Original Paper

Effect of Oxaliplatin on sperm parameters of 60 days old offspring during pre-pregnancy, pregnancy and lactation period in mice

Moslem Dahmardeh (DVM), Ph.D Candidate in Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3461-8189

***Javad Sadeghinezhad (Ph.D)**, **Corresponding Author**, Associate Professor, Department of basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. **E-mail: sadeghinezhad@ut.ac.ir** ORCID ID: 0000-0003-0735-8788

Zahra Tootian (Ph.D), Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1260-080X

Mojdeh Salehnia (Ph.D), Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7861-2232

Abstract

Background and Objective: Oxaliplatin is the main agent used in the treatment of colorectal cancers. Oxaliplatin inhibits DNA replication and transcription and to induce apoptosis or necrosis in cancer cells and rapidly dividing cell lines. This study was designed to determine the effect of Oxaliplatin on sperm parameters of 60 days old offspring during pre-pregnancy, pregnancy and lactation period in mice.

Methods: In this experimental study, 32 female NMRI mature mice were randomly allocated into 4 groups. Animals in control group were received 0.2 ml saline intraperitoneally (IP) during 21 days of pre-pregnany, pregnancy and lactation periods. Animals in experimental groups including pre-pregnant, pregnant and lactation groups were received 3 mg/kg oxaliplatin trice a week IP during 21 days before mating, during pregnancy and lactation periods, respectively. At the 60th postnatal day, all the male offspring were euthanized and sperm samples were obtained. Analysis of sperm parameters including count, motility, vitality, maturation and DNA integrity was done.

Results: Sperm count, motility and DNA integrity were significantly reduced in all three groups of Pre-pregnancy, pregnancy and lactation in comparison with control group ($P<0.05$). Moreover, the percentage of immature and dead sperms were significantly increased in oxaliplatin groups ($P<0.05$).

Conclusion: Admistration of oxaliplatin induces adverse effect on sperm quality in perinatal period. The greatest effect of this drug is on lactation period. Also, by increasing the time interval for oxaliplatin administration in mice to puberty of offspring, the adverse effects of this drug on the quality of sperm parameters are reduced.

Keywords: Oxaliplatin, Sperm quality, Perinatal period, Spermogram, Mice

Received 26 Nov 2018 **Revised** 21 Jan 2019 **Accepted** 22 Jan 2019

Cite this article as: Dahmardeh M, Sadeghinezhad J, Tootian Z, Salehnia M. [Effect of Oxaliplatin on sperm parameters of 60 days old offspring during pre-pregnancy, pregnancy and lactation period in mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Spring; 22(1): 50-56. [Article in Persian]

تحقیقی

اثر اگزالی پلاتین بر پارامترهای اسپرم موالید ۶۰ روزه در دوره‌های قبل بارداری، بارداری و شیرواری موش‌های سوری

دکتر مسلم دهمرده، دانشجوی دکتری تخصصی آناتومی و جنین شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0002-3461-8189
*** دکتر جواد صادقی نژاد**، دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0003-0735-8788
دکتر زهرا طوطیان، استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0002-1260-080X
دکتر مژده صالح نیا، استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0001-7861-2232

چکیده

زمینه و هدف: *اگزالی پلاتین درمان اصلی سرطان‌های کولورکتال بوده و با مهار تکثیر و نسخه برداری DNA ،سبب آپوپتوز و نکروز در سلول‌های سرطانی و رده سلول‌های با تکثیر بالا می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی شیمی درمانی اگزالی پلاتین بر پارامترهای اسپرم موالید ۶۰ روزه در دوره پیرازایشی (قبل بارداری، بارداری و شیرواری) موش‌های سوری انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی تعداد ۳۲ سر موش بالغ ماده نژاد NMRI به‌صورت تصادفی در ٤ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. موش‌های گروه کنترل ۰/۲میلی‌لیتر نرمال سالین را به‌صورت داخل صفاقی طی ۲۱روز قبل بارداری، بارداری و شیرواری دریافت کردند. گروه‌های تجربی شامل گروه‌های قبل بارداری، بارداری و شیرواری داروی اگزالی پلاتین را به میزان ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ۳ بار در هفته به صورت داخل صفاقی طی ۲۱ روز به‌ترتیب قبل از جفت‌گیری، طی بارداری و بعد از زایمان دریافت کردند. در روز ۶۰ بعد از تولد همه موالید در آزمایشگاه جنین‌شناسی آسان کشی شده و نمونه‌های اسپرم دریافت گردید. ارزیابی پارامترهای اسپرم شامل تعداد، تحرک، زنده مانی، بلوغ و کیفیت کروماتین انجام شد.*

یافته‌ها: *تعداد، تحرک و یکپارچگی DNA اسپرم در هر سه گروه تجربی، قبل بارداری، بارداری و شیرواری در مقایسه با گروه کنترل به‌طور چشمگیری کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). علاوه بر این، درصد اسپرم‌های نابالغ و مرده در گروه‌های دریافت کننده اگزالی پلاتین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *استفاده از داروی اگزالی پلاتین منجر به القای اثرات نامطلوب بر روی کیفیت اسپرم در دوره پیرازایشی می‌شود. بیشترین تاثیر این دارو در دوره شیرواری بود. همچنین با افزایش فاصله زمانی تجویز داروی اگزالی پلاتین در موش‌های مادر تا بلوغ موالید نر، اثرات سوء ناشی از استفاده از این دارو بر کیفیت پارامترهای اسپرم کاهش می‌یابد.*

کلید واژه‌ها: *اگزالی پلاتین ، کیفیت اسپرم ، دوره پیرازایشی ، اسپرموگرام ، موش سوری*

* نویسنده مسؤول : دکتر جواد صادقی نژاد ، پست الکترونیکی sadeghinezhad@ut.ac.ir
نشانی : تهران، خیابان آزادی، نبش خیابان دکتر قریب، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، تلفن ۶۱۱۱۷۱۱۶-۰۲۱، نمابر ۶۶۹۲۹۵۳۲
وصول مقاله: ۱۳۹۷/۹/۵ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱۱/۱ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۲

مقدمه

داروی شیمی درمانی اگزالی پلاتین (Oxaliplatin) به‌طور گسترده برای درمان سرطان‌های کولون و رکتوم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). این دارو در سال ۲۰۰۲ میلادی توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) مورد تایید قرار گرفته است. این دارو با نام‌های Diaminocyclohexane Oxaloplatinium، Eloxetin و L- OHP نیز شناخته می‌شود. این دارو از طریق پیوند متقاطع کمپلکس‌های پلاتین با مولکول‌های DNA از تکثیر و نسخه‌برداری سلولی جلوگیری می کند و احتمالاً روی سلول‌های جنسی که دارای تقسیمات سلولی و فرآیندهای تمایز پیچیده طی تکوین هستند؛ می تواند موثر باشد (۲). مطالعه در مورد اثر این دارو بر اندام‌های تناسلی و قدرت باروری محدود است. Levi و همکاران سمیت این دارو را در گنادهای جنسی گزارش کردند (۳). علاوه برآن آپوپتوز سلول‌های لیدیگ بیضه نیز متعاقب تجویز اگزالی پلاتین گزارش شده است (۴و۵).

گزارشات مختلفی در رابطه با استفاده از داروی اگزالی پلاتین در زمان بارداری زنان مبتلا به سرطان کولورکتال وجود دارد (۶و۷). از این رو انجام شیمی‌درمانی با استفاده از این دارو برای درمان سرطان در کنار حفظ بارداری زنان امری اجتناب‌ناپذیر به‌نظر می‌رسد.

از آنجایی که توسعه و تکوین ساختارهای مختلف بدن از جمله گنادهای جنسی در دوره‌های خاصی قبل و یا حتی بعد از تولد روی

می‌دهد و با توجه به اهمیت حفظ سلامت باروری نوزادان در کنار درمان مادران مبتلا به سرطان در دوره‌های قبل بارداری، بارداری و شیرواری؛ مطالعه‌ای در رابطه با اثر داروی اگزالی پلاتین بر روی پارامترهای اسپرم مواليدی که والدینشان توسط این دارو شیمی‌درمانی شده‌اند؛ یافت نشد. علاوه بر آن هیچگونه مطالعه‌ای مبنی بر اثر این دارو بر کیفیت اسپرم موش‌های بالغ نیز یافت نشد.

براین اساس ارزیابی دقیق اثرات داروی اگزالی پلاتین طی تجویز در دوران پیرازایشی بر روی پارامترهای اسپرم موالید می‌تواند به عنوان شاخص‌های باروری نر، در اتخاذ روش‌های مناسب درمانی برای حفظ باروری موالید ضمن دوره شیمی‌درمانی مادران مناسب باشد. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی شیمی درمانی اگزالی پلاتین بر پارامترهای اسپرم موالید ۶۰ روزه در دوره پیرازایشی موش سوری انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۲ سر موش بالغ ماده نژاد NMRI با وزن تقریبی ۳۵ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران در گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران طی سال ۱۳۹۷ انجام شد.

پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. حیوانات با حفظ شرایط ۱۲ ساعت روشنایی – تاریکی، دمای ۲۶-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی نگهداری شدند. پس از عادت با شرایط محیط برای جفت گیری دو موش ماده به ازای یک موش نر در هر قفس درنظر گرفته شدند. پس از گذشت ۱۲ ساعت، پلاک واژن بررسی و موش‌های بارور جداسازی شدند. حیوانات به صورت تصادفی در چهار گروه هشت تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه اول (کنترل): به هر موش در سه دوره ۲۱ روزه قبل از بارداری، طی بارداری و شیرواری به مدت سه روز در ابتدای هر هفته، هر روز ۰/۲ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

گروه دوم (قبل بارداری): به هر موش در دوره ۲۱ روزه قبل از آبستنی در سه روز ابتدای هر هفته، هر روز به میزان ۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۸) به روش داخل صفاقی داروی اگزالی پلاتین تزریق شد.

گروه سوم (گروه باردار): به هر موش در دوره ۲۱ روزه بارداری در روزهای صفر، ۱، ۲، ۷، ۸، ۹، ۱۴، ۱۵ و ۱۶، یک بار به میزان ۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به روش داخل صفاقی داروی اگزالی پلاتین تزریق شد.

گروه چهارم (گروه شیروار): به هر موش در دوره ۲۱ روزه شیرواری در روزهای ۱، ۲، ۳، ۸، ۹، ۱۰، ۱۵، ۱۶ و ۱۷ داروی اگزالی پلاتین به‌صورت داخل صفاقی به میزان ۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد.

پس از روز ۲۱ ام بعد از تولد (P21)، موالید از موش‌های مادر جدا شدند و در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. از آنجایی که بلوغ جنسی در موش سوری در ۸-۶ هفتگی رخ می‌دهد؛ موالید به دست آمده از هر گروه پس از بلوغ کامل در روز ۶۰ ام بعد از تولد (P60) مورد آنالیز اسپرم قرار گرفتند (۹).

پس از آسان کشی، استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم انجام شد. بدین منظور پس از باز کردن محوطه شکمی، دم اپیدیدیم از بیضه جدا و پس از ایجاد چندین برش در آن، به میکروتیوب حاوی محیط T6 دارای ۱۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر BSA منتقل شد. سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه برای خروج اسپرم‌ها قرار گرفت. برای ارزیابی پارامترهای اسپرم، خصوصیاتی از جمله تعداد، تحرک، قابلیت حیات، بلوغ و کیفیت کروماتین هسته اسپرم مورد محاسبه قرار گرفت.

برای شمارش اسپرم‌ها رقت یک به ۲۰ تهیه شد. برای این منظور در داخل یک میکروتیوب یک میلی‌لیتری ۳۸۰ میکرولیتر PBS ریخته و سپس به آن ۲۰ میکرولیتر از اسپرم مورد نظر اضافه شد. پس از مخلوط شدن محلول به دست آمده، ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام نئوبار دارای لامل سنگی ریخته شد و شمارش تعداد اسپرم‌ها انجام شد (۱۰).

برای سنجش وضعیت تحرک اسپرم مقدار ۱۰ میکرولیتر از میکروتیوب حاوی اسپرم بر روی لام ریخته شد و پس از لامل‌گذاری به سرعت به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۲۰ ارزیابی انجام شد و درصد تحرک اسپرم‌ها براساس سه نوع حرکت پیشرونده (PR)، غیرپیشرونده (NP) و بی‌حرکت (IM) بیان گردید (۱۰).

برای ارزیابی حیات اسپرم از روش رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از میکروتیوب حاوی اسپرم را در گوشه یک لام با میزان مساوی از محلول ائوزین ترکیب کرده و پس از گذشت ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی نگروزین نیز به آن اضافه شد و پس از تهیه اسمیر و خشک شدن لام‌ها در محیط، با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ میزان حیات اسپرم‌ها، به صورت درصد اسپرم‌های زنده (اسپرم‌های دارای رنگ صورتی) و مرده (اسپرم های بی‌رنگ) بیان گردید (۱۱).

برای مطالعه بلوغ اسپرم از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد به طوری که از سوسپانسیون اسپرم ۲۰ میکرولیتر برداشتیم و در گوشه لام ریخته و سپس به وسیله یک لام دیگر اسمیر تهیه گردید. لام پس از خشک شدن در محیط آزمایشگاه، به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی استون-اتانول به نسبت ۱:۱ قرار داده شد. پس از

خشک شدن مجدد، لام هفت دقیقه در ظرف حاوی محلول رنگ آنیلین بلو قرار گرفت و پس از خشک شدن نهایی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. در این رنگ‌آمیزی نتایج براساس درصد اسپرم‌های نابالغ (دارای هیستون زیاد به رنگ آبی تیره مایل به خاکستری) و درصد اسپرم‌های بالغ (رنگ‌پذیری کمتر) بیان گردید (۱۲).

برای ارزیابی کیفیت کروماتین هسته اسپرم، همانند روش فوق پس از تهیه اسمیر از سوسپانسیون اسپرم و تثبیت آن در محلول استون-اتانول، لام‌ها به مدت هفت دقیقه در ظرف حاوی محلول رنگ آکریدین اورنج و در محیط تاریک قرار گرفتند و پس از خشک شدن نهایی به وسیله میکروسکوپ فلورسانت و بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مشاهده شدند. در این رنگ‌آمیزی نتایج به صورت درصد اسپرم‌های دارای DNA شکسته شده (رنگ زرد تا قرمز) و درصد اسپرم‌های دارای DNA سالم (سبز رنگ) بیان شد (۱۳).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی (بر اساس میانگین و انحراف معیار) در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

مصرف داروی اگزالی پلاتین سبب کاهش آماری معنی‌دار میانگین تعداد اسپرم گروه باردار (گروه سوم، ۳۰/۳±۳/۲ میلیون در میلی‌لیتر) و گروه شیروار (گروه چهارم، ۲۶/۲±۳ میلیون در میلی‌لیتر) نسبت به گروه کنترل (۴۱±۲ میلیون در میلی‌لیتر) گردید (P<۰/۰۵). همچنین میانگین تعداد اسپرم در گروه قبل از بارداری (گروه دوم، ۳۵/۳±۲/۸ میلیون در میلی‌لیتر) نسبت به گروه شیروار دارای اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود. این در حالی است که مابین گروه‌های کنترل و دوم، گروه‌های دوم و سوم و نیز بین گروه‌های سوم و چهارم اختلاف آماری معنی‌داری یافت نشد.

آنالیز اسپرم در مورد حرکت نشان داد که درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده در گروه‌های سوم (۶۴/۶±۲/۶ درصد) و چهارم (۴۷/۳±۲/۷ درصد) نسبت به گروه کنترل (۸۳/۲±۳/۸ درصد) و گروه دوم (۷۸/۵±۳/۳ درصد) کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین این اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های سوم و چهارم نیز مشاهده شد (P<۰/۰۵). این در حالی است که درگروه کنترل نسبت به گروه دوم اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. در مورد درصد اسپرم های دارای حرکت غیرپیشرونده هیچگونه اختلاف آماری معنی‌داری مابین گروه‌های کنترل (۴/۸±۳ درصد)، دوم (۵/۲±۱/۶ درصد)، سوم (۴/۲±۱/۱ درصد) و چهارم (۴/۶±۰/۷ درصد) مشاهده نشد. تعداد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه‌های سوم (۳۱/۱±۱/۹ درصد) و چهارم (۴۸±۳/۳ درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل (۱۱/۹±۲/۴ درصد) و دوم (۱۶/۲±۳ درصد) افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین این اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های سوم و چهارم نیز مشاهده شد (P<۰/۰۵). این در حالی است که درصد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه کنترل نسبت به گروه دوم هیچگونه اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد.

میانگین درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های تجربی (قبل بارداری، طی بارداری و شیرواری) نسبت به گروه کنترل کاهش تدریجی نشان داد. به‌طوری که میانگین درصد اسپرم‌های زنده بین گروه‌های کنترل (۸۰/۹±۳/۹ درصد)، دوم (۶۹±۱/۴ درصد)، سوم (۵۵/۳±۲/۱ درصد) و چهارم (۳۲/۵±۳/۳ درصد) اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). علاوه بر آن میانگین درصد اسپرم‌های مرده در گروه دوم (۳۰/۹±۱/۴ درصد)، گروه سوم (۴۴/۶±۲/۱ درصد) و گروه چهارم (۶۷/۴±۳/۳ درصد) نسبت به گروه کنترل (۱۹±۳/۹ درصد) افزایش آماری معنی‌دار یافت (P<۰/۰۵).

ارزیابی میانگین درصد اسپرم با هسته بالغ نشان داد که کاهش آماری معنی‌داری در اسپرماتوزوئیدهای گروه سوم (۸۶/۲±۱ درصد) و گروه چهارم (۸۱/۲±۲ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۹۳±۰/۹ درصد) وجود دارد (P<۰/۰۵). این اختلاف آماری معنی‌دار مابین گروه دوم (۸۸/۹±۲/۲ درصد) و گروه چهارم و مابین گروه‌های سوم و چهارم نیز مشاهده شد (P<۰/۰۵). هیچگونه اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه دوم و همچنین گروه دوم در مقایسه با گروه سوم مشاهده نشد. در مورد میانگین درصد اسپرم با هسته نابالغ، در گروه سوم (۱۳/۸±۱ درصد) و گروه چهارم (۱۸/۷±۲ درصد) نسبت به گروه کنترل (۶/۹±۰/۹ درصد) افزایش آماری معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). علاوه بر آن اختلاف آماری معنی‌داری به صورت روند افزایشی بین گروه دوم (۱۱±۲/۲ درصد) و گروه چهارم و نیز مابین گروه‌های سوم و چهارم مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مورد میانگین درصد اسپرم با هسته نابالغ از دیدگاه عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها، می‌توان به رابطه بین گروه کنترل و گروه دوم و نیز گروه دوم در مقایسه با گروه سوم اشاره نمود.

در بررسی‌های حاصل از رنگ‌آمیزی آکریدین- اورنج، درصد اسپرم‌های دارای DNA سالم در گروه کنترل در مقایسه با سه گروه تجربی اختلاف قابل توجهی نشان داد. به‌طوری که میانگین درصد اسپرم‌ها با DNA سالم در گروه دوم (۷۵/۹±۳ درصد)، گروه سوم (۵۱/۸±۴/۷ درصد) و گروه چهارم (۳۸/۵±۳/۳ درصد) نسب به گروه کنترل (۹۳±۰/۹ درصد) کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). در مورد درصد اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده، افزایش آماری معنی‌داری بین اسپرماتوزوئیدهای گروه سوم

(۴/۷±۴۸/۱ درصد) و گروه چهارم (۳/۴±۶۱/۴ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۲/۷±۱۸/۳ درصد) مشاهده شد (P<۰/۰۵). علاوه بر آن این اختلاف آماری معنی‌دار در بین گروه دوم (۱۶/۴±۳۸/۷ درصد) و گروه چهارم نیز وجود داشت (P<۰/۰۵). این در حالی است که در مورد درصد اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده، هیچگونه اختلاف آماری معنی‌داری مابین گروه کنترل نسبت به گروه دوم و همچنین گروه دوم در مقایسه با گروه سوم مشاهده نشد.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، موالید نر موش‌های دریافت کننده داروی اگزالی‌پلاتین در گروه‌های قبل بارداری، طی بارداری و شیرواری به‌طور چشمگیری دارای اسپرم‌هایی با کیفیت پایین‌تر نسبت به گروه کنترل بودند. مقایسه نتایج بین گروه‌های تجربی بیانگر آن بود که بیشترین و کمترین اثرات مخرب این داروی شیمی‌درمانی بر روی کیفیت پارامترهای اسپرم موالید به ترتیب مربوط به گروه‌های شیرواری و قبل بارداری است.

در همین راستا مطالعاتی در زمینه ارزیابی گنادهای جنسی و پارامترهای اسپرم موالید متعاقب استفاده از داروهای شیمی‌درمانی در دوره پیرازایشی گزارش شده است. همانگونه که Seethalakshmi و همکاران پس از تجویز داروی سیس‌پلاتین در والدین؛ کاهش تعداد نوزادان، وزن گنادهای جنسی، تعداد و تحرک اسپرم در موالید نر را گزارش کردند (۱۴). در مطالعه دیگری کاهش تعداد اسپرم موالید نر متعاقب استفاده از داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبوسین در مادران طی دوره شیرواری گزارش شد (۱۵). Favareto و همکاران تاخیر در نزول بیضه، کاهش رشد موالید، کاهش تعداد اسپرم و اثرات سوء بر روند اسپرماتوژنز در موالید نر بالغ را متعاقب تجویز داروی سیس‌پلاتین در والد نر گزارش کردند (۱۶). همچنین مطالعات دیگری مبنی بر انتقال اثرات سوء داروهای شیمی‌درمانی و به دنبال آن کاهش قدرت باروری در موالید نسل آینده متعاقب تجویز این داروها در والدین وجود دارد (۱۷و۱۸).

در مطالعه حاضر تجویز داروی اگزالی‌پلاتین در گروه‌های قبل بارداری، طی بارداری و شیرواری به ترتیب سبب کاهش ۱۴درصد، ۲۷ درصد و ۳۷ درصد تعداد اسپرم موالید نر نسبت به گروه کنترل گردید. این در حالی است که گزارش‌های متعددی مبنی بر کاهش در تعداد اسپرم متعاقب تجویز سایر داروهای شیمی‌درمانی از جمله سیکلوفسفامید، سیس پلاتین و بوسولفان نیز وجود دارد (۲۱-۱۹). آسیب اکسیداتیو در اسیدهای چرب غیراشباع موجب اختلال در سیالیت و نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌گردد که این امر موجب کاهش تعداد از طریق آسیب به اسپرم می‌شود (۲۲).

در مطالعه ما داروی اگزالی پلاتین به‌طور کلی سبب کاهش تحرک اسپرم و همچنین افزایش درصد اسپرم‌های غیرمتحرک به میزان ۱۶درصد، ۳۱ درصد و ۴۸ درصد به ترتیب در گروه‌های دوم و سوم و چهارم گردید. در همین راستا مطالعات متعددی نشان‌دهنده کاهش تحرک اسپرم و افزایش درصد اسپرم‌های غیرمتحرک متعاقب استفاده از داروهای شیمی‌درمانی (سیکلوفسفامید، تاموکسیفن، بنزوپیرن) وجود دارد (۲۵-۲۳).

قدرت تحرک اسپرم به‌عنوان عامل تعیین کننده و موثر در باروری بوده و به نظر می‌رسد نقش موثرتری در مقایسه با سایر عوامل را داراست. عوامل زیادی در کاهش تحرک اسپرم تاثیر دارند. با این حال هنوز علت اصلی آن ناشناخته است. براساس نتایج حاصل از این بررسی‌ها می‌توان این گونه استنباط نمود که افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و بروز استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش ATP داخل سلولی مهم‌ترین عوامل کاهش تحرک اسپرم محسوب می‌شوند. علاوه بر آن افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در بافت بیضه، آپوپتوزیس سلول‌های ژرمینال آن را افزایش داده و موجب کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌گردد (۲۶و۲۷).

در مطالعه حاضر شمارش اسپرم‌های زنده و مرده متعاقب تجویز داروی اگزالی‌پلاتین به ترتیب موجب افزایش ۳۰ درصد، ۴۰ درصد و ۶۷ درصد میزان اسپرم‌های مرده موالید در گروه‌های دوم و سوم و چهارم نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین یافته‌های مطالعات دیگری که میزان حیات اسپرم را پس از شیمی‌درمانی با داروهای azathioprine و سیس پلاتین بررسی کردند (۲۸و۲۹)؛ مشابه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر بود.

براساس نتایج حاصل از این مطالعات می‌توان این گونه بیان نمود که استفاده از داروهای شیمی‌درمانی سبب تشدید تولید رادیکال‌های آزاد از جمله ROS می‌گردد و از آنجایی که میزان تولید ROS با میزان تولید اسپرم‌های مرده و غیرطبیعی ارتباط مستقیم دارد؛ به‌نظر می‌رسد که تخریب سلول‌های اسپرماتوژنیک و اختلال در روند اسپرمیوژنز در نتیجه استرس اکسیداتیو می‌تواند در تولید اسپرم های مرده نقش داشته باشند. علاوه بر آن افزایش تولید اسپرم‌های مرده خود به‌عنوان یکی دیگر از منابع اصلی به منظور تولید ROS محسوب می‌شود (۳۰و۳۱).

در مطالعه ما میزان اسپرم‌های نابالغ موالید در گروه‌های دوم و سوم و چهارم به ترتیب ۱۱ درصد، ۱۳ درصد و ۱۸ درصد تعیین شد. میزان درصد اسپرم نابالغ گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. این در حالی است که Attia و همکاران (۳۲) و Oshio و همکاران (۳۳) به‌ترتیب تاثیر داروی شیمی‌درمانی نوکودازول و آدریامایسین را بر بلوغ اسپرم‌ها بررسی کردند و یافته‌های مشابهی را با مطالعه حاضر گزارش نمودند.

با توجه به این که ترشحات بافت دیواره اپیدیدیم موجب بلوغ اسپرم می‌شود (۳۴)؛ احتمال می‌رود که اگزالی‌پلاتین و سایر داروهای شیمی‌درمانی نیز با تاثیر سوء بر بافت دیواره اپیدیدیم موجب عدم بلوغ اسپرم و افزایش درصد اسپرم های نابالغ می گردند.

در مطالعه حاضر میزان افزایش اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده به ترتیب برای گروه‌های قبل بارداری، باردار و شیرواری متعاقب تجویز اگزالی‌پلاتین ۳۸ درصد، ۴۸ درصد و ۶۱ درصد نسبت به گروه کنترل تعیین شد. مطالعاتی که اثر سایر داروهای شیمی‌درمانی را بر کیفیت کروماتین اسپرم بررسی کرده‌اند نیز نشان داده که میزان درصد اسپرم‌های با DNA تخریب شده تحت تاثیر این داروها افزایش می‌یابد (۳۵و۳۶) و تنها در مطالعه Ghezzi و همکاران داروی کربوپلاتین اثری بر کیفیت کروماتین اسپرم و درصد اسپرم‌ها دارای DNA تخریب شده نداشت (۳۷). یکی از رویدادهای مهم در روند اسپرماتوژنز جایگزینی هیستون با پروتامین است که نقش مهمی در بسته‌بندی کروماتین اسپرم ایفا می کند (۳۸). همچنین یکی از دلایل آسیب DNA اسپرم، نقص در بسته‌بندی کروماتین است که می‌تواند منجر به آپوپتوزیس ناقص و تولید بیش از حد استرس اکسیداتیو شود (۳۹). استرس اکسیداتیو احتمال بروز شکست در یک یا دو رشته DNA را افزایش داده و در نهایت سبب کاهش کیفیت کروماتین هسته می‌شود (۴۰). به‌نظر می‌رسد که اگزالی‌پلاتین و سایر داروهای شیمی‌درمانی اثرگذار بر روی این پارامتر اسپرم از طریق همین مکانیسم سبب افزایش میزان اسپرم ها با DNA آسیب دیده می‌شوند.

اگرچه مکانیسم دقیق آسیب‌شناسی داروی اگزالی‌پلاتین بر سمیت دستگاه تولید مثلی مردان هنوز به طور کامل شناخته نشده است؛ با این حال اگزالی‌پلاتین تحت واکنش‌های غیرآنزیمی در محلول‌های فیزیولوژیک از طریق لیگاند اگزالات ناپایدار به مشتقات فعال تبدیل می‌شود (۴۱). همچنین این دارو پیوند متقاطع داخل زنجیره‌ای و بین زنجیره‌ای با DNA تشکیل می‌دهند. پیوندها بین موقعیت N7 و دو گوانین مجاور (GG)، آدنین- گوانین مجاور (AG) و گوانین‌های جدا شده توسط نوکلئوتید (GNG) تشکیل می‌شود. این پیوندها باعث مهار تقسیم و رونویسی DNA می شوند. اگزالی پلاتین به‌طور انتخابی مانع سنتز دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) می‌شود (۴۲).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه متعاقب استفاده از داروی اگزالی‌پلاتین اشاره نمود. همچنین انجام مطالعات هیستوپاتولوژی در مورد مصرف اگزالی‌پلاتین در دوره پیرازایشی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از داروی اگزالی پلاتین منجر به القای اثرات نامطلوب بر روی کیفیت اسپرم در دوره پیرازایشی می شود. بیشترین تاثیر این دارو در دوره شیرواری بود. همچنین با افزایش فاصله زمانی تجویز داروی اگزالی پلاتین در موش های مادر تا بلوغ موالید نر، اثرات سوء ناشی از استفاده از این دارو بر کیفیت پارامترهای اسپرم کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان‌نامه (شماره ۶۰۶۷۵۴۳) آقای مسلم دهمرده برای اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بود.

References

1. Bleiberg H. Oxaliplatin (L.OHP): a new reality in colorectal cancer. Br J Cancer. 1998 Jun; 77(4): 1-3.

2. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. Semin Oncol. 1998 Apr; 25(2 Suppl 5): 4-12.

3. Levi M, Shalgi R, Brenner B, Perl G, Purim O, Amit L, et al. The impact of oxaliplatin on the gonads: from bedside to the bench. Mol Hum Reprod. 2015 Dec; 21(12): 885-93. doi: 10.1093/molehr/gav055

4. Yu BB, Tong XH, Dong SY, Gu YC, Jiao H, Ji J, et al. [Total flavonoids of litsea coreana decreases the cytotoxicity of oxaliplatin in TM3 Leydig cells via enhancing the function of gap junction]. Zhonghua Nan Ke Xue. 2014 May; 20(5): 400-4. [Article in Chinese]

5. Tong X, Han X, Yu B, Yu M, Jiang G, Ji J, et al. Role of gap junction intercellular communication in testicular leydig cell apoptosis induced by oxaliplatin via the mitochondrial pathway. Oncol Rep. 2015 Jan; 33(1): 207-14. doi: 10.3892/or.2014.3571

6. Jeppesen JB, Østerlind K. Successful twin pregnancy outcome after in utero exposure to FOLFOX for metastatic colon cancer: a case report and review of the literature. Clin Colorectal Cancer. 2011 Dec; 10(4): 348-52. doi: 10.1016/j.clcc.2011.06.003

7. Makoshi Z, Perrott C, Al-Khatani K, Al-Mohaisen F. Chemotherapeutic treatment of colorectal cancer in pregnancy: case report. J Med Case Rep. 2015 Jun; 9: 140. doi: 10.1186/s13256-015-0621-9

8. McQuade RM, Carbone SE, Stojanovska V, Rahman A, Gwynne RM, Robinson AM, et al. Role of oxidative stress in oxaliplatin-induced enteric neuropathy and colonic dysmotility in mice. Br J Pharmacol. 2016 Dec; 173(24): 3502-21. doi: 10.1111/bph.13646

9. Dobrzyńska MM, Gajowik A, Jankowska-Steifer EA, Radzikowska J, Tyrkiel EJ. Reproductive and developmental F1 toxicity following exposure of pubescent F0 male mice to bisphenol A alone and in a combination with X-rays irradiation. Toxicology. 2018 Dec; 410: 142-51. doi: 10.1016/j.tox.2018.10.007

10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sprm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridg: Cambridge University Press. 2010; pp: 8-23.

11. Ahmadi A, Sader khanlou RJ, Salami S, Ahmadi A. [Evaluation of sperm quality, maturation and DNA integrity in adult mice treated with sulpiride]. Tehran Univ Med J. 2012; 70(4): 205-11. [Article in Persian]

12. Hammadeh ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W,

Fischer Hammadeh C. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. Arch Gynecol Obstet. 2008 Jun; 277(6):515-26. doi: 10.1007/s00404-007-0507-1

13. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, et al. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna J Med Biotechnol. 2009; 1(3): 173-80.

14. Seethalakshmi L, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Malhotra RK, Menon M. Effects of subchronic treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. J Androl. 1992 Jan-Feb; 13(1): 65-74.

15. Bechter R, Haebler R, Ettlin RA, Dixon RL. Testicular toxicity of antineoplastic drugs during postnatal development of the rat. Arch Toxicol Suppl. 1985; 8: 390-93.

16. Favareto AP, de Toledo FC, Kempinas Wde G. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. Reprod Toxicol. 2011 Dec; 32(4): 425-33. doi: 10.1016/j.reprotox.2011.10.003

17. Liu M, Hales BF, Robaire B. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. Biol Reprod. 2014 Apr; 90(4): 72. doi: 10.1095/biolreprod.114.117754

18. Glen CD, Dubrova YE. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012 Feb; 109(8): 2984-88. doi: 10.1073/pnas.1119396109

19. Asleiranifam N, Hasanzadeh S, Sam M R, Najafi Tazehkand G R. [The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Achillea millefolium on Sperm Parameters and Apoptotic Changes in Cyclophosphamide Treated Mice]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016; 25(133): 77-90. [Article in Persian]

20. Amin A, Abraham C, Hamza AA, Abdalla ZA, Al-Shamsi SB, Harethi SS, et al. A standardized extract of Ginkgo biloba neutralizes cisplatin-mediated reproductive toxicity in rats. J Biomed Biotechnol. 2012 Feb; 2012: 362049. doi: 10.1155/2012/362049

21. Qu N, Kuramasu M, Hirayanagi Y, Nagahori K, Hayashi S, Ogawa Y, et al. Gosha-Jinki-Gan Recovers Spermatogenesis in Mice with Busulfan-Induced Aspermatogenesis. Int J Mol Sci. 2018 Sep; 19(9) pii: E2606. doi: 10.3390/ijms19092606

22. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl. 2004 Jan-Feb; 25(1): 5-18. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x

23. Zhu B, Zheng YF, Zhang YY, Cao YS, Zhang L, Li XG, et al. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. J Zhejiang Univ Sci B. 2015 Sep; 16(9): 780-87. doi: 10.1631/jzus.B1500015

24. Soleimanirad J, Roshangar L, Abouzaripour M, Daneshi E. [Study of Sperm Parameters and Sperm Fertility in Mice were Exposed to Tamoxifen during Embryonic Development]. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2017; 25(2): 101-10. [Article in Persian]

25. Chamorro-Cevallos G, Garduño-Siciliano L, Martínez-Galero E, Mojica-Villegas A, Pages N, Gutiérrez-Salmeán G. The protective effect of dietary Arthrospira (Spirulina) maxima against mutagenicity induced by benzo[alpha]pyrene in mice. J Med Food. 2014 May; 17(5): 527-34. doi: 10.1089/jmf.2013.0109

26. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril. 2000 Mar; 73(3): 459-64. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00567-1

27. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum Reprod Update. 2008 May-Jun; 14(3): 243-58. doi: 10.1093/humupd/dmn004

28. Schaalan MF, Ramadan BK, H Abd Elwahab A. Ameliorative effect of taurine-chloramine in azathioprine-induced testicular damage; a deeper insight into the mechanism of protection. BMC Complement Altern Med. 2018 Sep; 18(1): 255. doi: 10.1186/s12906-018-2272-z.

29. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, et al. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Feb; 266(3): 356-65. doi: 10.1016/j.taap.2012.11.025

30. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian J Androl. 2004 Mar; 6(1): 59-65.

31. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol. 2008 Jan; 59(1): 2-11. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x

32. Attia SM, Ahmad SF, Okash RM, Bakheet SA. Dominant lethal effects of nocodazole in germ cells of male mice. Food Chem Toxicol. 2015 Mar; 77:101-4. doi: 10.1016/j.fct.2015.01.004

33. Oshio S, Ozaki S, Ohkawa I, Tajima T, Kaneko S, Mohri H. Mecobalamin promotes mouse sperm maturation. Andrologia. 1989 Mar-Apr; 21(2): 167-73.

34. Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. Asian J Androl. 2006 Sep; 8(5): 584-88. doi: 10.1111/j.1745-7262.2006.00198.x

35. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. Hum Reprod. 2007 May; 22(5): 1431-42. doi: 10.1093/humrep/dem002

36. Cabral REL, Mendes TB, Vendramini V, Miraglia SM. Carnitine partially improves oxidative stress, acrosome integrity, and reproductive competence in doxorubicin-treated rats. Andrology. 2018 Jan; 6(1): 236-46. doi: 10.1111/andr.12426

37. Ghezzi M, Berretta M, Bottacin A, Palego P, Sartini B, Cosci I, et al. Impact of Bep or Carboplatin Chemotherapy on Testicular Function and Sperm Nucleus of Subjects with Testicular Germ Cell Tumor. Front Pharmacol. 2016 May; 7: 122. doi: 10.3389/fphar.2016.00122

38. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009 Apr; 91(4): 1119-26. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.063

39. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod. 2004 Jan; 19(1): 129-38. doi: 10.1093/humrep/deh024

40. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001 Mar-Apr; 7(2): 175-89. doi: 10.1093/humupd/7.2.175

41. Raez LE, Kobina S, Santos ES. Oxaliplatin in first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2010 Jan; 11(1): 18-24. doi: 10.3816/CLC.2010.n.003

42. Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. Cancer Treat Rev. 2007 Jun; 33(4): 347-57. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.01.009