

بهنام پدرام

گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوسنگرد  
\*مستول مکاتبات : پست الکترونیکی :

b1pedram@gmail.com

کلمات کلیدی: سیسپلاتین، سگ، بیضه، هیستوپاتولوژی

(تاریخ دریافت ۹۴/۹/۲۵؛ تاریخ پذیرش ۹۴/۱۰/۳۰)

### چکیده:

سیسپلاتین یک داروی ضد سرطان میباشد اما دارای اثرات سمی شدید بروی بافت های مختلف بدن بخصوص کلیه ها، گوش ها و بیضه ها می باشد و بنابراین یکی از مهمترین عوارض جانبی آن ناباروری برگشت پذیر یا برگشت ناپذیر بعد از درمان با سیسپلاتین می باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت بیضه سگها بدنبال تجویز سیسپلاتین بعنوان یک عامل شیمی درمانی موثر جهت درمان تومور های جامد می باشد. در مجموع ۱۰ قلاده سگ نر بالغ از نژاد آمیخته ایرانی در این مطالعه انتخاب شدند (۷ آزمایش، ۳ کنترل). به حیوانات آزمایش سیسپلاتین با دوز ۰/۷۵ mg/kg بصورت داخل وریدی برای ۵ روز متوالی داده شد. معاینه بالینی روزی ۲ بار به منظور یافتن نشانه های مسمومیت با سیسپلاتین صورت گرفت. در روز ۲۸ مطالعه، بیضه ها با روش جراحی برداشته شده و مورد ارزیابی هیستوپاتولوژیکی قرار گرفتند. مشاهدات کلینیکی نیز مسمومیت با سیسپلاتین را نشان داد. در ارزیابی میکروسکپی آتروفی و دژسازس شدید لوله های منی ساز، کاهش شدید تعداد اسپرم ها، کم شدن سلول های ژرم و سرتولی، تخریب سلول های نزدیک مجرای لوله های منی ساز، مخروبه های سلولی در لومن لوله های منی ساز و کاهش در سلولهای لایدیگ همراه با فیبروز اطراف عروقی و حضور جابنت سل های چند هسته ای مشاهده گردید. در ارزیابی ماکروسکوپی بیضه ها کوچک تر بودند. این مطالعه برای اولین بار نشان می دهد که تجویز سیسپلاتین بصورت تکرار شونده در فواصل زمانی کم با دوز بالا در بیمارانی که مجبور به استفاده از این برنامه شیمی درمانی هستند، می تواند منجر به ناباروری و صدمات جدی به بیضه ها گردد.

### مقدمه

سیسپلاتین یک داروی ضد سرطانی خیلی موثر با خواص الکیله کنندگی دی ان ای بوده و در درمان انواع تومور های جامد از قبیل بیضه، مثانه، تخمدان، سرویکس، اندومتریوم، سر، گردن و ریه کاربرد دارد. استفاده بالینی وسیع از آن محدود است چون سیسپلاتین اثرات نامطلوب بروی بیضه ها، کلیه ها، اعصاب محیطی و گوش داخلی دارد. اما نارسایی عملکرد کلیه بر اثر آن مهمترین عارضه جانبی سیسپلاتین میباشد. (۱ و ۲). سیسپلاتین از موثرترین و متداولترین داروهای رایج در درمان سرطان بیضه نیز محسوب می شود. (۳) یکی از عوارض جانبی سیسپلاتین، اثرات سمی آن بروی بافت بیضه می باشد که منجر به اختلال در اسپرم سازی و ناباروری می گردد که ممکن است برگشت ناپذیر هم باشند. (۵و۴) اختلال در اسپرم سازی ممکن است موقت یا دائمی باشد (۶)

پایه بیوشیمیایی مسمومیت با سیسپلاتین مربوط به تولید رادیکال های آزاد در این بافت ها میباشد. مکانیسم سلولی در آسیب بیضه توسط سیسپلاتین به خوبی شناخته نشده است. به هر حال مطالعات گوناگون نشان داده اند که سیسپلاتین باعث استرس های اکسیداتیو بوسیله تولید رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن میشود (ROS). (۷-۹). زمانیکه رادیکال های آزاد در مقادیر زیاد تولید شوند (ROS) باعث شکست دی ان ای و از دست دادن فعالیت اسپرم ها همراه با آسیب پروکسیداتیو به غشای میتوکندری ها و اسپرم ها میشوند. بعلاوه اسپرماتوزوا ها به آسیب پروکسیداتیو حساس ترند چون غلظت بالایی از اسید های چرب اشباع نشده و گنجایش آنتی اکسیدانی ضعیف تری دارند. (۱۰)

سیسپلاتین از رایجترین عوامل درمانی سیتوتوکسیکی برای درمان سرطان های مختلف می باشد که در دوز موثر بالا ممکن است اثرات نامطلوبی مانند نفروتوکسیسیته، ژنوتوکسیسیته داشته باشد (۱۱) هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بیضه سگ های درمان شده با سیسپلاتین با دوز ۰/۷۵ میلی گرم پر کیلو گرم برای ۵ روز متوالی می باشد.

مواد و روش کار:

حیوانات و نگهداری آن ها

در یک مطالعه ۲۸ روزه و در یک موسسه تحقیقاتی مجهز به آزمایشگاههای مدرن از سگ های ۱ ساله، مذکر و نژاد آمیخته ایرانی به تعداد ۱۰ عدد (۷ آزمایش، ۳ کنترل) و میانگین وزنی ۲۴ کیلو گرم استفاده شد. حیوانات در قفس های فلزی بطور انفرادی نگه داری شدند. مراقبت و تغذیه از حیوانات توسط کارگران آموزش دیده موسسه سرم و واکسن سازی رازی اهواز صورت گرفت و روزانه ۲ بار به آنها غذا داده می شد. آب بصورت دائم در اختیار آنها بود. به حیوانات گروه آزمایش برای ۵ روز متوالی سیسپلاتین بصورت خالص با دوز ۰/۷۵ mg/kg تجویز شد. سیسپلاتین به صورت داخل رگی و از طریق ورید سفالیک به آمستگی در طی ۱ دقیقه تزریق می شد.

مشاهدات بالینی

معاینات بالینی از همه سگ ها در روز قبل از آزمایش شروع شد و تا پایان دوره ادامه داشت. معاینات روزی ۲ بار صورت گرفت یکبار صبح ساعت ۱۰ و یک بار بعد از ظهر در ساعت ۵. نشانه های مسمومیت از قبیل کاهش غذا خوردن و آشامیدن، تغییر در رفتار و تحرک، کم آبی،

زخم های دهانی، استفراغ و مرگ ومیر مورد بررسی قرار می گرفتند. در این پژوهش به جهت کنترل مرگ ومیر به خاطر کم بودن تعداد نمونه ها، اقدامات درمانی هم صورت گرفت که این کار منجر به زنده ماندن تمامی سگ ها تا پایان دوره تحقیق شد.

تهیه برش های بافتی

برش بافتی از بیضه ها در روز ۲۸ مطالعه تهیه شد. سگها در روز ۲۸ با تجویز کتامین هیدرو کراید ۱۰ درصد محصول کمپانی alfasan کشور هلند (۲۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و آسپرومازین ۱ درصد محصول کمپانی alfasan کشور هلند (۰.۰۲ میلی لیتر به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) بیهوش شده سپس با ایجاد یک شکاف کوچک در ناحیه اسکروتوم بیضه مربوطه و پس از دابل لیگاتور طناب بیضه، بیضه ها برداشت و پس از شستشو و ایجاد یک برش طولی بلافاصله در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. نمونه ها با کمک الکل (اتانول) آبیگری و با استفاده از تولوئن شفاف سازی شدند. سپس نمونه ها توسط پارافین مذاب قالب گیری شده و با استفاده از میکروتوم (Cambrige Medical Instruments, United Kingdom) برش هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. نمونه ها با هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شده و با کمک میکروسکوپ نوری (Olympus CX۲۳) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج:

مشاهدات بالینی

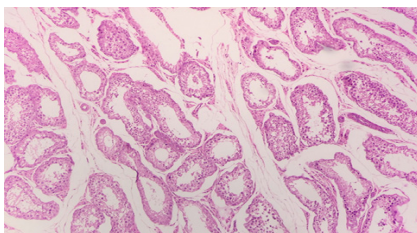
جهت بررسی بهتر عملکرد کلیه ها اقدام به اخذ معاینه بالینی جهت تفسیر بهتر نتایج گردید. لذا نشانه های مسمومیت با سیسپلاتین بصورت بالینی مورد بررسی قرار گرفت. خلاصه نتایج بالینی ۱۰ قلابه سگ آزمایش (۷-۱) و کنترل (۸-۱۰) در جدول شماره (۱) آمده است. از نتایج بدست آمده مشخص گردید که در گروه آزمایش تغییرات بالینی رخ داده است. همانطوری که مشاهده می گردد تمامی سگهای گروه آزمایش دارای علائم بالینی مسمومیت با سیسپلاتین شده اند.

گروه سگ	شماره سگ	کاهش غذا خوردن	کاهش اشتها	تغییر در رفتار و تحرک	کم آبی زخم های دهانی	زخم های استفراغ	مرگ و میر
آزمایش	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+
کنترل	8	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-

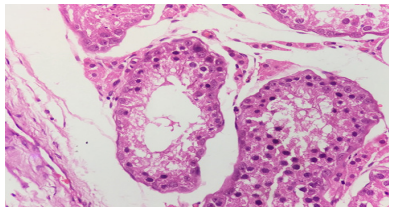
جدول (۱) علائم بالینی مشاهده شده ۱۰ قلابه سگ در طی ۲۸ روز مشاهدات هیستوپاتولوژیکی:

۲۸ روز پس از تجویز اولین دوز از سیسپلاتین، بافت بیضه سگها مورد بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی قرار گرفت. در این مطالعه دژرسانس شدید و آتروفی در اپیتلیوم لوله های منی ساز همراه با تخلیه سلول های ژرم و سرتولی مشاهده گردید. در مرکز لوله های منی ساز توده های بزرگی از سلول های نکروزه و جدا شده دیده می شد. تخریب سلول های نزدیک مجرا به وضوح مشاهده میگردید. همچنین کم شدن شدید اسپرماتید ها به وضوح رویت میشد. تعداد سلول های لایدیگ نیز کم شده و شکل گیری جاینت سل های چند هسته ای مشاهده

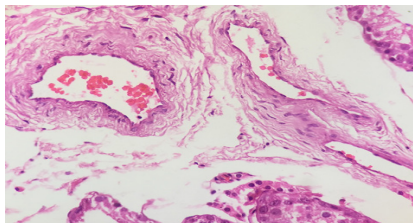
برخی از این جراحات بافتی در شکل های ۱ الی ۴ نمایش داده شده اند.



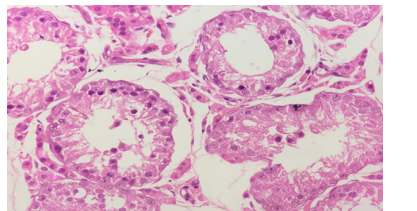
شکل ۱- آتروفی و دژرسانس لوله های منی ساز هماتوکسیلین- ائوزین (۱۰۰x)



شکل ۲- تخریب اپیتلیوم ژرمینال و سلول های سرتولی هماتوکسیلین- ائوزین (۴۰۰x)



شکل ۳- فیروز اطراف عروقی هماتوکسیلین- ائوزین (۴۰۰x)



شکل ۴- کاهش سلول های لایدیگ و اسپرماتید ها هماتوکسیلین- ائوزین (۴۰۰x) بحث

مطالعه حاضر جهت ارزیابی شدت جراحات بافتی در بیضه سگهای درمان شده با سیسپلاتین با دوز ۰/۷۵ میلیگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن طی ۵ روز متوالی صورت گرفت. مشاهدات بالینی مسمومیت با سیسپلاتین را به وضوح نشان داد. در مطالعه حاضر جهت مشخص نمودن الگوی جراحی و شدت آسیب پذیری انواع مختلف سلول های پارانشیم بافت بیضه، اقدام به بررسی هیستوپاتولوژیکی اثرات سیسپلاتین در بافت بیضه نمودیم. مشاهدات قبلی نشان داده است که سیسپلاتین به عنوان یک داروی شیمی درمانی جهت درمان انواع سرطان کاربرد دارد (۱۲ و ۱۳) و بعنوان یک بخش جدایی ناپذیر در درمان هر دو تومور ژرم سمینوماتوز و غیر سمینوماتوز مورد استفاده قرار می گیرد همچنین بعنوان یک دارو جهت درمان پس از جراحی برای تومور ژرم سل پیشرفته، به تنهایی و یا بصورت ترکیب با etoposide برای ۴ دوره و یا بصورت ترکیب با bleomycin and etoposide برای ۳ دوره بکار میرود

تجویز سیسپلاتین در مدت طولانی سبب سرکوب محور فوقانی هیپوفیز - بیضه شده که خود منجر به کاهش تستوسترون و کاهش آزاد سازی LH و FSH میشود. (۱۵). تزریق سیسپلاتین باعث مهار مشخص در تحرک اسپرم ها می گردد. (۱۶). در مطالعات دیگر محققان ذکر شده که تجویز سیس پلاتین باعث کاهش وزن بدن و دستگاه تناسلی در مقایسه با حیوانات کنترل می شود (۱۷ و ۱۸) در مطالعه حاضر نیز کاهش وزن بدن و کاهش وزن بیضه ها مشاهده گردید. که علت کاهش سایز بیضه هاست می تواند مربوط به آتروفی پارانشیم بیضه ها باشد که بخوبی در شکل شماره یک می توان آن را دید. اما کاهش وزن بدن مربوط به استفراغ های پس از تجویز سیسپلاتین و سوء تغذیه و بی اشتها می باشد حاصل از اثرات سیستمیک سیسپلاتین می باشد. در پژوهشی دیگر گزارش شده است که تجویز سیسپلاتین در موش ها باعث کاهش تعداد اسپرم ها و تحرک آنها می شود و تغییر یافتن ساختار هیستوپاتولوژیکی بیوشیمیایی منجر به آتروفی پارانشیمی گردیده است. همچنین بررسی های هیستوپاتولوژیکی نیز دژرسانس شدید، نکروز و کاهش در لوله های منی ساز را در کنار کاهش در ضخامت اپیتلیوم ژرمینال در بیضه موش های درمان شده با سیسپلاتین نشان داد (۱۹). در مطالعه حاضر مشخص شد که سیسپلاتین باعث تغییرات بافتی در بیضه شده است. تغییرات بافتی شامل دژرسانس شدید و آتروفی لوله های منی ساز، کم شدن ژرم سل ها، نقص در سنتز اسپرمها، شکل گیری جاینت سل های چند هسته ای به همراه کاهش سلول های سرتولیو سلول های لایدیگ و فیروز اطراف عروقی بوده است که برخی از این ضایعات در تصاویر ۲ الی ۴ نشان داده شده است. پروتئین های بیضه برای روند اسپرماتونژنز و بلوغ اسپرم ها لازم میباشد (۲۰) بنابراین کاهش معنی دار در غلظت پروتئین های بیضه بر اثر تجویز سیسپلاتین باعث اختلال در بلوغ اسپرم ها می شود (۲۱). در تحقیقی که توسط (Yusuf et al, ۲۰۰۸) بروی موش ها با تجویز سیسپلاتین با دوز ۷ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن طی ۵ روز متوالی مشخص شد که تعداد لایه های اپیتلیال لوله های منی ساز کاهش و بلوغ اسپرم ها متوقف شد (۲۲) که با یافته های موجود در مطالعه حاضر مشابه میباشد.

نتیجه گیری: این مطالعه برای اولین بار بدنال تجویز سیسپلاتین طی ۵ روز متوالی در سگ نشان داد که تغییرات سلولی در بافت بیضه ایجاد میشود که میتواند منجر به آسیب شدید به بیضه ها و در نتیجه ناباروری گردد. بنابراین به بیماران که مجبور به استفاده از این برنامه درمانی و یا برنامه درمانی مشابه آن هستند باید آگاهی کامل از خطرات موجود در زمینه ناباروری احتمالی داده شود.

منابع

- Atesxxahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribas A, Kraoglu A. Effects of ly-copene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. Toxicology 2005;212:116-23.
- Stadnicki SW, Fleischmann RW, Schaeppi U, Merriam P. Cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875): hearing loss and other toxic effects in rhesus monkeys. Cancer Chemother Rep 1975;59:467-80.
- Kart A, Cigremis Y, Karaman M, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. Exp Toxicol Pathol. 2010;62:45-52.
- Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, et al. Antioxidative effect of froyal jelly in cisplatin-induced testes damage. Urology. 2009;74:545-551.
- Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. J Natl Cancer Inst Monogr. 2005;34:6-8.
- Cherry SM, Hunt PA, Hassold TJ. Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination chromosome segregation. Mutat Res. 2004;564:115-128.
- Das UB, Mallick M, Depnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl 2002;4:201-7.
- Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, Depnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. Drug Chem Toxicol 2002;25:281-92.
- Manda K, Bhatia AL. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. Cell Biol Toxicol 2003;19:367-72.
- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol Cell Endocrinol 2004;216:31-9.
- Katzung BG (2004). Basic and Clinical Pharmacology, 9th edition, McGraw Hill.
- Rebillard A, Lagadic-Gossman D, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. Curr Med Chem 2008; 15 (26): 2656-2663.
- Park GY, Wilson JJ, Song Y, Lippard SJ. Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109 (30): 11987-11992.
- Xiao H, Mazumdar M, Bajorin DF et al. Long-term follow-up of patients with good-risk germ cell tumors treated with etoposide and cisplatin. J Clin Oncol 1997;15:2553-58.
- Pogach LM, Lee Y, Giglio W, Naumoff M, Huang HF. Zinc acetate pretreatment ameliorates cisplatin-induced Sertoli cell dysfunction in Sprague-Dawley rats. Cancer Chemother Pharmacol 1989; 24 (3): 177-180.
- Ate ahin A, Sahna E, Turk G, Ceriba i AO, Yilmaz S, Yuce A, Bulmu O. Chemo-protective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. J Pineal Res 2006; 41 (1): 21-27.
- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999;76:4-33.
- Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. Clin Chem 1993;39:2522-8.
- Haafiza Shaikh et al. Chemo-protective effect of turmeric and spirulina on cisplatin induced toxicity in reproductive system of male albino rat, rattus norvegicus. Indo American Journal of Pharm Research. 2013;3(9).
- Kasturi M, Manivannan B, Ahmed NR, Shaikh PD, Pattan KM. Changes in epididymal structure and function of albino rat treated with Azadirachta indica leaves. Indian J Expt Biol 1995; 33 (10): 725-729.
- Yakubu MT, Akanji MA, Oladiji AT. Effects of oral administration of aqueous extract of Fadogia agrestis (Schweinf. Ex Hiern) stem on some testicular function indices of male rats. J Ethnopharmacol 2008; 115 (2): 288-292.
- Yusuf Ozlem Ilbey, Emin Ozbek, Abdulmuttalip Simsek, Alper Otuntemur, Mustafa Cekmen, Adnan Somay. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. Fertility and Sterility 2009; 92(3): 1124-1132.