

## مقاله پژوهشی

## بررسی اثر داروی سیکلوفسفامید بر بیان ژن‌های ODF1 و ZPBP در بافت بیضه

## موش‌های نر نژاد ویستار

صادق بازوند<sup>۱</sup>، طاهره ناجی<sup>۱\*</sup>، عبدالرضا محمد نیا<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم

پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: naji\_t@iaups.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۳

## چکیده

سیکلوفسفوماید یک داروی الکیله‌کننده DNA با خواص آنتی‌نئوپلاستیک است. علیرغم کاربردهای کلینیکی فراوان در درمان سرطان، این دارو دارای اثرات سمی بر بافت‌های بدن به ویژه ارگان‌های جنسی می‌باشد. یکی از مهمترین عوارض جانبی آن، تغییر عملکرد سیستم تناسلی در جنس نر است که ممکن است منجر به ناباروری گردد. در این تحقیق تعداد ۲۰ سر موش نر بالغ نژاد ویستار با وزن  $220 \pm 30$  گرم انتخاب شدند و همه حیوانات توسط رژیم پلت استاندارد تغذیه گردیدند گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید: دریافت پلیت استاندارد + آب و سیکلوفسفامید با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز تحت تیمار قرار گرفتند. بیان ژن‌های ODF1 و ZPBP با روش ریل تایم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفه One way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در تیمارهای آزمایشی سطح بیان ژن‌های ODF1 و ZPBP میان گروه‌های کنترل و تیمارها دارای اختلاف معناداری بود ( $p \leq 0/05$ ). نتایج نشان داد که بیان ژن ZPBP و ODF1 در گروه مواجهه شده با داروی سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۷/۲۶ و ۷/۵ برابر کاهش داشته است و بیان ژن‌های فوق دستخوش تغییرات معناداری شده بود. همچنین مقایسه تعداد اسپرم‌ها در دو گروه کنترل و تیمار نشان داد در گروه تیمار تعداد اسپرم‌ها، نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است که احتمالاً کاهش تعداد اسپرم‌ها در میزان باروری رت‌های نر نژاد ویستار موثر می‌باشد.

کلمات کلیدی: سیکلوفسفامید، ژن ODF1، ژن ZPBP، عامل الکیله، ریل تایم.

## مقدمه

مربوط به مردان، ۴۰ درصد مربوط به زنان و حدود ۱۰ درصد مربوط به هر دو است. در حدود ۱۰ درصد از زوج‌ها نیز عامل ناباروری مشخص نیست. یکی از مکانیسم‌های مهم در ایجاد ناباروری در مردان، استرس اکسیداتیو است (۲، ۳۸). سیکلوفسفوماید

ناتوانی یک زوج در باردار شدن پس از یک سال رابطه جنسی بدون جلوگیری از بارداری را ناباروری گویند. ناباروری در ده تا پانزده درصد از زوج‌ها دیده می‌شود. علل ناباروری می‌تواند مربوط به زن یا مرد یا هر دو باشد. حدود ۴۰ درصد از مشکلات ناباروری

این داروها در تمام مراحل چرخه سلولی کار می‌کنند و برای درمان بیماری لنفوم مغز استخوان و بیماری هوچکین و بسیاری از سرطان‌های مختلف از جمله لوسمی، لنفوما، بیماری سارکوما همچنین سرطانهای ریه، پستان و تخمدان استفاده میشوند. چون این داروها به DNA آسیب می‌رسانند، میتوانند باعث آسیب‌های طولانی مدت به مغز استخوان شوند (۳۷). در موارد نادر، میتواند به لوسمی حاد منجر شود. خطر ابتلا به لوسمی بر اثر عوامل آلکیله کننده، وابسته به دوز است. خطر ابتلا به لوسمی بعد از رسیدن عوامل آلکیله کننده، حدود ۳۰ الی ۴۰ سال بعد از درمان بالاترین است. آنتی‌متابولیت‌ها در رشد DNA و RNA از طریق جایگزینی، برای انسداد ساخت نرمال DNA و RNA مداخله می‌کنند. این عوامل در فاز S به سلول آسیب می‌زنند، یعنی زمانی که کروموزومهای سلولها در حال کپی شدن است. آنها معمولاً برای درمان لوسمی، سرطان‌های پستان، تخمدان و روده همچنین انواع دیگر سرطان‌ها استفاده می‌شوند (۱۹، ۳۲).

آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور این داروها بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها استفاده درون سلول‌های سرطانی آنها را از رشد و تکثیر باز میدارند. آنها با تغییر DNA از جمله آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور هستند که از طریق آنزیم‌های دخیل در Anthracyclines اثر می‌کنند. این داروها در همه فازهای چرخه سلولی کار می‌کنند. آنها به طور گسترده DNA تکثیر برای همه سرطان‌ها استفاده میشوند. مهار کننده‌های توپوایزومرازی این داروها با آنزیم‌هایی که توپوایزومراز نامیده می‌شوند (۳۹). تداخل کپی S کمک میکنند به طوری که آنها بتوانند در طی فاز DNA میکنند، که به جدا شدن رشته‌های شوند. مهار کننده های توپوایزومراز برای درمان لوسمی خاص، همچنین سرطان‌های ریه، تخمدان،

یک داروی الکیله کننده DNA با خواص آنتی‌نئوپلاستیک است. این دارو که برای شیمی درمانی و سرکوب سیستم ایمنی در پیوند ارگان‌ها استفاده میشود علیرغم کاربردهای کلینیکی فراوان در درمان سرطان، دارای اثرات سمی بر بافت‌های بدن به ویژه ارگان‌های جنسی می‌باشد (۱، ۱۰). یکی از مهمترین عوارض جانبی آن، تغییر عملکرد سیستم تناسلی در جنس نر است که ممکن است منجر به ناباروری گردد. ژن (ODF1) که در مردان نابارور به طرز چشمگیری بیان آن کاهش می‌یابد (۶، ۲۳، ۳۷). در بعضی موارد، قطعه میانی به نظر می‌رسد که از لحاظ اندازه کاهش می‌یابد. از این رو، کاهش شدید بیان ODF1 یک نشانگر ناباروری مردان ایدیوپاتیک و یک محرک بالقوه این بیماری است (۴، ۷). نظر به اینکه تا کنون تاثیر این دارو روی بافت بیضه کار شده ولی بر روی بیان ژن های ODF1, ZPBP در بافت بیضه کاری انجام نشده لذا این کار برای اولین بار انجام می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر سیکلوفسفامید بر بیان ژن ODF1, ZPBP در بافت بیضه رت‌های نر نژاد ویستار بود. داروهای شیمی درمانی را می‌توان بر اساس عواملی مانند چگونگی عملکرد آنها، ساختار شیمیایی و ارتباط آنها با داروهای دیگر به چندین گروه تقسیم کرد. برخی داروها در بیش از یک راه عمل می‌کنند و ممکن است به بیش از یک گروه تعلق داشته باشند. دانستن چگونگی عملکردهای دارو در پیش بینی عوارض جانبی مهم است. این کمک میکند پزشکان تصمیم بگیرند که کدام داروها به احتمال زیاد باهم به خوبی کار می‌کنند. اگر بیش از یک دارو استفاده شود، این اطلاعات کمک می‌کنند تا آنها برنامه ریزی دقیق زمانی کنند که هر دارو باید به چه ترتیبی و چگونه داده شوند. عوامل آلکیله کننده به منظور جلوگیری از قابلیت تولیدمثل سلول، به DNA سلول آسیب می‌زنند.

دیگر بیماری‌های خوش خیم می‌باشد (۱۶، ۲۰). امروزه سیکلوفسفامید به عنوان یک تراژون قوی شناخته می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که سیکلوفسفامید در درجه اول باعث بروز ناهنجاری‌های دستگاه عصبی و اسکلتی در انسان، میمون، خرگوش، موش صحرایی و موش می‌گردد. اخیراً با استفاده از کشت جنین در محیط آزمایشگاهی اثرات تراژونی سیکلوفسفامید به اثبات رسیده است (۹، ۱۸). همچنین ثابت شده است که هر دو متابولیت سیکلوفسفامید یعنی فسفرآمید-موستارد و آکروئین دارای فعالیت‌های تراژونی و همچنین جهش‌زایی می‌باشند (۱۷، ۲۸).

اطلاعات به دست آمده بیانگر این امر است که اتصال متابولیت‌های سیکلوفسفامید به DNA باعث بروز فعالیت تراژونیک و جهش‌زایی این دارو می‌باشد (۴۱). ژن ZPBP ( Zona Pellucida-Binding Protein) یکی از پروتئین‌های متعددی است که تصور می‌شود که در اتصال ثانویه بین اسپرم و سلول‌های تخمک واکنش نشان می‌دهند. هرچند که حاصل بیان این ژن نقش‌ها و کاربردهای زیادی رو به خودش اختصاص داده است. یکی از مواردی که می‌تواند نقش ایفا نماید در اتصال اسپرم به سلول تخمک می‌باشد (۳، ۳۱). حال اگر داروی سیکلوفسفامید بتواند در بیان این ژن اختلال ایجاد کند می‌تواند اتصال سلول اسپرم به سلول تخمک رو مختل نماید (۲۷، ۴۳). الکساندر و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که موش‌های فاقد Gopc، Pick1 و Zpbp1 به دلیل ریولوژی سر غیرطبیعی نابارور هستند. ژن ODF1 (Outer dense fiber protein 1) یکی از ژن‌های که در ناباروری مردان موثر است. ژن ODF1 که در مردان نابارور به طرز چشمگیری بیان آن کاهش یافت. با استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص و نمودارهای گروهی از افراد مشکوک به نابارور را غربالگری و کاهش

معدده، روده و سایر سرطان‌ها استفاده میشوند. مهار کننده میتوزی اغلب آلکالوئیدهای گیاهی و سایر ترکیبات مشتق چرخه سلولی کار می‌کنند ولی از محصولات طبیعی هستند. آنها با متوقف کردن میتوز در فاز M می‌توانند از طریق باز داشتن آنزیم‌ها از ساخت پروتئین‌های مورد نیاز تکثیر سلولی، در تمام مراحل به سلول آسیب بزنند (۲۵، ۳۵). کورتیکو استروئیدها، که اغلب به طور ساده استروئید نامیده می‌شوند، هورمون‌های طبیعی و داروهای شبه هورمونی هستند که در درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها همچنین بیماری‌های دیگر استفاده می‌شوند (۳۶، ۴۲). هنگامی که این داروها به عنوان بخشی از درمان سرطان استفاده شوند، داروی شیمی درمانی در نظر گرفته می‌شوند (۱۱، ۱۳، ۳۵).

داروی سیکلوفسفامید با نام علمی (آیوپاک) - (RS) N,N-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxide یک عامل آلکیل‌کننده است که به شکل گسترده‌ای در شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو پودری سفید رنگ، بی بو، بلورین و محلول در آب، اتانول، بنزن و کلروفرم، با وزن مولکولی ۲۷۹۱ گرم بر مول می‌باشد (۱۴، ۲۲). بر خلاف تصور، سیکلوفسفامید در داخل سلول‌های سرطانی متابولیزه نمی‌گردد بلکه فعال سازی آن توسط اکسیدازهای کبدی صورت گرفته و متابولیت‌های حاصل از طریق جریان خون به سلول‌های نئوپلاستیک می‌رسند. سیکلوفسفامید در درمان طیف وسیعی از بدخیمی‌ها همچون لوسمی‌های حاد و مزمن، لنفوما و میلوما مورد استفاده قرار می‌گیرد. سایر کاربردهای بالینی این دارو شامل مهار سیستم ایمنی متعاقب پیوند اعضا، درمان اختلالات خودایمن نظیر آرتریت روماتوئید و لوپوس اریتماتوز سیستمیک و نیز اسکلرودرما، گلومرولونفریت، پنومونی بینایی مزمن، هپاتیت مزمن، مولتیپل اسکلروزیس MS و

میزان ODF۱ را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. درمان استرس کمبود اسپرم در ODF۱ باعث عدم تعادل حرکتی سر اسپرم می‌شود و نشان می‌دهد که چرا این گامت‌ها در شروع عمل لقاح ناتوان هستند. جالب توجه است، میکروگرافی الکترونی از اسپرم افراد نابارور نشان می‌دهد که عدم بیان ژن ODF۱ در قطعه‌ی میانی اسپرم بصورت غیر طبیعی بوده است. در بیشتر موارد، قطعه میانی اسپرم هم از لحاظ اندازه کاهش می‌یابد و هم توسط مواد دانه‌ای در نزدیکی قطعه میانی اسپرم بار آن سنگین می‌شود و باعث عدم تحرک اسپرم می‌شود. از این رو، کاهش شدید ODF۱ یک نشانگر ناباروری مردان ایدیوپاتیک و یک محرک بالقوه این بیماری است (۱۷، ۲۵).

#### مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۲۰ سر رت نر نژاد ویستار آلبینو بالغ دوماهه به وزن تقریبی  $30 \pm 220$  گرم وارد مطالعه شدند. و به مدت ۳۰ روز مورد درمان قرار گرفتند. دوز سیکلوفسفامید در این مطالعه ۴۰ میلی-گرم بر کیلوگرم تعیین گردید. برای تزریق، سیکلوفسفامید در یک محلول DMSO 50 درصد حل شد و سپس به صورت داخل صافی تزریق گردید. رت‌های گروه کنترل حجم مساوی از DMSO و آب را دریافت کردند. سی روز پس از تزریق سیکلوفسفامید، رت‌ها وزن شدند و پس از تشریح بافت بیضه خارج شد.

**خارج کردن بافت بیضه رت‌ها:** پس از ۴ هفته تیمار مدل حیوانی، در محیطی آسپتیک رت‌ها تحت جراحی قرار گرفتند و پس از باز شدن بدن، بافت بیضه خارج گردید. بیضه‌ها به سرعت پس از خارج شدن از بدن با محلول PBS (جهت تهیه بافر PBS از حل شدن قرص‌های PBS در آب مقطر استفاده شد) شستشو داده شد و سپس در محلول RNA Later در لوله

فالکن ۱۵ میلی‌لیتری قرار گرفته شد و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس بیضه‌ها را به حجم ۷۵-۸۰ میلی‌گرم برش داده و در محلول تریزول (TRIZOL) و در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند. **مراحل استخراج RNA:** استخراج RNA شامل مرحله زیر می‌باشد: نمونه را در میکروتیوب RNAase free قرار داده شد. ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و دو دقیقه در محیط، ۱۰ مرتبه، چرخش ۱۸۰ درجه آرام داده شد. ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ انجام شد. خیلی آرام از سانتریفیوژ آورده، که در این حالت ۳ فاز تشکیل شده است: فاز بی رنگ شامل RNA می‌باشد، که آن به آرامی به ستون منتقل گردید. فاز وسط سفید رنگ که حاوی DNA می‌باشد. فاز قرمز رنگ که حاوی پروتئین و موارد دیگر سلولی می‌باشد. مایع رویی که بی رنگ است را جدا کرده و به یک میکروتیوب تمیز دیگر انتقال داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به نمونه اضافه شد. ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه و دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب سفید ایجاد شده RNA تام می‌باشد. شستشوی رسوب RNA با استفاده از اتانول ۷۵ درصد ۱۰۰۰ میکرولیتر گام پنجم را تشکیل می‌دهد. نکته: در استخراج DNA شستشو با الکل ۷۰٪ انجام می‌شود ولی در استخراج RNA با الکل ۷۵٪، ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتریفیوژ گردید. رسوب پس از خالی کردن الکل به عنوان نمونه RNA برداشت شد و با قرار دادن تیوب در در زیر هود در دمای اتاق الکل باقی مانده در رسوب نیز خشک شد. ۱۰۰ میکرولیتر از RNase Free-water را درون میکروتیوب ریخته شد و نمونه ۱۰ دقیقه در ترموبلاک ۵۶ درجه قرار داده شد. پس نمونه استخراج شده رو به منظور بررسی کیفیت استخراج، نانودراپ کرده و

بررسی صحت محصول با استفاده از منحنی ذوب: از جمله مزایای Real time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می‌شود. از آنجایی که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد. بعد از اینکه PCR به پایان رسید دستگاه قادر است نمودار ذوب هر نمونه را رسم کند. این کار بوسیله اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت می‌گیرد. مراحل انجام کار به این ترتیب است که برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص بر اساس شیب دمایی تعریف شده به مقدار معینی تغییر می‌دهد. بطور مثال ابتدا دستگاه دمای نمونه‌ها را به ۶۰ درجه سانتیگراد می‌رساند. در این حالت تمام DNA ها به صورت دو رشته ای هستند و میزان سایبرگرین متصل شده حداکثر است. در نتیجه میزان فلورسانس ساطع شده زیاد می‌باشد. به تدریج دستگاه دمای نمونه‌ها را ۰.۳ درجه سانتیگراد افزایش داده و ۱۰ ثانیه در آن دما می‌ماند و در این مدت نور ساطع شده از نمونه‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود. همزمان با این عمل منحنی تغییرات فلورسانس برحسب دما که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌گردد. در نقطه ذوب ۵۰ درصد پیوندهای هیدروژنی در DNA های دو رشته‌ای از هم جدا شده و میزان فلورسانس بطور ناگهانی تغییر می‌یابد. در این منحنی هر یک از قله‌ها نمایانگر منحنی ذوب یک محصول PCR است. از آن جایی که هر ژن دارای منحنی ذوب خاص خود می‌باشد بنابراین منحنی‌های یک ژن در تمام نمونه‌ها باید با هم منطبق باشند و همچنین باید تمام منحنی‌ها تک قله باشند. بنابراین با آنالیز منحنی ذوب می‌توان وجود باندهای غیراختصاصی و پرایمر دایمر را تشخیص دهد و در آنالیز داده‌های ریل تایم نمونه‌هایی که منحنی

میزان غلظت آن سنجیده و برای انجام سایر مراحل به فریزر ۸۰- منتقل گردید.

**طراحی پرایمر:** پرایمرها الیگونوکلئوتیدهایی با طول ۱۷-۲۵ باز هستند که با اتصال به قطعات مشخص روی DNA الگو، امکان عملکرد آنزیم و تکثیر قطعه DNA واقع بین دو پرایمر را فراهم می‌کند. جهت طراحی این پرایمرها ابتدا توالی DNA ی ژن‌ها از بانک ژن gene Bank گرفته شد و سپس در نرم افزار AlleID7 پرایمرها طراحی شد. بهترین ناحیه ژن برای این پرایمرها تعیین گردید. برای طراحی پرایمرها، مطمئن ترین روش آن است که پرایمر جلویی یا برگشتی در ناحیه اتصال آگزون‌ها قرار داده شود، و یا این که پرایمر جلویی در یک آگزون و پرایمر برگشتی در آگزون دیگری واقع باشد، در این حالت از تکثیر شدن DNA در نمونه‌هایی که آلودگی DNA دارند، جلوگیری به عمل می‌آید. برای اطمینان از صحت توالی پرایمرها و عدم اتصال آنها به توالی‌های غیراختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، پرایمرها (<http://www.ncbi>)

BLASTPRIMER (nlm.nih.gov/blast) شدند.

پرایمرهای ساخته شده از شرکت سیناکلون به صورت لیوفیلیزه تحویل گرفته شد. بر اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر حجم مشخصی آب مقطر دیونیزه اضافه شد که در نهایت غلظت تمام پرایمرها در حد ۱۰۰ میکرومولار (غلظت پرایمر ذخیره) باشد. پرایمرهای آماده شده در مقادیر ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر تقسیم و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی شده برای ODF1 و ZPBP در زیر نشان داده شده است. بر اساس پرایمر-های طراحی شده، اندازه قطعه محصول PCR برای ODF1 و ZPBP به ترتیب 91 و 105 جفت باز می‌باشد.

استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت. وجود باندهای 18S و 28S نشان دهنده کیفیت مطلوب mRNA استخراج شده است.

**تأیید کمی mRNA استخراج شده از بافت ریه:** خلوص mRNA استخراج شده از طریق نسبت جذب، در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در محدوده - ۱/۷-۲/۱ نشان دهنده عدم آلودگی نمونه- هاست. پس از استخراج mRNA از بافت ریه، تأیید کمی mRNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که نسبت جذب mRNA در این طول موج در محدوده ۲/۱-۱/۷ می‌باشد.

**استخراج RNA از بافت های به دست آمده از نمونه‌های تیماری:** از گروه‌های مورد مطالعه در زمان‌های ذکر شده نمونه بافت گرفته شد و نمونه‌های بافتی RNA استخراج گردید. که ابتدا کیفیت و کمیت RNA به دست آمده ارزیابی شد و سپس از آن در تهیه cDNA استفاده شد.

ذوب آنها با سایر نمونه‌ها منطبق نیست باید از بررسی حذف شوند.

**الکتروفورز روی ژل آگارز:** ابتدا ژل آگارز ۲ درصد (۲ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر Tris-Borate-EDTA 0.5X) مخلوط با SafeStain آماده شد، سپس محصولات تکثیر شده ژن هدف و مرجع طی Real-time PCR، روی ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز شد. این مرحله جهت تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و جفت شدن پرایمرها انجام شد (۳۷).

**روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها:** جهت معنی‌دار بودن نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفه One way ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت Mean±SD ارائه می‌گردد. معیار استنتاج آماری سطح معنی‌داری  $p$  کمتر از ۰/۰۵ است.

**تأیید کیفی mRNA استخراج شده از بافت بیضه:** به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه mRNA استخراج شده از نمونه‌های بیضه‌ی رت‌ها کیفیت mRNA با

جدول ۱- توالی پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (bp)	OD
GAPDH	F: TCACTGCCACTCAGAAGAC	179bp	4.5
	R: ACATTGGGGGTAGGAACAC		4.3
ODF1	F:AATTCTGGCCTCCTCTTGCT	91bp	4.5
	R:TTTAACGCGCACTTTGACCT		4.3
ZBPB	F:AAGTGCTCTGAGTGCTGTGT	105bp	5.4
	R:TGTCTTCGCTCCATACACCA		4.9

## نتایج

**آنالیز منحنی ذوب:** تکثیر اختصاصی قطعات ژنی موردنظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر قطعات غیراختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین می‌شود. در نمودارهای زیر منحنی ذوب ژن‌های ODF1، ZBPB پس از واکنش Real-Time PCR نشان داده شده است. الگوی منحنی ذوب

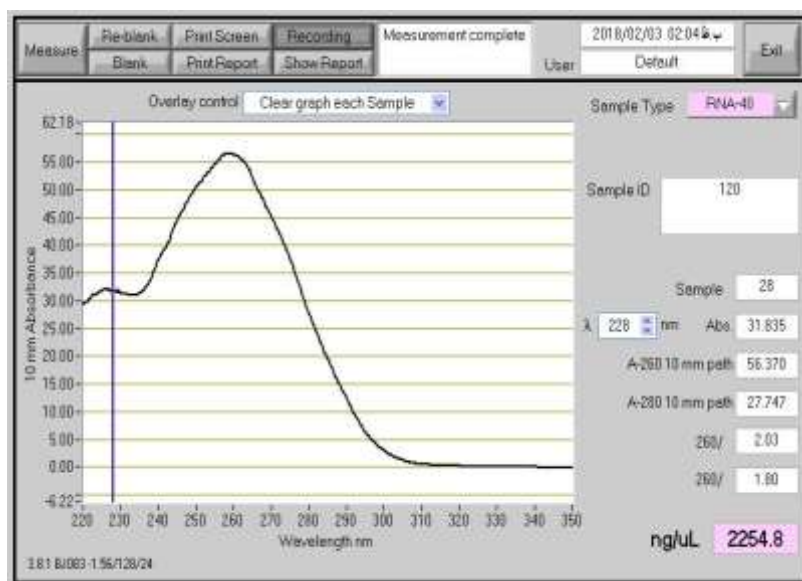
**اثرات سیکلوفسفاماید بر بیان ژن‌ها ODF1 و ZBPB با استفاده از Real-Time PCR:** نمودار تکثیر مربوط به واکنش Real-Time PCR که نشان می‌دهد واکنش انجام شده و محصولات تشکیل شده‌اند که تأیید محصولات حاصل شده با منحنی ذوب و الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت.

نرم‌افزار SPSS و ترسیم نمودار با graph pad prism 7 انجام گرفته است. طبق محاسبات انجام گرفته شده با نرم افزار SPSS نتیجه گرفته شد که بیان ژن ZPBP و ODF1 در گروه مواجهه شده با داروی سیکلو فسفاماید نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۷/۲۶ و ۷/۵ برابر کاهش داشته است. در این تحقیق برای بررسی بهتر، شمارش سلولی اسپرم‌ها نیز انجام گرفت. که نتایج حاصل از شمارش سلولی اسپرم‌ها در گروه کنترل و گروهی که با این دارو مواجه شده اند حاکی از این می‌باشد که اسپرم‌ها در رت‌های گروه کنترل نسبت به گروه مواجه با دارو بیشتر می‌باشد که این خود نشان دهنده‌ی کاهش اسپرم در رت‌ها بعد از دریافت دارو می‌باشد که در ناباروری تاثیر بسزایی دارد.

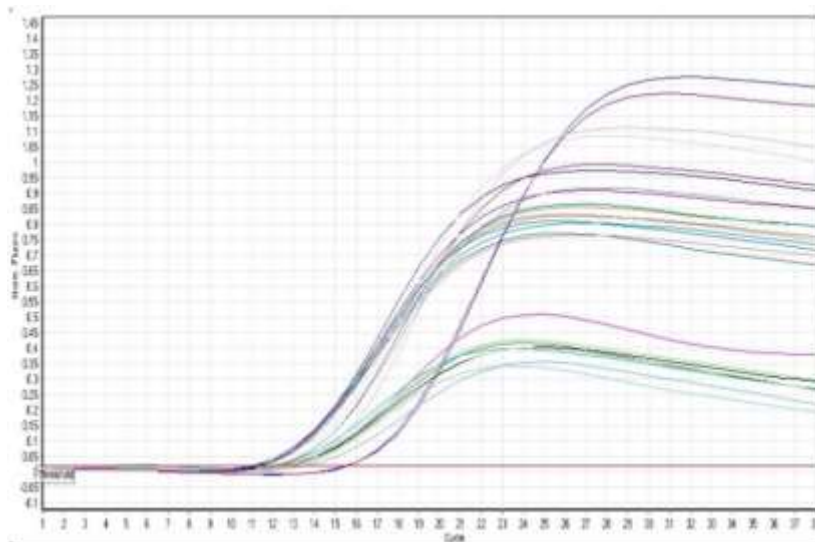
ژن‌های ZPBP.ODF1 در دمای ۸۵ و ۸۶/۳۰ درجه سلسیوس می‌باشد.

آنالیز ژل الکتروفورز: بعد از واکنش Real-Time PCR محصولات واکنش هر ژن با ژل الکتروفورز آنالیز شد. نتایج حاصل، تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود.

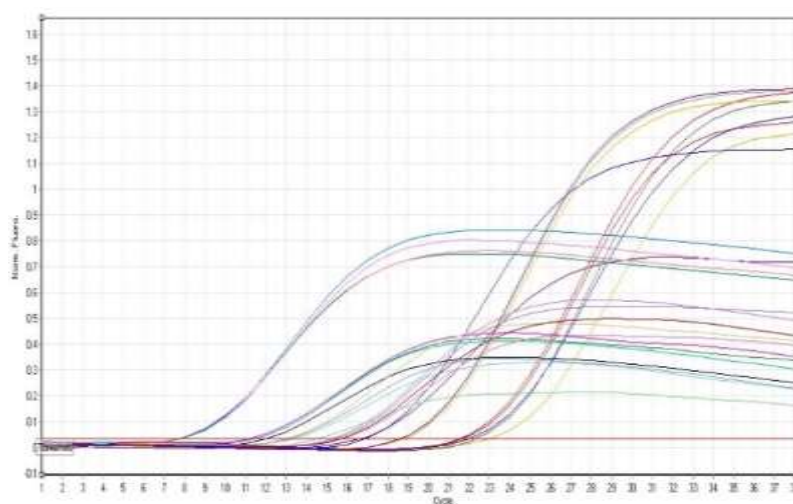
**آنالیز داده‌ها:** جهت آنالیز داده‌ها ابتدا مقادیر Ct ژن‌ها هدف با ژن رفرنس نرمال‌سازی گردید و سپس با مقایسه همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل به عنوان گروه مرجع میزان ddCt- برای همه گروه‌ها محاسبه گردید. برای محاسبه سطح معنی‌داری اختلاف بیان مشاهده شده بین گروه‌ها از آزمون anova و آزمون T استفاده گردید. محاسبه اختلاف بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Genex 6 و آنالیزهای آماری با استفاده از



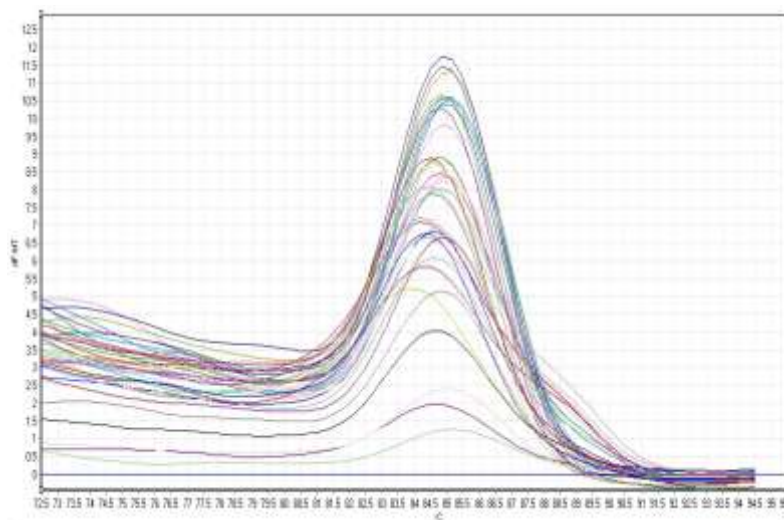
شکل ۱- تصویر ترسیم شده به وسیله دستگاه نانودراپ برای اندازه‌گیری غلظت mRNA استخراج شده



نمودار ۱- تکثیر Real-time PCR مربوط به ژن ODF1

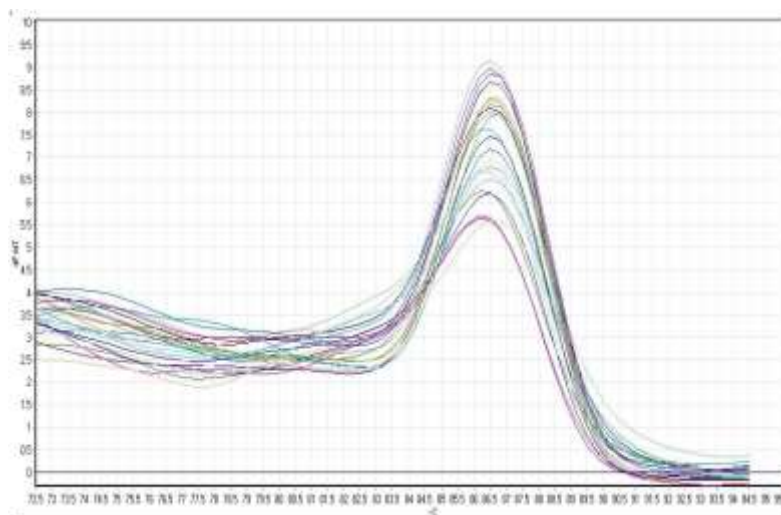


نمودار ۲- تکثیر Real-time PCR مربوط به ژن ZBPB

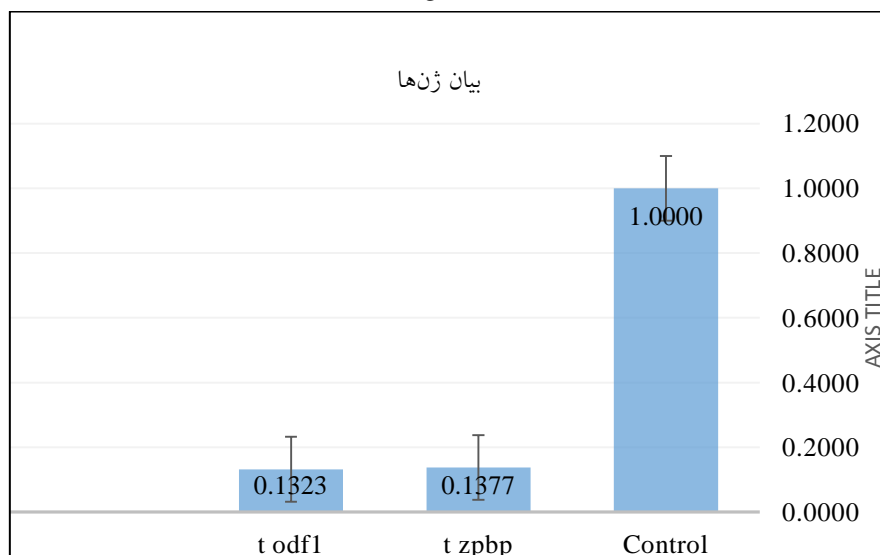


نمودار ۳- الگوی منحنی ذوب ژن ODF1





نمودار ۴- الگوی منحنی ذوب ژن ZPBP



نمودار ۵- نتایج بدست آمده از تزریق داروی سیکلوفسفامید با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم که معادل (۸ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) بصورت داخل صفاقی ارتباط بین الگوی بیان ژن‌های *odf1* و *ZPBP* رت‌های نر نژاد ویستار در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده شد و میزان بیان آنها کاهش یافته است ( $p < 0/05$ ).



نمودار ۶- مقایسه میانگین در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل بررسی اثر داروی سیکلوفسفامید در آسیب بیضوی رت‌های نر نژاد ویستار در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده شد و تعداد اسپرم‌های آنها کاهش یافته است ( $p < 0/05$ ).

## بحث

این دارو آسیب پذیرند (۲۹، ۳۳). یکی از مهمترین عوارض جانبی آن، تغییر عملکرد سیستم تناسلی در جنس نر است که ممکن است منجر به ناباروری گردد (۱۵، ۳۰).

در مطالعه انجام شده بیان دو ژن مذکور نیز مورد بررسی قرار گرفت به طوری که فرض بر این بود که داروی سیکلوفسفامید که مورد استفاده جهت شیمی‌درمانی می‌باشد باعث کاهش بیان این دو ژن و در نتیجه افزایش ناباروری در مردان می‌شود. طبق نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی انجام شده مشاهده شد که با مصرف این دارو بیان این فاکتور به طور قابل ملاحظه و معناداری کاهش پیدا کرده است (نمودار ۵).

قدرت تحرک اسپرم‌ها به عنوان عامل تعیین کننده و موثر در باروری افراد مطرح می‌شود و متضمن لقاح موفقیت آمیز است. بر اساس مطالعات پیشین به نظر می‌رسد در انجام فرآیند لقاح، تحرک اسپرم نقش موثرتری در مقایسه با سایر فاکتورها مانند تعداد و مورفولوژی اسپرم ایفا می‌کند (۲۱، ۲۶). عدم بیان ژن

نتایج این تحقیق نشان داد که درمان با سیکلوفسفامید منجر به القاء سمیت در دستگاه تناسلی نر گردید. درمان با دوز مشخص شده‌ی سیکلوفسفامید، به مدت ۳۰ روز باعث آسیب‌های شدید بافتی، کاهش معنی‌دار در میزان تعداد و بیان ژن‌های مذکور شده که می‌تواند در میزان ناباروری مردان موثر باشد نقص-های ژنی بعنوان بیشترین درصد در مردان نابارور ۱۵ و زنان ۱۰ درصد شناخته شده است ژنتیک با تاثیر بر پروسه‌های متنوع فیزیولوژیکی شامل هومئوستازی هورمونی، اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرم موثر است (۵، ۲۴). یانگ و همکاران در سال ۱۹۹۸ در تحقیقی نشان دادند که سیکلوفسفامید موجب آسیب DNA می‌شود (۴۴).

اثرات ژنوتوکسیک سیکلوفسفامید بر روی سلول‌های زیای مرد به مرحله‌ای از تکامل ژرم‌سل‌ها که طی آن سلول در معرض دارو قرار می‌گیرد بستگی دارد. آزمایشات نشان داد که سلول‌های postmiotic بیشتر مستعد ابتلا به اثرات سیکلوفسفامید هستند. با این حال سلول‌های میتوزی و میوزی نیز به اثرات مخرب

اسپرم و دم ضروری است (۴۰). در طول شیمی درمانی سیستم آنتی‌اکسیداتی سلول‌های بدن ضعیف گشته و بدن را در برابر حمله رادیکال‌های آزاد مستعد می‌کند (۶). حمله رادیکال‌های آزاد به بافت بیضه باعث کاهش تعداد و تمایز رده‌های سلول-های جنسی و تخریب ساختار بافت بیضه می‌شود. ایجاد هر گونه ناهنجاری در بافت بیضه منجر به ایجاد اختلال در عملکرد سیستم تناسلی و کاهش توانایی باروری می‌شود و در صورت باروری می‌تواند نسل‌های بعد را هم تحت‌الشعاع قرار دهد. لذا هنگام استفاده از این داروها باید عوارض جانبی آنها را مد نظر قرار داد.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که اثر داروی سیکلوفسفامید بر بیان ژن‌های *odf1* و *ZBPB* در گروه دریافت‌کننده و گروه کنترل تفاوت معناداری دارد و به ترتیب  $7/5$  و  $7/26$  برابر کاهش یافته است ( $p \leq 0/05$ ). همچنین در این تحقیق به مقایسه تعداد اسپرم‌ها در دو گروه کنترل و تست پرداخته شد که در مقایسه انجام شده گروه تست تعداد اسپرم‌های آن نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. شاید بتوان گفت که کاهش تعداد اسپرم‌ها در میزان باروری رت‌های نر نژاد ویستار موثر باشد. بنابر این می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مصرف ترکیبات شیمی-درمانی مانند سیکلوفسفامید جهت مهار سلول‌های سرطانی، همراه با اثرات درمانی خود یکسری عوارض جانبی هم دارد. با توجه به نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده مطالعات کلینیکی و حیوانی بیشتری انجام گردد که بتوان از داروهای شیمی‌درمانی دیگر و یا سایر روش‌های شیمی‌درمانی در جهت کاهش این آسیب‌ها و عوارض بهره‌برد و نتایج این پژوهش بتواند گامی در

ODF1 یک عامل بالقوه در ناباروری مردان ایدیوپاتیک است. در بعضی موارد، قطعه‌میان‌ی به نظر می‌رسد که از لحاظ اندازه کاهش می‌یابد. از این رو، کاهش شدید بیان ODF1 یک نشانگر ناباروری مردان ایدیوپاتیک و یک محرک بالقوه این بیماری است (۸، ۳۴). پس کمبود Haplo از ODF1/HSPB10 در اسپرم موش باعث عدم تعادل حرکتی سر اسپرم می‌شود که به نحوی با تحرک اسپرم وابسته است باعث اثرات ناباروری این موش‌ها می‌شود. همچنین عدم بیان ژن ZBPB باعث اختلال در اتصال اسپرم به تخمک می‌شود. در تحقیق جوهری و همکارانش در سال ۹۵ متوجه شدند که تزریق داروی سیکلوفسفامید با توجه به اثر روی سلول‌های زایا به مقدار قابل قبولی در تخریب و آسیب به این سلول‌ها موثر است (۱۷). این مشاهده با تحقیق تاکادا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطابقت داشته که نشان دادند اسپرم و از این رو باروری مردان به شدت تحت تاثیر ODF1 از دم اسپرم و تنه‌ی آن به بستگی دارد. پروتئین اصلی الیاف متراکم دم اسپرم، ODF1/HSPB10، متعلق به خانواده پروتئین‌های شوک گرمایی کوچک است که تابع‌ای از chaperones مولکولی است. با این حال، تاثیر ODF1 بر شکل‌گیری دم اسپرم و تنه آن کاملاً شناخته شده نیست با این حال در این تحقیق موش‌های جهش‌یافته‌ای تولید گردید که در آن ژن ODF1 مختل شد. موش‌های نر جهش‌یافته هتروزیگوس بارور هستند در حالی که موش‌های نری با این روش به دلیل جدا شدن سر اسپرم نابارور هستند. اگرچه دم‌های بی‌سر به نوعی موتیل هستند، اما میکروسکوپ الکترونی انتقال، سازمان آشفته‌ای از میتوکندری و همچنین الیاف متراکم بیرون را آشکار کرد. نتایج این آزمایش به این ترتیب نشان می‌دهد که ODF1، علاوه بر درگیر شدن در درست کردن آرایش میتوکندری و الیاف متراکم بیرون، برای اتصال سفت و سخت از سر

sperm. *Reproductive Toxicology*, 291-297.

7. Ciancio G. 2004. A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate mofetil versus cyclosporine (NEORAL)/sirolimus in renal transplantation. II. Survival, function, and protocol compliance at 1 year. *Clinical Transplantation*, 77(2): 252-258.

8. Cooper T.G., Yeung C.H. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Radiotherapy Research*, 139(4): 97-102.

9. Donnahoo K.K., Shames B.D., Harken A.H., Meldrum D.R. 1999. The role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of Urology*, 162(1): 196-203.

10. Du K.N., Giddens D.P., Zarins C.K., Glasgow S. 1985. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.* pp: 293-302.

11. Ebisch I.M., Peters W.H., Thomas C.M. 2006. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub) fertile couple. *Human Reproduction*, 21(7): 1725-1733.

12. Eddy E.M. 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Review of Reproduction*, 4(1): 23-30.

13. Elias H., Hyde D.M. 1980. An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). *American Journal of Anatomy*, 59(4): 411-446.

14. El-Sayyad H.I., Ismail M.F., Shalaby F.M., Abou-El-Magd R.F., Gaur R.L., Fernando A., Raj M.H.G., Ouhtit A. 2009. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *International*

جهت کاهش میزان ناباروری افرادی که از داروهای شیمی درمانی استفاده می کنند برداشته باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه دکترای داروسازی می باشد که با کد اخلاق IR.IAU.PS.ReC.1399.176 در معاونت پژوهشی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد به ثبت رسیده است بدین وسیله نویسندگان مقاله از تمامی افرادی که در به ثمر نشستن این تحقیق سهمی داشته‌اند تشکر و قدردانی می نمایند.

### منابع

1. Aitken. R.J., Daseri G. 1999. The Amoroso Lecture "The human spermatozoon—a cell in crisis" *Journal of Reproduction and Fertility*, 11: 1-7.

2. Alipour M. 2014. Evaluation of Vegetative and Reproductive Characteristics and Distinctness of some Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes from Different Regions of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal*. 30(3): 507-529.

3. Anderson D., Bishop J.B., Garner R.C., Ostrosky-Wegman P., Selby P.B. 1995. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research*, 330: 115-121.

4. Bakhtiary Z. 2014. Protective Effect of Crocin on DNA Damage of Sperm and in Vitro Fertilization (IVF) in Adult Male Mice Treated with Cyclophosphamide. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 24(118): 45-59.

5. Breed W.G. 2004. The spermatozoon of Eurasian murine rodents: its morphological diversity and evolution. *Reproduction Biomedicine*, 261:52-69.

6. Castellani F., Chiara F., Cotelli A. 1998. Fine structure and cytochemistry of the morphogenesis of round-headed human

- induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Acta Medica Iranica*, 50(1): 1.
24. Kanno T.Y.N. 2009. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(2): 1-7.
25. Karantzoulis-Fegarar F. Antoniou H. Lai SL. Kulkarni G. D Abreo C. Wong GK. 1999. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(5): 3076-3093.
26. Kim S.H., Lee I.C., Baek H.S., Moon C.G., Kim S.H., Kim J.C. 2019. Protective effect of diallyl disulfide on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats. *Lab Animal Research*, 29(4): 204-211.
27. Kim KT, Yoo KM, Lee JW, Eom SH, Hwang IK, Lee CY. 2007. Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacol.* 11:443-450.
28. Kurdoglu B.G., Wilson N., Parchuri W.S., Ye M.L. Meistrich A. 1994. Protection from radiation induced damage to spermatogenesis by hormone treatment. *Radiotherapy Research*, 139(4): 97-102.
29. Liede K., Hietanen J., Saxen L. Haukka J., Timonen T., Hayrinen-Immonen, R. 1998. Long-term supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene and prevalence of oral mucosal lesions in smokers. *Oral Diseases* .4:78-83.
30. Lin Y.N., Roy A., Yan W., Burns K.H., Matzuk M.M. 1996. Loss of Zona Pellucida Binding Proteins in the Acrosomal Matrix Disrupts Acrosome Biogenesis and Sperm Morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 27(19): 6794-6805.
31. Malila N. Virtamo J. Virtanen M. *Journal of Biological Sciences*, 5(5): 466-473.
15. Elangovan N., Chiou T.J., Tzeng, W.F., Chu S.T. 2006. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*, 222(1-2): 60-70.
16. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *Natural England Journal of Medicine*. 17; (3):159-63.
17. Huang G.C. Wu LS. Chen L.G. Yang LL., Wang C.C. 2007. Immuno-enhancement effects of Huang Qi Liu Yi Tang in amurine model of cyclophosphamide-induced leucopenia. *Journal Ethnopharmacology*, 109: 229-235.
18. Jalali A.S., Hasanzadeh S., Malekinejad H. 2012. *Crataegus monogyna* aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Acta Medica Iranica*, 50(1): 1-8.
19. Jamieson E.R. S.J. Lippard .1999. Structure recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Review*, 99(1): 2467-2498.
20. Jiménez N., Krouwer V., Post J. A new. 2013. Rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology in mice. Cytotechnology*, 65(1): 1-14.
21. Jouhari H. 2019. Effect of hydroalcoholic extract of ginger on body weight, testicular weight and spermatogenesis in male rats undergoing chemotherapy of cyclophosphamide. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 17(5): 365-374.
22. Katoh M. 2003. Identification and characterization of human ZPBP-like gene in silico *National Academy of Science Journal*, 12(3): 399-404.
23. Katoh. Esi. 2003. Cyclophosphamide-

- in vivo and its simulation in vitro. In Mechanical forces and the endothelium. *CRC Press*, pp: 19-50.
39. Simsek N., Karadeniz A., Kalkan Y., Keles ON., Unal B. 2010. Spirulinaplatis feeding inhibited the anemia and leucopeniainduced Lead and cadmium in rats. *Journal of Hazardous Materials*, 164: 1304-1309.
40. Takada M.N.K., Shaw G.D., Marquette K.A., Tilney N.L. 2008. The cytokine-adhesion molecul. *Mutation Research*, 26(1): 285-295.
41. Verhaar M.C., Westerweel P.E., Van Zonneveld A.J., Rabelink T.J. 2004. Free radical production by dysfunctional eNOS. *Biology Reproduction*, 56(19): 494-495.
42. Whitmore S.A., Settasatian C., Crawford J., Lower K.M., McCallum B., Seshadri R., Cornelisse C.J., Moerland E.W., Cleton-Jansen A.M., Tipping A.J., Mathew C.G., Savnio M., Savoia A., Verlander P., Auerbach A.D., Van Berkel C., Pronk J.C., Doggett N.A., Callen D.F. 1998. Characterization and screening for mutations of the growth arrest-specific 11 (GAS11) and C16orf3 genes at 16q24.3 in breast cancer. *Genomics*, 52(3): 325-331.
43. Yang K., Meinhardt A., Zhang B., Grzmil P., Adham I.M., Hoyer-Fender S. 2012. The small heat shock protein ODF1/HSPB10 is essential for tight linkage of sperm head to tail and male fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 32(1): 216-225.
44. Yang T. 2005. Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes. *Biology of Reproduction*. 72(6): 1297-1304.
- Pietinen P., Albanes D., Teppo L. 2002. Dietary and serum alpha-tocopherol, beta-carotene and retinol, and risk for colorectal cancer in male smokers. *European Journal Clinical Nutrition*, 56: 615-621.
32. Mirfardi M., Johari H., Mokhtari M., Khah V., Jamali H., Allahverdi Q. 2013. Effect of garlic hydroalcoholic extract on testicular weight and spermatogenesis in Adult male rats undergo chemotherapy with cyclophosphalide. *Journal of University of Medical Sciences*. 409: 9-15.
33. Naseri M., Heydari Nasrabadi M., Khodarahmi P., Ahmadi F.S., Mojibi P., Aboutalebi H. 2011. Effect of alcoholic extract of Leek on spermatogenesis in male rats. *Journal of Cellular-Molecular Biotechnology*, 1(2): 61-65.
34. Nikrooesh M.R., Jalali M., Mohammadi S. 1988. Effect of raw onion cane on testicular tissue of mice. *Journal of Fertility and Infertility*, 10(4): 239-244.
35. Park H., Zhang Y., Georgescu S.P., Johnson K.L., Kong D., Galper J.B. 2006. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism. *Journal of Apply Toxicology and Angiogenesis*, 2(2): 93-102.
36. Paller M.S., Ferris T.F. 2007. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. Oxidative stress and vascular complication. *Diabetes Care*, 19(1): 257-267.
37. Rayman M.P. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64: 527-542.
38. Samet M., Lelkes P.I. 1999. The hemodynamic environment of endothelium