون‌های تستوسترون و FSH می-شود در حالی که تیمار با بزاق زالو باعث بهبود ساختار بافتی بیضه و افزایش سلول‌های جنسی و هورمون‌های تستوسترون و FSH در حیوانات تحت تیمار با بوسولفان می‌گردد. نشان داده شده است که بوسولفان با تغییر در بیان ژن ویمنتین باعث تخریب اسکلت سلولی سلول‌های سروتولی و همزمان باعث تشدید آپوپتوز در سلول‌های اپیتلیوم زاینده در دیواره لوله های سمی نیفر بیضه‌ها می‌شود (۱۳، ۱۸).

با توجه به آن که داروی بوسولفان به عنوان یک داروی الکیله کننده به مولکول های DNA متصل می‌شود و با شکسته شدن آن مانع تکثیر سلولی می-گردد (۱۱)، بنابراین کاهش شدید سلول‌های جنسی در نتیجه تیمار با بوسولفان قابل پیش‌بینی است. بوسولفان از طریق ایجاد پیوندهای عرضی DNA- DNA و DNA–پروتئین و شکسته شدن رشته‌های منفرد باعث از بین رفتن رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوگونی و هم چنین به دلیل از بین بردن توازن میان تکثیر و آپوپتوز اپیتلیوم زاینده و با تخریب این اپیتلیوم باعث کاهش شدید سلول‌های جنسی می‌شود (۷، ٣٤).

بوسولفان از طریق تحریک شدید فرایند آپوپتوزیس در بیضه و الکیلاسیون سلول‌های اسپرماتوگونی و همچنین از طریق تخریب ساختار بافتی بیضه باعث کاهش شدید سلول های جنسی می‌شود (۷، ١٦).

مطالعات حیوانی در حیواناتی نظیر موش و همستر نشان داده است که بوسولفان با از بین بردن اپیتلیوم

زاینده باعث تخریب روند اسپرماتوژنز در این حیوانات می‌شود (٢٤).

همسو با نتایج مطالعه حاضر در یک بررسی دیگر نشان داده شد که بوسولفان علاوه برکاهش شدید در تعداد سلول‌های اسپرم، باعث کاهش تعداد اسپرم‌های با قدرت حرکت رو به جلو و سالم از نظر مورفولوژیک می‌شود (٥).

بوسولفان از طریق تاثیر بر سلول‌های ژرمینال و سوماتیک موجود در بیضه می‌تواند باعث تخریب روند اسپرماتوژنز و کاهش پارامترهای بیضه شود به طوریکه با افزایش میزان مصرف اثرات مخرب آن نیز افزایش می‌یابد (١٤). همچنین با توجه به کاهش میزان سرمی هورمون‌های تستوسترون و FSH و با عنایت به حساسیت زیاد سلول‌های اسپرماتوژنیک بیضه به این هورمون‌ها تغییرات ریخت‌شناسی سلول-های اسپرم و کاهش شدید این سلول‌ها را می‌توان ناشی از کاهش هورمون‌های مذکور دانست (٦، ٢٦).

کاهش در قدرت تحرک سلول‌های اسپرماتوزوئید در حیوانات تحت تیمار با بوسولفان در مطالعه حاضر را با توجه به وجود رسپتورهای آندروژنیک در سلول-های اسپرم را می‌توان به اثرات سمی این داروبر روی تاژک و میتوکندری های این سلول‌ها که موتور تامین انرژی برای حرکات اسپرماتوزوئید می‌باشند نسبت داد (٨، ٢٠). با توجه به نتایج حاصل از یک بررسی علت کاهش تعداد سلول‌ها و هورمون‌های جنسی در مطالعه حاضر را می‌توان به اثرات ثانویه بوسولفان بر عملکرد محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گوناد و یا تاثیر آن بر سلول های سوماتیک بیضه نسبت داد (٢٩).

بر خلاف نتایج حاصل از این مطالعه در یک بررسی دیگر نشان داده شد که بوسولفان باعث افزایش میزان سرمی هورمون های گونادوتروپین می شود (٢٢).

یافته‌ها حاکی از آن است که هورمون FSH اثرات مستقیمی بر تولید سلول‌های اسپرماتوسیت دارد و با افزایش و کاهش ترشح این هورمون تعداد این سلول-ها نیز کم و یا زیاد می‌شود (٣٤). بنابراین در مطالعه حاضر با کاهش میزان این هورمون در حیوانات تحت تیمار با بوسولفان سلول‌های جنسی کاهش و با توجه به اثر بزاق زالو در افزایش این هورمون تعداد این سلول‌ها هم افزایش یافته است. در اثر شکستن مولکول DNA نسخه برداری صورت نمی‌گیرد و در نتیجه سنتز پروتئین های مختلف از جمله هورمون-های FSH، LH و GnRH نیز با توجه به ساختار شیمیایی آنها که پروتئینی (پلی‌پپتیدی) است کاهش می یابد. از طرف دیگر بر اساس تخریب‌های به وجود آمده روند طبیعی فیدبکی محور هیپوتالاموس – هیپوفیز–گنادها که مسیر اصلی ترشح هورمون‌های جنسی نیز می‌باشد دچار اختلال گشته و همین امر باعث کاهش ترشح دو هورمون تستسترون و FSH خواهد شد که نهایتاً منجر به کاهش بازدهی فرآیند اسپرماتوژنز می‌شود. نتیجه این تحقیق در ارتباط با استفاده از بوسولفان با نتایج رضایی و همکاران (١٣٩٤) مشابه است (٢٧).

کاهش در قدرت تحرک اسپرم در حیوانات تحت تیمار با بوسولفان در مطالعه حاضر را احتمالا می‌توان به اثرات سمی این دارو بر روی تاژک این سلول‌ها نسبت داد. در یک بررسی نشان داده شد که اثرات تخریبی بوسولفان بر روند اسپرماتوژنز به دلیل تغییراتی است که در سلول‌های سرتولی و بیان ژن ویمنیتین در این سلول‌ها ایجاد می شود می‌باشد (١٨).

لذا با عنایت به اینکه در رت‌ها رشته‌های ویمنتین موجود در سلول‌های سرتولی نقش مهمی در نگهداری اسپرماتوژنز و سلول‌های لوله سمی نیفروس دارند و هرگونه تغییر در بیان پروتئین ویمنیتین با اختلالات و تخریب اسپرماتوژنز همراه است، بنابراین در مطالعه حاضر نیز احتمالا اثرات تخریبی بوسولفان

را می توان به تاثیر آن بر بیان ژن ویمنتین نسبت داد. با توجه به نقش بزاق زالو در تحریک غده هیپوفیز قدامی و سلولهای لیدیگ و افزایش هورمون‌های تستوسترون و FSH و همچنین تحریک سلول‌های سرتولی که تماما در احیای اسپرماتوژنز دارای نقش کلیدی می‌باشند لذا بهبود روند اسپرماتوژنز را موش-هایی که بعد از مصرف بوسولفان تحت تیمار با بزاق زالو قرار گرفته اند را می‌توان به این عوامل نسبت داد که البته نیاز به بررسی و تحقیق بیشتر جهت شناخت مکانیزم های مرتبط با آن دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان بیان داشت که مصرف داروی بوسولفان می‌تواند موجب کاهش عملکردی پارامترهای اسپرماتوژنز، کاهش میزان سرمی هورمون‌های تستوسترون و FSH شود. در حالی که تجویز بزاق زالو می‌تواند باعث بهبود اثرات مخرب بوسولفان بر عملکرد پارامترهای اسپرماتوژنز و میزان سرمی هورمون‌های فوق گردد.

منابع

1. Abdualkader AM, Ghawi A M, Alaama M, Awang M, Merzouk A. 2013. Leech therapeutic application. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2): 127-137.

2. Abdualkader A.M., Ghawi A.M., Alaama M., Awang M., Merzouk A. 2013. In vivo anti-hyperglycemic activity of saliva extract from thetropical leech *Hirudinaria manillensis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(5): 0488−0493

3. Ballester J., Dominguez J., Munoz M.C., Sensat M., Rigau T. 2005. Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin- diabetic rats. *Journal of Andrology*, 26(6):706-15.

4. Baazm M., Darabi M.R., Babaie S., Talebi R. 2014. Improvement in Sperm Parameters with Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue in Busulfan Treated Prepubertal Mice. *Journal of Arak University Medical Sciences*, 16(10) :11-18

5. Benton L., Shan L.X., Hardy M.P. 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1-6):61-8.

6. Chatterjee R, Mills W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone AH. 2001. Germ cell failure and Leydig cell insufficiency in post-pubertal males after autologous bone marrow transplantation with BEAM for lymphoma. bone marrow transplantation, 13: 519-22.

7. Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, et al. 2004. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL-and p53-independent manner. Federation of European Biochemical Societies, 575(1-3): 41–51.

8. Farzaneh Dehghani,Narges Sotoude ,Hossein Bordbar , M R Panjeshahin ,The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan,. *Journal* Platelets, 2019;30(4):513-520.

9. Ghaedi F., Dehghan M., Salari M., Sheikhrabori A. 2017. Complementary and Alternative Medicines: Usage and Its Determinant Factors Among Outpatients in Southeast of Iran. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine , 22(2): 210-215

10. Grigg A.P., McLachlan R., Zaja J., Szer J. 2000. Reproductive status in long-term bone marrow transplant survivors receiving busulfan-cyclophosphamide (120mg/kg), *Bone Marrow Transplant*, 26(10): 1089-95

11. Gudeloglu A., Parekattil S.J. 2013. Update in the evaluation of the azoospermic male. *Clinics*, 68(Suppl 1): 27-34.

malfunctions. *Journal of Pineal Research*, 38: 1-9.

21. Meistrich M.L. 2013. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertility and Sterility*, 100(5): 1180-1186

22. O' Donell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R. 2001. Estrogen and spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 22(3): 289- 318

23. O'Shaughnessy P.J., Monteiro A., Verhoeven G., De Gendt K., Abel M.H. 2010. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors, Journals of Reproduction and Fertility, 139(1): 177-184.

24. Panahi M., Keshavarz S., Rahmanifar F., Tamadon A., Mehrabani D., Karimaghai N., Sepehrimanesh M, and Aqababa H . 2015. Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. *Veterinary Research Forum*, 6(4): 273-278.

25. Payehdar A, Hosseini E, Mehrabani D, Forouzanfar M. 2017. Healing Effect of Conditioned Medium of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Histomorphometric Changes of Mice Testis in Busulfan Induced-Azoospermia Model. *Horizons Medical Marijuana Life Sciences*, 23(3): 235-240

26. Ramanathan B., Archunan G. 2001. Analysis of epididymal proteins during sexual maturation in male albino mice. *Acta Physiologica Hungarica*,88:73-80

27- Rezaei K., Aghababa H., Sadeghi L. 2015.The effect of walnut oil on sperm parameters in busulfan-treated rats. Pars Journal of Medical Sciences. 13(1): 1-6

28-Sophie Fouchécourt, Jean-Jacques Lareyre, Pierre Chaurand, Beverly B. DaGue, Kichiya Suzuki, David E. Ong, Gary E. Olson, Robert J. Matusik, Richard

12. Haidari Mahmoud Reza, Somayeh Valipour Dehkordi. 2016. Hirudo Medicinalis in coagulopathies and cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 5(2): 54-65.

13. He D., Zhang D., Wei G., Lin T., Li X. 2007. Cytoskeleton vimentin disruption of mouse sertoli cells injured by nitrogen mustard in vitro. *Journal of Andrology*, 28(3):389-96.

14. Homafar M.A., Soleimanirad J., Ghanbari A.A. 2006. A morphologic and morphometric study of adult mouse testis following different doses of busulfan administration. *Journal of Reproduction and Infertility*, 7(1): 25-36.

15. Hosseini S., Bastampoor F., Sadeghi H. 2014. Effect of hydro-alcoholic extract of parsley *(Petroselinum crispum*) leaf on the testicle tissue and sexual dynastic cells of adult male rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 16(9): 36-42.

16. Jansz G.F., Pomerantz D.K. 1985. The effect of prenatal treatment with busulfan on in vitro androgenproduction by testes from rats of various ages. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 63(9): 1155-8.

17. Kalender M.E., Comez G., Sevinc A., Dirier A., Camci C. 2010. Leech therapy for symptomatic relief of cancer pain. *Pain Medicine*, 11(3): 443-445.

18. Kopcky M., Semecky V., Nachtigal P. 2005. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochem*, 107(4): 279-289.

19. Kumura T., Hino M., Yamane T., Tatsumi N. 2000. Hirudin as an anticoagulant for both haematology and chemistry tests. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 22 (4): 109–112.

20. León J., Acuña-Castroviejo D., Escames G., Tan D.X., Reiter R.J. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial

M. Caprioli,. 2003. Identification, immunolocalization, regulation, and postnatal development of the lipocalin EP17]epididymal protein of 17kilodaltons in the mouse and rat epididymis. Endocrinology, 144: 887-900

29-Shetty G., Meistrich M.L. 2005. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. Journal of the National Cancer Institute, 34: 36-39.

30- Siril Ariyaratne H.B., Ian Mason J., ،MendisHandagama S.M. 2000. Effects of thyroid and luteinizing hormones on the onset of precursor cell differentiation into leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis. Reproductive Biology, 63(3): 898-904.

31. Sobczak N, Kantyka M. 2014. Hirudotherapy in veterinary medicine. Annals of Parasitology, *60*(2):89-92.

32. Vassilakopoulou M, Boostandoost E, Papaxoinis G, de La Motte Rouge T, Khayat D, Psyrri A. 2016. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 97(1): 328-34.

33. World Health Organization (WHO). 1999. laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press.

34. Zahkook SAM, Atwa A, Shahat MM, Mansour AM,Bakry S. 2014. Mesenchymal stem cells restore fertility in induced azoospermic rats following chemotherapy administration. Journal of Reproduction & Infertility, 5(2):50-7