بررسی اثرات محافظتی ملاتونین روی تغییرات هیستولوژیک روند اسپرماتوژنز در موش صحرایی تحت درمان با جمسیتابین

افسانه فضیلی[1*]، ایرج پوستی[2]، پژمان مرتضوی[3]، نگار پناهی[4]، سعید بکائی[5]، میترا آقازاده[6]

چکیده

اثرات سیتوتوکسیک شیمی درمانی و اشعه درمانی با تغییرات زیادی در دستگاه تناسلی مردان همراه است. ملاتونین یکی از ترشحات غده پی فیز بوده که به عنوان آنتی اکسیدان شناخته شده است.

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات محافظتی ملاتونین روی اختلالات اسپرماتوژنز ناشی از درمان با جمسیتابین به کمک ارزیابی های بافت شناسی بیضه می باشد.

مطالعه حاضر برروی ٤٨ سر موش نر بالغ ٨ هفته انجام شد حیوانات در ٦ گروه شامل گروه کنترل دریافت کننده نرمال سالین، گروه ٢ و ٣ به ترتیب دریافت کننده ٢٠mg/kg و ١٠ ملاتونین و گروه ٤، دریافت کننده تک دوز ٥٠mg/kg جمسیتابین به صورت داخل صفاقی و گروه ٥ و ٦ به دنبال تجویز ٥٠ mg/kg جمسیتابین به مدت ١٤ روز ملاتونین ٢٠ mg/kg و ١٠ دریافت می کرد، ١٤ روز پس از شروع درمان بیضه همه حیوانات جدا شد و پس ازفیکس کردن در فرمالین بافر ١٠٪ و تهیه اسلایدهای هیستولوژی ارزیابی ها از طریق مطالعات لوله‌های سمی نیفروس و شمارش سلول‌های زایا و سوماتیک انجام گرفت. آنالیزهای آماری با کمک روش ناپارامتری کروسکال والیس انجام گرفت و سطح آماری P<0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

موش‌های تحت درمان با جمسیتابین در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی داری در ارزیابی ها و کیفیت اسپرماتوژنز نشان دادند (p<0.01) . پارامترهای کمی لوله‌های سمی نیفروس در گروه چهارم در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (p<0.01). در حالی که ملاتونین در گروه ٦، باعث طبیعی شدن قابل توجه پارامترهای لوله‌های سمی نیفروس (p<0.05) در مقایسه با گروه ٤ شد. ملاتونین، تعداد همه سلول‌های زایا و سوماتیک را در گروه ٦ و ٣ در مقایسه با گروه ٤ به صورت معنی دار (p<0.05) افزایش داد

(افزایش کیفیت اسپرماتوژنز) و در گروه ٦ منجر به خنثی نمودن عوارض ناشی از جمسیتابین شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ملاتونین دارای اثر محافظتی روی آسیب‌های بیضه القاء شده با جمسیتابین است هر چند که مکانیسم نامشخص است، احتمالاً این عمل از طریق کاهش آسیبهای اکسیداتیو صورت می‌گیرد.

واژگان کلیدی: *اسپرماتوژنز، جمسیتابین، بیضه، شیمی درمانی، ملاتونین*

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/٤/۱۲

مقدمه

باروری یک اسپرم به پارامترهای مختلفی نظیر تعداد، تحرک و مورفولوژی آن بستگی دارد که عوامل متعددی بر آن اثر می‌گذارد. رادیکال‌های آزاد از جمله این عوامل به شمار می‌آیند. شیمی درمانی و اشعه درمانی با تغییرات زیادی در دستگاه تناسلی مردان همراه است و در بین این عوامل داروهای با خاصیت آلکیله کنندگی بیشترین اثرات سوء را روی بیضه ایجاد می‌کند(٨).

امروزه به خصوص در کشورهای پیشرفته درمان موفق بدخیمی‌ها و امید به زندگی در این افراد به میزان بالایی افزایش یافته است و عمده این افراد به ویژه افراد جوان پس از بهبودی تمایل به داشتن قدرت باروری و فرزند هستند(16).

١*- دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
af.fazili@yahoo.com
٢- گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
٣- گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
٤- گروه فارماکولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران
٥- گروه اپیدمیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
٦- دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

اثـرات سیتوتوکـسیک شـیمی درمـانی و اثـرات آن در قـدرت باروری از نظر بالینی حائز اهمیت است (17).

از جمله عوامل شیمی درمانی آلکیله کننده می‌تـوان جمـسیتابین را نام برد که یکی از موثرترین داروهای ضدسرطان است کـه از آن در درمان انـواع تومورهـای بـدخیم از قبیـل: سـرطان ریـه، سرطان آدنو کارسینومای متاستاز یافته پانکراس، سـرطان مثانـه، سرطان پیشرفته پستان کاربرد دارد (۱).

بیشتر مطالعات در مـورد اثـرات سیتوتوکـسیک جمـسیتابین بـر بیضه، به طـور عمـده روی مـدل‌هـای جونـدگان ماننـد مـوش صحرایی بوده است. در مقاله‌ای که بـه بررسـی اثـرات سـمی جمسیتابین بر ساختار هیستولوژیک بیضه موش صورت گرفت، تداخل در پیدایش اسپرم ؛ که مرتبط با اسپرماتوسیتهای انحرافی بود؛ اسپرماتوزوا و کاهش تعداد آنها مشهود بود (١٤).

در بررسی جنینهای ١٤ روزه ای که والد نر قبل از جفت گیـری تحت اثر جمسیتابین قرار گرفته بود. این جنین‌ها در ارگان‌هـای، کبد، کلیه ،روده کوچک؛ طحال ؛ بیضه ساختار ناقص نشان داده بودند. همچنین این دارو باعث کـاهش قـدرت زایـشی و بقـاء جنین‌ها شده است (۱).

مطالعات گذشته ثابت کرده اند که این دارو احتمـالاً بـه علّـت مجزا نمودن DNA باعث آپوپتوزیس سلول‌های سرطان لنفاوی می‌گردد (۹).

ملاتونین که یکی از ترشحات غده اپیفیزاست در تنظـیم برخـی پدیده‌های فیزیولوژی و هورمون‌های دیگر در بدن نقش مهمـی را ایفا می‌کند. ملاتـونین دارای عملکـرد نـورونی ــ هورمـونی، تنظیم کننده تولید مثل، ایمنی و دما است علاوه بـر ایـن مـوارد ملاتونین روی تکثیر و تزاید و تمایز سلولی اثر دارد (16).

ملاتونین در درمان و پیـشگیری بعـضی سـرطان‌هـا مخـصوصاً آنهایی که وابسته به هورمون هستند نقش دارد. ایـن مـاده تـأثیر مثبت داروهای ضدسرطان را افزایش داده و عوارض جانبی آنها را کمتر می‌کند و همچنین اثـرات ضـدپیری آن گـزارش شـده است(۱۰).

ملاتونین امکان برداشت و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد شـامل رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و آنیون‌های پراکسی نیتـرات را دارا می‌باشد (۱۵). مصرف ملاتـونین در مـوش‌هـای بـزرگ آزمایشگاهی سلول‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظـت می‌نماید و در واقع استرس‌های اکـسیدان را بـه طـرق متعـددی کاهش می‌دهد (19). ضمن این که نشان داده شده که ملاتـونین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی ضعیفی روی اسپرم انـسان اسـت (٤).گیرنده‌هـای ملاتـونین روی بافـت‌هـای مختلـف از جملـه پروستات، سلول‌های پوششی اپیدیدیم و بـه میـزان کمـی روی اسپرم بیـان مـی‌شـود(٦).همچنـین تجـویز ملاتـونین در انـسان آسیب‌های وارده به میتوکندری‌های اسپرم بـه دنبـال راکتیوهـای اکسیژن را کاهش می‌دهد(۵). تجویز یـک دوز بـالا ۱۰۰mg/kg ملاتونین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در معـرض اشـعه x مانع ایجاد آسیب‌های حاد در بیضه آنها می‌شود (۱۰).

ملاتونین به دلیل داشتن قطر کوچک و خاصیت چربی دوسـتی زیاد؛ به راحتی از غشاء سلول عبور کرده و در کل سلول پخش می‌شود. غلظت آن در هسته بالاست و DNA را در برابر عوامل مخرب حفظ می‌نماید (٤).

مطالعات نشان داد که تجویز ملاتونین در مـوش‌هـای دیابتیـک تحت درمان با استروپتوزوتوسین و موش‌های تحـت درمـان بـا سیس پلاتین و بوسولفان باعث کاهش عوارض جانبی داروهای نامبرده روی بیضه می‌شـود (۱۲ و۳). Reiter معتقـد اسـت کـه ملاتونین می‌تواند سمیت و عـوارض جـانبی داروهـا را کـاهش دهد (١٤).

همچنـین مطالعـات نـشان داده کـه ملاتـونین فعالیـت آنتـی اکسیدانی قدرتمندی داشـته و رادیکالهـای آزاد را شـدیداً نـابود می‌سازد(١٤).

هـدف از مطالعـه حاضـر، ارزیـابی اثـرات محـافظتی احتمـالی ملاتونین روی تغییرات هیستولوژیک اسپرماتوژنز درمـوش‌هـای تحت درمان با داروی جمسیتابین می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از ٤٨ سر موش نر بالغ ٨-٦ هفته، نژاد Wistar استفاده گردید. به منظور هماهنگی با محیط، حیوانات در قفس های خود در شرایط محیطی استاندارد و با دسترسی آزادانه به آب و غذا دو هفته نگهداری شدند. سپس حیوانات به ٦ گروه (هر گروه شامل ٨ حیوان) تقسیم شدند.

١- گروه کنترل: این گروه تک دوز نرمال سالین به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

٢- گروه تحت درمان با ملاتونین: که به مدت چهارده روز، روزانه ١٠mg/kg ملاتونین (sigma, USA) به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. جهت حلالیت ملاتونین مطابق Lakind (١١) از پروپیلن گلیکول استفاده می شد.

٣- گروه تحت درمان با ملاتونین: ملاتونین به مقدار ٢٠mg/kg تزریق داخل صفاقی گردید.

٤- گروه تحت درمان با جمسیتابین: به میزان ٥٠mg/kg جمسیتابین به صورت داخل صفاقی و تک دوز دریافت نمودند.

٥- گروه تحت درمان ترکیبی: ابتدا تک دوز ٥٠mg/kg جمسیتابین دریافت می کردند و پس از آن به مدت چهارده روز، روزانه ١٠mg/kg ملاتونین دریافت نمودند.

٦- گروه تحت درمان ترکیبی: ابتدا تک دوز ٥٠mg/kg جمسیتابین دریافت می‌کردند و پس از آن به مدت چهارده روز، روزانه ٢٠mg/kg ملاتونین دریافت نمودند. چهارده روز پس از شروع درمان همهٔ حیوانات را بیهوش و بیضه آنها جدا گردید. به منظور ثبوت بافتی، نمونه ها به داخل محلول فیکساتور فرمالین بافر ١٠٪ به مدت ٧٢ ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و غوطه ور شدند.

ارزیابی لوله‌های سمی نیفروس

پس از گذشت سه روز از ثابت نمودن و اطمینان از ثبوت بافتی، نمونه‌ها به منظور مطالعه با میکروسکوپ نوری پاساژ یافتند. جهت پاساژ از اتانول با درجات صعودی، زایلن و پارافین مذاب استفاده شد. برای به حداکثر رساندن تعداد برش‌های مناسب لوله‌های سمی نیفروس در مقطع عرضی، نمونه‌ها در جهت محور طولی در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Ziss, Germany) مقاطعی به ضخامت ٥μ تهیه شد. از هر بیضه ٤ تا ٥ اسلاید در قسمت‌های مختلف تهیه و به طریقه هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olampus, Japan) و با درشت‌نمایی ٤٠٠× مورد مطالعه قرار گرفتند.

ارزیابی کمی پارامترهای لوله سمی نیفروس

جهت ارزیابی کمی پارامترهای لوله سمی نیفروس، از گریدهای مدرج سطحی بر لنز چشمی میکروسکوپ استفاده شد.

در هر حیوان به طور تصادفی ٢٠ لوله سمی نیفروس در مقطع عرضی از برش های متفاوت و تقریباً گرد انتخاب و مطالعه شد. لوله‌هایی با برش بیضی مورد مطالعه قرار نگرفتند.

شمارش سلول‌های زایا

بر اساس ریخت‌شناسی، سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزا ٢٠ لوله سمی نیفروس در هر حیوان شمارش شد. فقط لوله‌های گرد مورد شمارش قرار گرفتند و لوله‌هایی که مایل و یا بیضوی بودند ویا حاوی سلول‌های ریزش یافته به داخل لومن لوله بودند مورد شمارش سلولی قرار نگرفتند.

آنالیز آماری: نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه و بلوغ اسپرماتوژنز و همچنین کلیه پارامترهای کمی با محاسبه شده با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تحلیل شدند.

یافته‌ها به صورت میانگین درصد و انحراف معیار بیان و مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گشت.

همچنین برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ٩٥٪ بصورت error bar نشان داده شده است.

نتایج

در مطالعات بافت شناسی در گروه کنترل، اسپرماتوژنز فعال در لوله‌های سمی نیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد.

در این لوله‌ها اپیتلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود و انواع سلول‌های اسپرماتوژنیک شامل اسپرماتوگونیوم، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید به اندازه‌های مختلف و اسپرماتوزوئید و همچنین سلول‌های سرتولی با هسته‌های بسیار روشن و هستک مشخص و سیتوپلاسمی محو در بین سلول‌های اسپرماتوژنیک مشاهده شدند.

همچنین در بافت بینابینی تجمعی از سلول‌های لیدیک که در فصل مشترک لوله‌ها فراوان‌ترند، بهمراه عروق خونی و بافت همبندی مشاهده می‌شوند (نگاره ۱).

در گروه تحت درمان با ۵۰mg/kg جمسیتابین، تخریب اسپرماتوژنز به وضوح قابل مشاهده است.

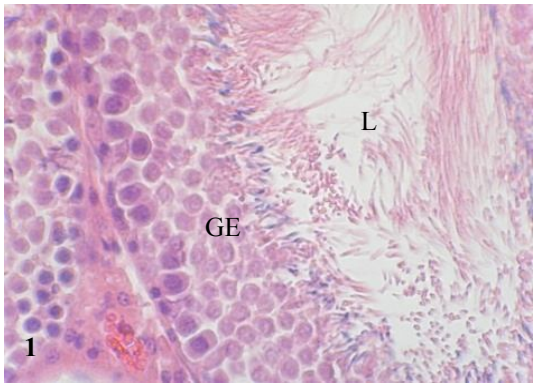
در اغلب لوله‌ها تعداد زیادی از سلول‌های اسپرماتوژنیک از بین رفته بودند و ضخامت لوله‌ها می‌تواند این کاهش سلولی را نشان دهد بدین معنی که سلول‌های زایا با مقایسه گروه کنترل به صورت معنی داری کاهش داشت ($P<0.01$).

بیشترین تأثیر جمسیتابین بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی با ۲۲٪ کاهش و کمترین اثر بر روی سلول‌های اسپرماتید با ٤٪ کاهش بوده است.

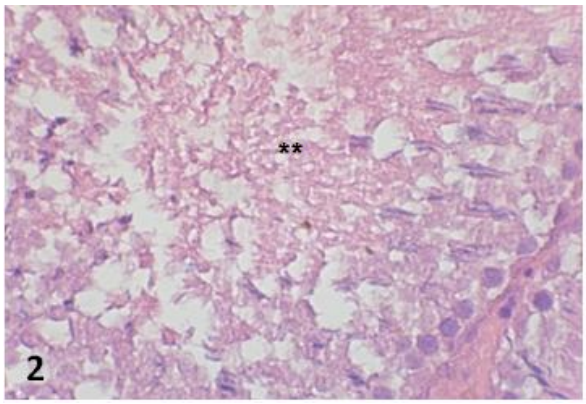
بین سلول‌های بعضی از لوله‌ها ، فواصل فراوان تری بود و بعضی از لوله‌ها کاهش سلول‌های اسپرماتوزوئید و اسپرماتوسیت ۱ را نشان می داد و برخی دیگر از لوله‌ها فاقد سلول‌های اسپرماتید بودند. (نگاره ۲)

در گروهی که میزان ۲۰mg/kg و ۱۰ ملاتونین مصرف کرده بود تغییرات ریخت شناسی خاصی در مقایسه با کنترل دیده نشد. همچنین در مقایسه با کنترل اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. (نگاره 3)

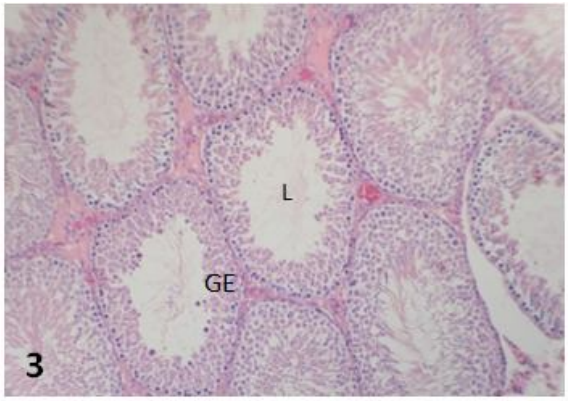
در گروهی که میزان ۲۰mg/kg و ۱۰ ملاتونین همراه با ۵۰mg/kg جمسیتابین دریافت کرده بود در مقایسه با کنترل اختلاف معنی داری نشان ندادند. لوله‌ها دارای انواع متنوع سلول‌های زایا بودند. در اغلب لوله‌ها اسپرماتوژنز فعال دیده شد (نگاره ٤)



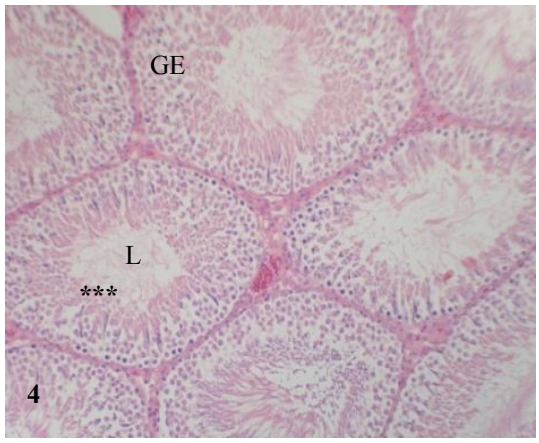
نگاره ۱- فتومیکروگراف نوری از لوله‌های سمی نیفروس موش کنترل. به اسپرماتوژنز فعال در لوله‌ها توجه شود.



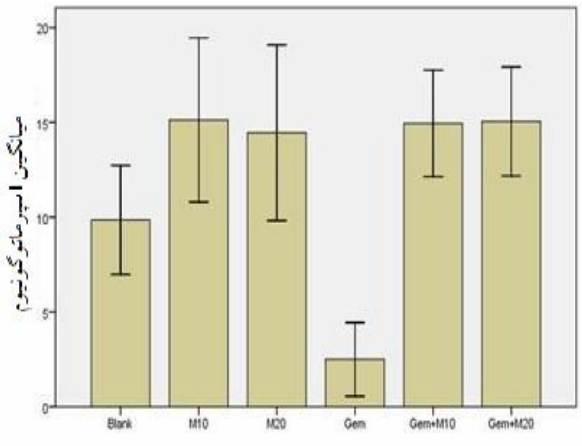
نگاره ۲- لوله سمی نیفروس در گروه تحت درمان با جمسیتابین را نشان می دهد. به تخریب اسپرماتوژنز و از بین رفتن بیشتر سلولهای زایا توجه نمایید. (**).



نگاره ۳- اسپرماتوژنز در موش تحت درمان با ملاتونین را نشان می دهد که اسپرماتوژنز مانند کنترل فعال است.

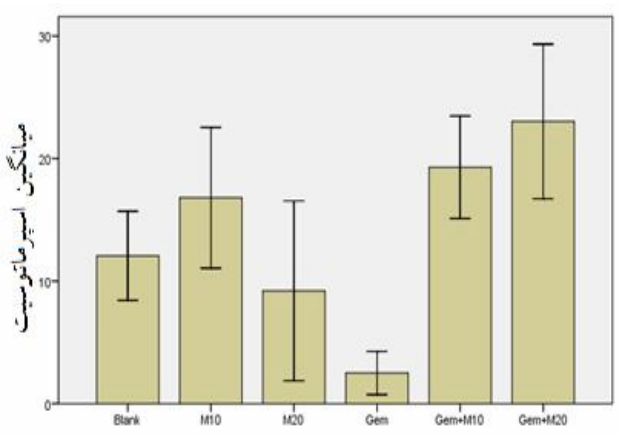


نگاره ٤– لوله سمی نیفروس در گروه تحت درمان ترکیبی جمسیتابین و ملاتونین را نشان می‌دهد. ملاتونین باعث حفظ اسپرماتوژنز در موش تحت شیمی درمانی است. (***)
لومن (L)، اپیتلیوم ژرمینال (GE)، رنگ آمیزی (H&E) ٤٠٠×



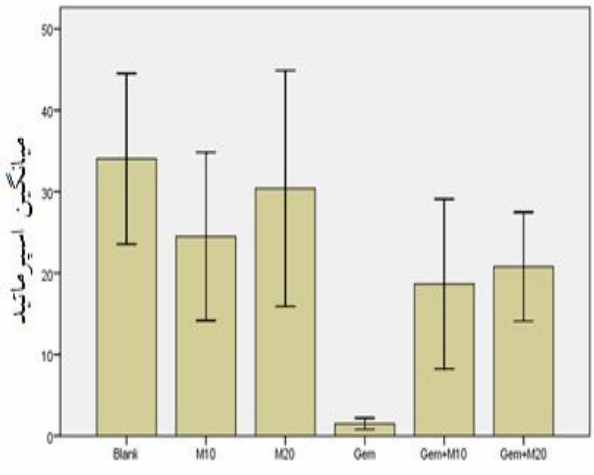
نمودار ١ـ گروه‌های دارویی ، باضریب خطای ٩٥٪
میانگین اسپرماتوگونیوم با ظریب اطمینان ٩٥٪ در گروهای دارویی

همانطور که در نمودار١ مشخص است و همچنین براساس آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تنها بین میانگین درصد سلول‌های اسپرماتوگونی درگروه Gem با سایر گروه‌ها اختلاف به شدت معنی دار وجود دارد (P<0.01) . اما درصد مذکور در سایر گروه‌های دارویی با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.
ضمناً یادآوری می‌شود که برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ٩٥٪ به صورت error bar نشان داده شده است.



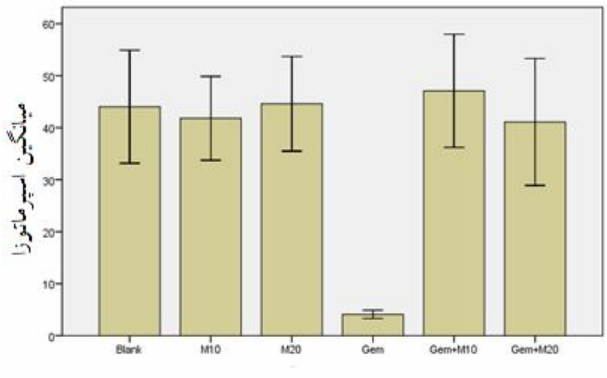
نمودار ٢ـ گروه‌های دارویی ، باضریب خطای ٩٥٪
میانگین اسپرماتوسیت با ظریب اطمینان ٩٥٪ در گروهای دارویی

همانطورکه درنمودار٢ مشخص است و همچنین براساس آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تنها بین میانگین درصد سلول‌های اسپرماتوسیت ١ درگروه Gem با سایر گروه‌ها اختلاف به شدت معنی‌دار وجود دارد (P<0.01) و تنها با گروه M20 اختلاف معنی دار یا 0.01<P<0.05 مشخص می‌شود اما درصد مذکور در سایر گروه‌های دارویی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.
ضمناً یادآوری می‌شود که برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ٩٥٪ به صورت error bar نشان داده شده است



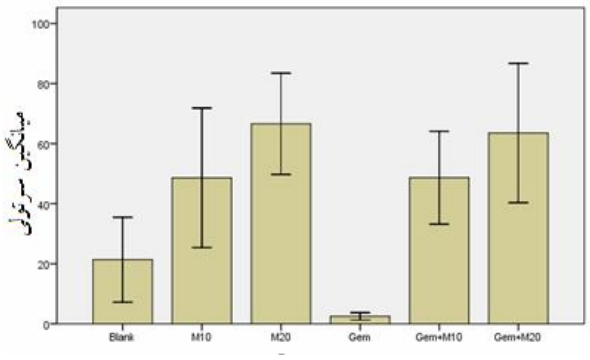
نمودار ٣ـگروه‌های دارویی ، باضریب خطای ٩٥٪
میانگین اسپرماتید با ظریب اطمینان ٩٥٪ در گروهای دارویی.

همانطورکه درنمودار ۳ مشخص است و همچنین براساس آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تنها بین میانگین درصد سلول‌های اسپرماتید درگروه Gem با سایر گروه‌ها اختلاف به شدت معنی دار وجود دارد (P<0.01) . اما درصد مذکور در سایر گروه‌های دارویی با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.
ضمناً یادآوری می‌شود که برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ۹۵٪ به صورت error bar نشان داده شده است.



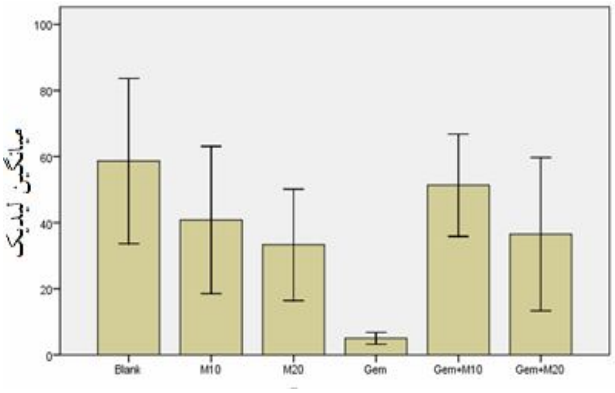
نمودار ٤ـگروه‌های دارویی ، باضریب خطای ۹۵٪
میانگین اسپرماتید با ظریب اطمینان ۹۵٪ در گروهای دارویی

همانطورکه درنمودار٤ مشخص است و همچنین براساس آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تنها بین میانگین درصد سلول‌های اسپرماتوزوآ درگروه Gem با سایر گروه‌ها اختلاف به شدت معنی دار وجود دارد (P<0.01) . اما درصد مذکور در سایر گروه‌های دارویی با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.
ضمناً یادآوری می‌شود که برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ۹۵٪ به صورت error bar نشان داده شده است



نمودار ٥ـگروه‌های دارویی ، باضریب خطای ۹۵٪
میانگین سرتولی با ظریب اطمینان ۹۵٪ در گروهای دارویی

همانطورکه درنمودار٥ مشخص است و همچنین براساس آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تنها بین میانگین درصد سلول‌های سرتولی درگروه Gem با سایر گروه‌ها اختلاف به شدت معنی‌دار وجود دارد (P<0.01) و تنها با گروه شاهد (Blank) اختلاف معنی داری با 0.01<P<0.05 مشخص می‌شود اما درصد مذکور در سایر گروه‌های دارویی با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.
ضمناً یادآوری می‌شود که برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ۹۵٪ به صورت error bar نشان داده شده است.



نمودار ٦ـ گروه‌های دارویی ، باضریب خطای ۹۵٪
میانگین سرتولی با ظریب اطمینان ۹۵٪ در گروهای دارویی

همانطورکه درنمودار٦ مشخص است و همچنین براساس آزمون ناپارامتری کروسکال والیس تنها بین میانگین درصد سلول‌های لیدیگ درگروه Gem با سایر گروه‌ها اختلاف به شدت معنی دار وجود دارد (P<0.01) و تنها با گروه های M10 و M20 اختلاف معنی داری بصورت 0.01<P<0.05 مشخص می‌شود اما درصد مذکور در سایر گروه‌های دارویی با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.
ضمناً یادآوری می‌شود که برای میانگین هر گروه حدود اطمینان ۹۵٪ به صورت error bar نشان داده شده است.

بحث

مطالعه حاضر اثرات جمسیتابین و ملاتونین را روی تغییرات کمی و کیفی و بلوغ اسپرماتوژنز بررسی می نماید که

مارکرهای مهمی برای کیفیت اسپرماتوژنز هستند و این پارامترها می‌توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند. در این مطالعه تجویز تک دوز ۵۰ mg/kg جمسیتابین در مدت ۱٤ روز باعث کاهش بلوغ اسپرماتوژنز و عمده پارامترهای کمی بیضه شد. مصرف جمسیتابین باعث کاهش سلول‌های زایا از جمله سلول‌های اسپرماتوگونیوم، اسپرماتوسیت ۱، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید، سلول‌های سوماتیک از جمله سرتولی و لیدیک ، شده و نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری را (P<0.01) نشان می دهد که این اثر ناشی از خاصیت آلکیله کنندگی جمسیتابین است که دارای اثرات مخرب بر روی سلول‌های در حال تکثیر می باشد (17 و ۸) هرچند که برخی از محققین بر این عقیده اند که مصرف بسیاری از داروهای ضد سرطان که دارای خاصیت آلکیله کنندگی می‌باشند باعث توقف تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی و یا مرگ آنها می‌گردد(۱۲) .

این مطلب خود می‌تواند با کاهش بلوغ اسپرماتوژنز همراه باشد هر چند که خیلی از سلول‌های زایا از بین رفته بودند،ولی در داخل لوله‌های سمی نیفروس و بر روی غشاء پایه هنوز اسپرماتوگونی‌ها دیده می‌شدند، باقی ماندن سلول‌های اسپرماتوگونی می‌تواند پس از مدتی با تقسیم، سایر سلول‌های زایا را بوجود آورد. تجویز ۵۰mg/kg جمسیتابین در موش‌ها می‌تواند تغییرات آپوپتوتیک را در سلول‌های زایای بیضه القاء نماید (18 و۷) علاوه بر این جمسیتابین نه تنها تغییرات ریخت شناسی فراساختاری را در سلول‌های زایا بلکه در سلول‌های سوماتیک بیضه شامل سلول‌های لیدیک و سرتولی نیز القا می‌کند که می‌تواند باعث تغییرات زیادی در بیضه و اسپرماتوژنز شوند. ضمن اینکه اسپرماتوژنز نتیجهٔ اثرگذاری سلول‌های زایا و سوماتیک بر یکدیگر است(۱۳). به عبارت دیگر کاهش بلوغ اسپرماتوژنز، تعداد سلول‌های زایا و پارامترهای کمی لولهٔ سمی نیفروس در گروه تحت شیمی درمانی می‌تواند ناشی از تغییرات توام سلول‌های زایا و سوماتیک باشد (۱۳).

نتایج مطالعه میانگین درصد سلول‌های اسپرماتوژنیک و غیرجنسی تحت درمان ترکیبی ۵۰mg/kg جمسیتابین و ۱۰mg/kg ملاتونین و همچنین ۵۰mg/kg جمسیتابین و ۲۰mg/kg ملاتونین، با افزایش سلول‌های این گروه مطابقت داشته است. در این دو گروه افزایش سلول‌های اسپرماتوژنیک و غیرجنسی نسبت به گروه با تجویز جمسیتابین می‌تواند ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین باشد. چون ملاتونین می‌تواند بروز ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان: مانند سوپراکسیددیس موتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را تحریک نماید (16) این مطالعه نشان داد که مصرف ملاتونین توأم با جمسیتابین برای مدت ۱٤ روز، اثرات سوء جمسیتابین را روی اسپرماتوژنز کاهش می دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که بهبودی روند اسپرماتوژنز در گروه آخر تحت درمان ترکیبی، ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین باشد. به طور مشابه با مطالعه حاضر، مصرف ملاتونین در رت‌های تحت درمان با سیس پلاتین (۳ و ۲) و همچنین رت‌های دیابتیک تحت درمان با استرپتوزوتوسین آسیب وارده به بیضه را کاهش می دهد (۵). بنابراین به نظر می‌رسد که ملاتونین در مطالعه حاضر نیز سمیت و عوارض جانبی بر جمسیتابین را کاهش داده است. دوز مصرفی ملاتونین در مطالعه حاضر مشابه مطالعه Atessahin, Guneli بود (۵ و۳).

همچنین خاصیت آنتی آپوپتوتیک ملاتونین که با مهار روند آپوپتوز سلول‌های زایا مانع تخریب اسپرماتوژنز شده است (۹و۵) در تأئید این مطلب اثرات آنتی آپوپتوتیک ملاتونین بر روی بافت های مختلف در چندین آزمایش دیگر نشان داده شده است (۳).

تجویز ۱۰mg/kg و ۲۰mg/kg به تنهایی ملاتونین، همین افزایش را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (P<0.05). ولی سلول‌های لیدیک در اثر تأثیر ملاتونین کاهش معنی داری را نشان می دهد(0.01<P<0.05) که ممکن است باعث کاهش گروه سلول‌های اسپرماتوژنیک از جمله اسپرماتوسیت ۱ شود. خواص آنتی پرولیفراتیو ملاتونین با مهار روند تکثیر سلول‌های

اسپرماتوگونیم روند تمایز آنها را به اسپرماتوسیت مهار می‌نماید. در تائید این مطلب Glode و همکاران برای اولین بار پیشنهاد نمودند که هر عاملی که بتواند باعث کاهش ترشح FSH و LH شود و بتواند محور هیپوفیزی ـ هیپوتالاموس ـ گنادی را مهار کند، احتمالاً می‌تواند باعث مهار تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در طی شیمی درمانی شود. Glode و همکاران ثابت نمودند که درمان با آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپین قبل و در طی مصرف سیکلوفسفامايد، باعث حفظ روند اسپرماتوژنز در موش می‌شود. به طور مشابهی تجویز لوپرلاید استات، بوسرلین، تستوسترون و همچنین هورمون‌های استروژن و FSH ، باعث حفظ اسپرماتوژنز در موش تحت شیمی درمانی با جمسیتابین می‌شود: که خود این عوامل نیز به نوعی باعث مهار محور هیپوفیزی هیپوتالاموسی می‌شوند.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بین ملاتونین و گیرنده‌ای GnRH در موش‌ها رابطه معکوس وجود دارد و ملاتونین ترشح FSH و LH را کاهش می‌دهد. ضمن این که گزارش‌های قبلی نشان دهنده این است که ملاتونین دارای خاصیت ضد تکثیری هم روی سلول‌های زایا و هم روی سایر سلول‌های دیگر است. هر چند که مکانیسم های فوق، ثابت شده نمی‌باشند و برای اثبات آنها مطالعات بیشتری در زمینه سلولی، مولکولی و ایمونوهیستوشیمی و همچنین آندوکرینولوژی مورد نیاز می‌باشد(20و۱۳و ۱۲).

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تجویز ۵۰mg/kg جمسیتابین به موش‌های مورد آزمایش پس از چهارده روز باعث کاهش معنی‌داری در تعداد گروه‌های سلولی اسپرماتوژنیک و گروه‌های سلولی غیرجنسی در مقایسه با گروه کنترل در بیضه می‌گردد($P<0.01$).

در گروه تحت درمان ترکیبی جمسیتابین و ملاتونین در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معناداری در تعداد سلول‌ها و مورفولوژی غیرنرمال دیده نشد. این امر نشان می‌دهد که ملاتونین کاهش اثرات ضد سرطانی داروی فوق را باعث می‌گردد و نشانگر نقش محافظتی ملاتونین است.

این مطالعه پیشنهاد می‌کند که ملاتونین ممکن است نقش مفید و مهمی برای کاربردهای کلینیکی اختلالات کاکردی بیضه به دنبال مصرف داروهای ضد سرطان داشته باشد. از طرفی تجویز ملاتونین ۲۰mg/kg و ۱۰ به تنهایی بمدت ۱٤ روز اثر سوء در روند اسپرماتوژنز در مقایسه با کنترل نداشت اگر چه نشان می‌دهد باعث افزایش اسپرماتوژنز نسبت به کنترل می‌گردد که این افزایش معنی دار نبوده و شاید یکی از ویژگی‌های آنتی اکسیدانی یا محافظتی ملاتونین است. در این پژوهش مقدار ۲۰mg/kg ملاتونین نتیجه بهتری داشته است.

فهرست منابع

1- Aapro, M.S., Martin, C., Hatty, S. (1998): Gemcitabine: A safety review. Anticancer Drugs. 9: 191-201.

2-Asok, KR., Chinoy, NJ. (1988): Effects of acetylsalicylic acid on reproductive organs of adolescent male rats. Endocrinol Exp. 22(3): 187-195.

3-Ateşşahin, A., Sahna, E.,Türk, G., Ceribaşi, AO., Yilmaz, S., Yüce, A., et al. (2006): Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. J Pineal Res. 41 (1): 21-7.

4- Gavella, M., Lipovac, V. (2000): antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. Arch Androl. 44(1):23-7.

5- Guneli, E., Tugyan, K., et. al. (2008): Effect of melatonin on tes-ticulaar damage in streptozotocin- induced diabe tes rats. Eur Surg Res. 40(4):354-60.

6- Gwayi, N., Bernard, RT. (2002): The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. Andrologia. 34(6):391-6.

7- Gravem , Hilde. (2006):Thesis for the degree Master of Pharmacy / Gemcitabine-Containing Liposomes /Department of Pharmaceutics & Biopharmaceutics , Institute of Pharmacy, Faculty of Medicine , University of Tromsø.

8-Howell, SJ., Shalet, SM. (2005): Spermatogenesis after cancer treatment: damage and trcovery. J Natl Cancer Inst Monogr.34:12-7.
9- Huang, P., Plunkett, W., (1995): Induction of apoptosis by gemcitabine. Semin. Oncol. 22:19.
10 – Hussein, M.R., Abu-Dief, E.E., et. al. (2006):Morphological evalu-ation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats:an animal model. Int J Exp Pathol. 87(3): 237-50.
11-LaKind, J.S., McKenna E.A., et. al. (July 1999): A review of the comparative mammalian toxicity of ethylene glycol and propylene glycol. Crit Rev Toxicol. 29(4):331-65.
12 - Mohamad Ghasemi, F., Faghani, M., haje jahromi, S. (2010): Stuady of protective effect of melatonin histologic changes by busulfan in adult mouse testis following Treatment with busulfan. rasht university of medical scinces.67-76 persian.
13- Mohamadghghasemi, F., Faghani, M., et. al. (2010): Effect of Melatonin on proliferative activity and apop- tosis in spermatogenic cells in mouse under chemotherapy. Journal of Reproduction & Contraception. 21(2):79-94.
14- Reiter, R.J, Tan, D.X., et. al. (2002): Melatonin: Resucing the toxicity and in-creasing the efficacy of drugs.J Pharm Pharmacol. 54(10):1299-321.
15- Omar Abu Baker, S. (2009): Gemcitabine Impacts Histological Structure of Mice Testis and Embryonic Organs. Pakistan Journal of Biological Sciences. 12: 607-615.
16- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C.A, et. al. (2009): Age-reiated changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues.Exp Gerontol. 44(5):328-34.
17- Schrader, M., Müller, M., et al. (2001):The impact of chemotherapy on male fertility:a survey of the biologic basis and clinical aspects. Repros Toxicol. 15(6):611-7.
18- Sharma ,R.K., Agarwal, A. (1996): Role of reactive oxygen species in male infertility.Urology. 48:835-850.
19- Sönmez, M.,Yüce, A., Türk, G. (2007): The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. Reprod Toxicol. 23(2): 226-31.
20- Udagawa, K., Ogawa, T., et. al. (2001): GnRH analog, leupro- relinacetate acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. Int J Urol. 8(11):615-22.