

## بهبود روند اسپرماتوژنز و قدرت باروری موش‌های تحت تابش پرتو یونیزان با استفاده از اسید کلروژنیک

معصومه زیرک جوانمرد<sup>۱</sup>، احد زینالی<sup>۲</sup>، ساسان غضنفر اهری<sup>۳</sup>، ندا عابدپور<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** این پژوهش به منظور ارزیابی تأثیر کلروژنیک اسید (CGA) بر روند اسپرماتوژنز در موش‌های تحت تابش پرتوی X انجام شد.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، تعداد ۴۵ سر موش سوری نر به ۳ گروه: گروه ۱ (نرمال‌سالین)، گروه ۲ (دریافت‌کننده‌ی تابش + نرمال‌سالین) و گروه ۳ (تابش + کلروژنیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تقسیم شدند. سپس هیستومورفومتری بافت بیضه، شمارش سلول‌های موجود در مراحل مختلف تکوینی، میزان زنده ماندن اسپرم‌ها و در نهایت ظرفیت تولید مثلی موش‌های آزمایشی از گروه‌های مختلف، در روز ۳۵ پس از تابش مورد بررسی گرفت. داده‌ها توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی Tukey تحلیل شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد وزن بیضه، ضخامت لایه‌ی ژرمینال و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه IR با گروه شم و (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR + CGA تفاوت معنی‌داری دارد. همچنین، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لایدیگ در گروه IR نسبت به گروه‌های شم و (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA اختلاف معنی‌دار داشت. علاوه بر این در گروه IR کاهش معنی‌داری در میزان زنده‌مانی اسپرم و میزان باروری نسبت به گروه شم مشاهده شد. این تغییرات در گروه (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA به طور معنی‌داری تعدیل شده بود و مطالعات بافت‌شناسی هیچ گونه تخریب بافتی را نشان نداد. در عین حال تعداد سلول‌های رده‌ی زایا، میزان زنده‌مانی اسپرم و میزان باروری تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه‌ی حاضر نشان داد که CGA با بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک در بیضه می‌تواند در برابر اثرات مضر قرار گرفتن در معرض پرتوی X مفید باشد.

**واژگان کلیدی:** اسید کلروژنیک؛ آنتی‌اکسیدان؛ بافت بیضه؛ اسپرماتوژنز؛ اشعه‌ی یونیزان

**ارجاع:** زیرک جوانمرد معصومه، زینالی احد، غضنفر اهری ساسان، عابدپور ندا. **بهبود روند اسپرماتوژنز و قدرت باروری موش‌های تحت تابش پرتو**

**یونیزان با استفاده از اسید کلروژنیک.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۹۷): ۹۹۰-۹۸۱

### مقدمه

IR به طور متفاوتی باعث مرگ سلول‌های زایا (GCs) می‌شود. به دلیل تکثیر فعالانه‌ی اسپرماتوگونی، این سلول‌ها بیشترین حساسیت را به پرتو یونیزان دارند (۲). اگرچه پاسخ‌های فیزیولوژیک و سلولی به IR در بیضه‌ها به خوبی تثبیت شده است، اما مکانیزم‌های مولکولی که این پاسخ‌ها را هدایت می‌کنند، عمدتاً ناشناخته است. شواهد نشان می‌دهد که در اکثر موارد اثرات مضر IR بر بافت‌های بیولوژیکی از طریق تعاملات غیرمستقیم، باعث افزایش غیرطبیعی سطح ROS (Reactive oxygen species)، سیتوتوکسی و آسیب اکسیداتیو می‌شود. غشاهای سلولی، هسته‌ای و میتوکندری،

ناباروری موقت یا دائمی پس از پرتودرمانی، یک موضوع رایج است که به ویژه در بیماران مرد جوان مورد توجه قرار می‌گیرد. به عنوان یکی از ارگان‌های حساس به تابش پرتو، عملکرد بیضه در معرض تابش پرتو یونیزان (IR (Ionizing radiatio) می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر قرار بگیرد. عوارض جانبی IR می‌تواند متابولیسم اسپرماتوژنیک، تکثیر و تمایز را مختل کند، که در نهایت منجر به جهش یا آپوپتوز سلول حساس به پرتو یونیزان، کاهش تعداد اسپرم و نقص در عملکرد اسپرم می‌شود (۱).

۱- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۴- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ندا عابدپور؛ استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

با توجه به ویژگی‌های بررسی شده در زمینه‌ی فاکتور CGA و با توجه به نبود گزارشی در زمینه‌ی تأثیر فاکتور CGA بر سیستم تولید مثل جنس مذکر تحت تابش پرتو X، مطالعه‌ی پیش‌رو در صدد است تا ارتباط این فاکتور بر روند اسپرماتوژنز موش‌های تحت تابش پرتوی یونیزان را بررسی کند و بینش جدیدی را در مورد عملکرد اسید کلروژنیک به عنوان یک فاکتور بالقوه برای بیماران تحت درمان با روش‌های پرتودرمانی ارائه دهد.

### روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی بر روی موش‌های بالغ با سن تقریبی ۸ هفته (وزن تقریبی ۳۰-۲۵ گرمی) انجام شد. آب و غذا به اندازه‌ی کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت و در یک شرایط حرارتی ۲۰ تا ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبتی ۵۰-۴۰ درصد نگهداری شدند. برای انجام آزمایشات موش‌های مذکور (n = ۴۵) با کتامین ۱۰ درصد (با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس آسان‌کشی شدند (با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی) و بیضه‌های آن‌ها از بدن خارج و جهت انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

**گروه‌های مورد مطالعه:** گروه اول: شش (موش‌های ۳۰-۲۵ گرمی بدون دریافت تابش و اسید کلروژنیک و با تزریق سرم فیزیولوژیک به صورت داخل صفاقی)

گروه دوم: آزمایش ۱ (موش‌های ۳۰-۲۵ گرمی دریافت‌کننده‌ی تابش با دوز ۲ گری، بدون دریافت اسید کلروژنیک و با تزریق سرم فیزیولوژیک به صورت داخل صفاقی)

گروه سوم: آزمایش ۲ (موش‌های ۳۰-۲۵ گرمی دریافت‌کننده‌ی تابش با دوز ۲ گری و دریافت‌کننده‌ی اسید کلروژنیک در پنج گروه با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) تقسیم شدند.

**نحوه‌ی دریافت پرتوی X:** در این مطالعه از یک باکس ویژه که از پلکسی گلاس (Plexiglass) با ویژگی‌های جذب پرتوی مشابه بافت‌های بدن ساخته شده بود، استفاده گردید. این باکس به گونه‌ای طراحی شد که بتوان تعداد ۲۰ موش را در اتاقک‌های کوچک و در پوزیشن prone با حداقل جابجایی، جا داد تا بتوان تمام موش‌ها را به طور همزمان در یک نوبت تابش‌دهی، تحت تابش پرتوهای یونیزان قرار داد. برای تابش‌دهی نمونه‌ها از دستگاه شتاب‌دهنده‌ی خطی الکترا با انرژی ۶ MV فوتون‌های ایکس استفاده شد. فاصله‌ی کانون تا مرکز تابش (Source to Axes Distance) در این مطالعه ۱۰۰ cm در نظر گرفته شد و زمان تابش‌دهی (Monitor Unit: MU) به عنوان

پروتئین‌های ساختاری و سیتوپلاسمیک، کربوهیدرات‌های پیچیده، RNA و DNA همه‌ی قربانیان بالقوه استرس اکسیداتیو هستند (۳). طبق مطالعات انجام شده، سطح بالای ROS در ۴۵-۲۰ درصد مردان نابارور وجود دارد. تحقیقات دو دهه‌ی اخیر حاکی از آن است که رادیکال آزاد، عامل عمده‌ی اختلال در عملکرد اسپرم است (۴، ۵).

از سوی دیگر، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها به طور کلی نسبت به پرتو، حساسیت کمتری دارند (۶). علاوه بر این، سلول‌های حمایت‌کننده، سلول‌های بنیادی (Stem cells) SCs و سلول‌های لایدیگ هر دو مقاوم به تابش هستند. این ممکن است به دلیل افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در این سلول‌ها بعد از تابش پرتو باشد (۷). در هر سلول مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارند که مسئولیت مهار رادیکال‌ها را برعهده داشته و غلظت آن‌ها را در حد فیزیولوژیک در سلول نگه می‌دارند. برهم خوردن تعادل میان رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و مهارکننده‌ی آن در سلول، منجر به «تنش اکسایشی» می‌شود و درمان آن باید مبتنی بر حذف یا کاهش عوامل تنش برانگیز باشد (۸). در این راستا مفهوم بهبود پتانسیل باروری بیماران نابارور تحت استرس اکسیداتیو بالا با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، جایگاه ویژه‌ای در موارد نارسایی بیضه‌ی ناشی از IR خواهد داشت. دلیلی که در آن درمان خوراکی آنتی‌اکسیدان برای مردان نابارور در نظر گرفته می‌شود، به وجود آمدن تنش اکسایشی به دلیل کمبود آنتی‌اکسیدان است. مطالعات بالینی دو دهه‌ی گذشته، اثرات مفید درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها را روی بهبود کیفیت اسپرم در مردان، بالا رفتن نرخ لقاح و بارداری ارزیابی کرده‌اند. بسیاری از مراکز درمانی، درمان آنتی‌اکسیدانی را به عنوان بخشی از درمان بیماران نابارور پذیرفته و یکی از مراحل درمانی این زوج‌ها قرار داده‌اند (۹). بیشتر محققان و پزشکانی که در زمینه‌ی درمان آنتی‌اکسیدانی زوج‌های نابارور فعالیت دارند، گزارش‌های فراوانی در خصوص موفقیت آمیز بودن این روش در درمان ناباروری و روش‌های کمک باروری Assisted Reproductive Technology منتشر کرده‌اند (۱۰).

اسید کلروژنیک (Chlorogenic acid) CGA یک ترکیب پلی‌فنول می‌باشد که از طریق مسیرهای درون سلولی آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی اثرگذاری می‌کند. خواص آنتی‌اکسیدانی و جاروب کردن رادیکال‌های آزاد توسط CGA به خوبی شناخته شده است. CGA به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی با قدرت بالا به عنوان فاکتوری مؤثر سبب کاهش ریسک بروز بیماری‌های مزمن، افزایش توانایی، تحریک کاهش وزن آسان، کمک به سلامت قلب، کبد و طحال شناخته شده است (۱۱، ۱۲). تحقیقات اخیر نشان داده است که CGA سبب مهار تخریب DNA و غیرفعال شدن کاسپاز ۳ می‌شود و از طریق مهار پروتئین‌های خانواده BAX سبب مهار آپوپتوز می‌شود (۱۳).

لام (در واحد سطح) با میکروسکوپ نوری شمارش شدند و در گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفتند.

**ارزیابی میزان زنده ماندن اسپرم‌ها توسط رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو:** بدین منظور قسمت دمی هر دو اپیدیدیم از هر موش برداشته شد و بلافاصله به ظرف پتری دیش حاوی محیط کشت HTF (human tubal fluid) غنی شده با BSA (bovine serum albumin) از قبل گرم شده (در شرایط انکوباتور مرطوب با ۵ درصد  $CO_2$  و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) منتقل شد. سپس اپیدیدیم پس از خرد شدن انکوبه شد تا اسپرماتوزوئیدها به روش swim-out به محیط منتقل شوند. پس از آن ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان‌بلو مخلوط شده، پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه روی لام قرار گرفت و سپس یک لامل بر روی آن قرار داده شد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میزان بقا را مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های زنده رنگ تریپان‌بلو را به خود نمی‌گیرند در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن‌تری دارد؛ در حالی‌که اسپرم‌های مرده به دلیل نقص در غشاهای پالسمایی خود رنگ تریپان‌بلو را به خود گرفته، به رنگ تیره در می‌آیند.

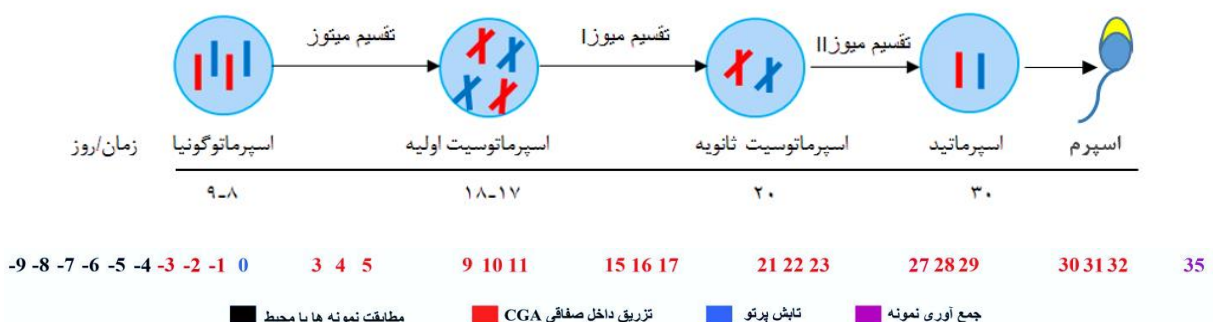
**ارزیابی میزان باروری:** همان‌طور که می‌دانید طول مدت اسپرماتوژنز موش ۳۵ روز است که شامل ۶ روز میتوز، ۱۴ روز میوز، ۹ روز اسپرمیوز (تمایز اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای کشیده) و ۶ روز ظهور اسپرم بیضه می‌باشد (۴). بنابراین ما ظرفیت تولیدمثلی موش‌های آزمایشی از گروه‌های مختلف را در روز ۳۵ پس از IR بررسی کردیم (شکل ۱-۳). جهت جفت‌گیری، یک نر با دو ماده به مدت ۲ هفته در کنار یکدیگر قرار گرفتند. موش‌های ماده هر روز صبح از نظر پلاک‌های واژن بررسی و ثبت می‌شدند و تا هنگام زایمان مورد پیگیری می‌گرفتند.

شاخص تعیین دز برای تحویل ۲Gy دوز تابشی (۴) به طور همزمان به تمام نمونه‌ها تنظیم گردید.

**نحوه‌ی استفاده از فاکتور کلروژنیک اسید:** پس از اثبات مدل پرتو X با بررسی بافت‌شناسی بیضه، در گروه تحت درمان، اسید کلروژنیک در پنج گروه با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و به مدت چهار هفته با توالی سه روز (در یک روز و زمان مشخص) به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۴) (شکل ۱).

**اندازه‌گیری وزن و مطالعه‌ی مورفولوژیکی بافت بیضه:** در انتهای دوره، بیضه‌ها پس از خارج شدن از بدن با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. وزن هر دو بیضه توسط ترازوی دیجیتال با دقت اندازه گرفته شد. سپس با سوزنی تونیکا آلبوزینه (به دلیل اینکه بیضه بافت همبند سخت به نام تونیکا آلبوزینه دارد که باعث می‌شود فیکساتیو به خوبی به داخل آن نفوذ نکند) سوراخ شد و نمونه‌ها داخل فیکساتیو بوئن (۶ ساعت) و سپس فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافتی برش‌های عرضی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسلین-انوزین با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

**ارزیابی هیستومورفومتری و شمارش سلولی در برش‌های بافتی بیضه:** در مطالعه‌ی هیستومورفومتری بافت بیضه، پس از تهیه‌ی مقاطع هیستولوژیک در هر بیضه، میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز (ابتدا دو قطر عمود بر هم محاسبه شده و سپس میانگین اقطار در هر لوله محاسبه می‌شود)، میانگین ضخامت اپی‌تلیوم با استفاده از دستگاه موتیک در گروه شاهد و گروه‌های تجربی اندازه‌گیری و سپس در ضریب مربوطه ضرب شد. همچنین تعداد سلول‌های تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، اسپرم‌ها و سلول‌های لایدیگ، در هر



شکل ۱. طرح مطالعه و جدول زمان‌بندی

پس از اثبات مدل پرتو X با بررسی بافت‌شناسی بیضه، در گروه تحت درمان، اسید کلروژنیک با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و به مدت چهار هفته با توالی سه روز (در یک روز و زمان مشخص) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

نداشت (شکل ۲).

**مشاهدات میکروسکوپ نوری بافت بیضه:** نتایج حاصل از بررسی‌های بافت‌شناسی توسط میکروسکوپ نوری نشان داد، بیضه‌های گروه شم، ظاهر طبیعی داشته و شامل مجاری منی‌ساز و بافت بینابینی طبیعی بودند. اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز از سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتید نابالغ و اسپرماتید بالغ تشکیل شده بود (شکل ۳).

جدول ۱. تغییرات وزنی بیضه‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	وزن بیضه راست (گرم)	وزن بیضه چپ (گرم)
شم	۰/۱۶ ± ۰/۰۳	۰/۱۶ ± ۰/۰۲
IR	۰/۰۷ ± ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۰/۰۶ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>
IR+CGA (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۰۸ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>
IR+CGA (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۰/۱ ± ۰/۰۰ <sup>ab</sup>	۰/۱۱ ± ۰/۰۱ <sup>ab</sup>
IR+CGA (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۰/۱۲ ± ۰/۰۲ <sup>abcd</sup>	۰/۱۲ ± ۰/۰۱ <sup>abcd</sup>
IR+CGA (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۰/۱۵ ± ۰/۰۳ <sup>bcde</sup>	۰/۱۴ ± ۰/۰۲ <sup>bcde</sup>
IR+CGA (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۰/۱۳ ± ۰/۰۴ <sup>abcde</sup>	۰/۱۲ ± ۰/۰۱ <sup>abcde</sup>

تغییرات وزنی بیضه‌ها در گروه‌های مورد مطالعه.

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.  $P < ۰/۰۵$  نشانه‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

a نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم می‌باشد.

b نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه IR می‌باشد.

c نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.

d نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.

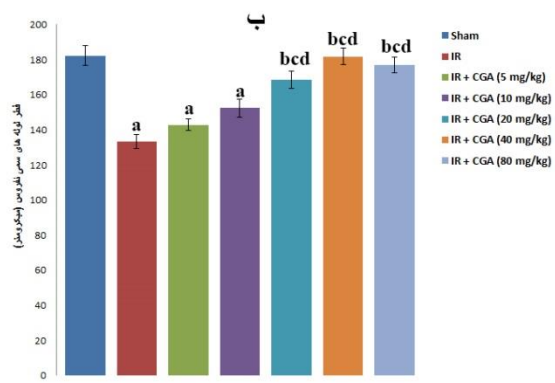
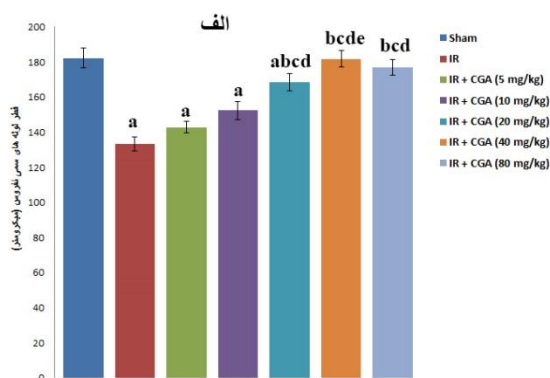
e نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.

**روش تحلیل داده‌ها:** کلیه‌ی داده‌های کمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شد. تفاوت داده‌ها در سطح  $P \leq ۰/۰۵$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقایسه‌ی بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه one-way ANOVA و Tukey انجام گردید و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. همه‌ی آزمایشات حیوانی توسط کمیته‌ی نهادی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشی (کد اخلاقی PU/IAEC/S/14/23، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی) تأیید شده است.

### یافته‌ها

**ارزیابی وزن بافت بیضه:** نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات وزنی بیضه موش‌ها در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد، میانگین وزن بیضه در گروه IR کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد و IR+CGA به ویژه در دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم دارد (جدول ۱).

**ارزیابی هیستومورفومتری بافت بیضه:** در مطالعه‌ی هیستومورفومتری بافت بیضه، پس از تهیه‌ی مقاطع هیستولوژیک در هر بیضه، میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز (ابتدا دو قطر عمود بر هم محاسبه شده و سپس میانگین اقطار در هر لوله محاسبه شد) و میانگین ضخامت اپی‌تلیوم با استفاده از دستگاه موتیک در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، ضخامت لایه‌ی ژرینال و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، گروه IR نسبت به گروه‌های شم و IR+CGA کاهش معنی‌دار داشت اما تفاوت معنی‌داری بین گروه IR+CGA در دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و گروه شاهد وجود

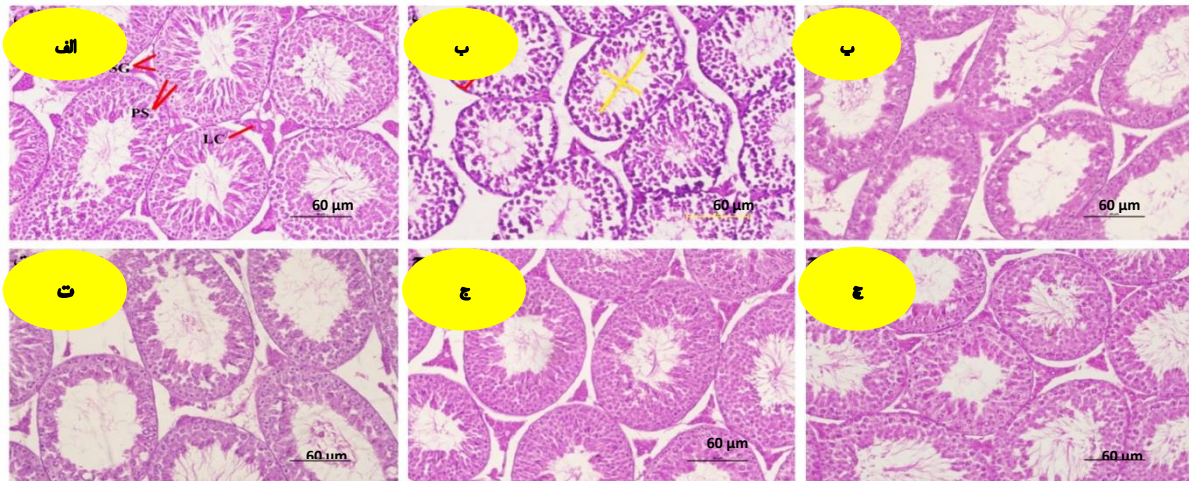


شکل ۲: مقایسه‌ی قطر لوله‌های سیمی نفروس و ضخامت اپی‌تلیوم در گروه‌های مورد مطالعه

(الف) مقایسه‌ی قطر لوله‌های سیمی نفروس و (ب) ضخامت اپی‌تلیوم در گروه‌های مورد مطالعه.

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.  $P < ۰/۰۵$  نشانه‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

a نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم می‌باشد؛ b نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه IR می‌باشد؛ c نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ d نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ e نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ f نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ g نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ نوری بافت بیضه

تصاویر هیستولوژیک از بیضه‌های گروه شم (الف) ظاهر طبیعی داشته و شامل مجاری منی‌ساز و بافت بینابینی طبیعی می‌باشد و اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز از سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتید نابالغ و اسپرماتید بالغ تشکیل شده است. در مقایسه‌ی گروه‌های IR (ب) با گروه شم، نامنظمی در برخی از لوله‌های اسپرم‌ساز، بهم خوردگی نظم سلولی، کاهش تراکم سلول‌های اسپرم‌ساز، افزایش فاصله بین لوله‌های اسپرم‌ساز، نامنظمی در بافت بینابینی بین لوله‌ها، بیرنگی و واکنش شدن سیتوپلاسم سلول‌های لیدیک و ضخیم‌شدگی غشاء پایه‌ی اپی‌تلیوم اسپرماتوژنیک مشاهده می‌شود. همچنین قطر لایه‌ی ژرمینال کم شده و فضاهای خالی بیشتری نسبت به گروه شم به چشم می‌خورد. این تغییرات در گروه IR+CGA به ویژه در در دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تعدیل شده بود و مطالعات بافت‌شناسی هیچ گونه تخریب بافتی را نشان نداد. (الف) گروه شم، (ب) گروه IR، (پ) گروه (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA (ت) گروه (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA، (ج) گروه (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA و (چ) گروه (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA. سلول‌های اسپرماتوگونی (SG)، اسپرماتوسیت‌های اولیه (PS)، سلول‌های لیدیک (LC).

سلول‌های لیدیک و ضخیم‌شدگی غشاء پایه‌ی اپی‌تلیوم اسپرماتوژنیک مشاهده گردید. همچنین قطر لایه‌ی ژرمینال کم شده و فضاهای خالی بیشتری نسبت به گروه شم به چشم می‌خورد. علاوه بر این در گروه IR کاهش در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیک نسبت به گروه شم مشاهده شد (جدول ۲). این تغییرات در گروه IR+CGA به ویژه در در دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تعدیل شده بود و مطالعات بافت‌شناسی هیچ گونه تخریب بافتی را نشان نداد. در عین حال تعداد سلول‌های رده‌ی زایا، ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز و قطر لوله‌های منی‌ساز در دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم CGA در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P < 0/05$ ).

در بافت بینابینی نیز سلول‌های لیدیک، ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها، عروق خونی و لنفوی مشاهده شد و همگی از یک تراکم و مورفولوژی سالم برخوردار بودند. مجاری منی‌ساز ظاهری طبیعی داشتند و نشانی از وجود تغییرات دژنراتیو در اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز مشاهده نشد (شکل ۳).

فوتومیکروگراف‌های به دست آمده توسط میکروسکوپ نوری (شکل ۳) بیانگر این موضوع است که در مقایسه‌ی گروه‌های IR با گروه شم، نامنظمی در برخی از لوله‌های اسپرم‌ساز، بهم خوردگی نظم سلولی، کاهش تراکم سلول‌های اسپرم‌ساز، افزایش فاصله بین لوله‌های اسپرم‌ساز، نامنظمی در بافت بینابینی بین لوله‌ها، بیرنگی و واکنش شدن سیتوپلاسم

جدول ۲. مقایسه‌ی تعداد سلول‌های رده‌ی اسپرمی و لیدیک در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوسیت اولیه	تعداد اسپرماتید	تعداد سلول‌های لیدیک
شم	۳/۶۵ ± ۰/۲	۵۲/۲۶ ± ۱/۱۷	۱۴۵/۶۲ ± ۳/۲۴	۱۵/۱۲ ± ۰/۴۵
IR	۱/۳۲ ± ۰/۷۵ <sup>a</sup>	۲۸/۴۷ ± ۱/۰۲ <sup>a</sup>	۸۵/۳۹ ± ۴/۳۲ <sup>a</sup>	۱۱/۴۲ ± ۰/۳۴ <sup>a</sup>
IR+CGA (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۱/۶۸ ± ۰/۲۳ <sup>ad</sup>	۳۲/۴۲ ± ۰/۸۵ <sup>a</sup>	۹۳/۶۴ ± ۳/۵۸ <sup>a</sup>	۱۱/۸۵ ± ۰/۱۴ <sup>a</sup>
IR+CGA (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۲/۲۴ ± ۰/۵۵ <sup>a</sup>	۳۸/۵۴ ± ۱/۰۱ <sup>a</sup>	۱۰۹/۲۸ ± ۴/۶۳ <sup>a</sup>	۱۲/۱۴ ± ۰/۱۴ <sup>a</sup>
IR+CGA (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۲/۴۶ ± ۰/۳۴ <sup>ab</sup>	۴۶/۲۶ ± ۱/۲۵ <sup>ab</sup>	۱۲۴/۴۳ ± ۴/۴۵ <sup>ab</sup>	۱۳/۲۵ ± ۰/۱۴ <sup>ab</sup>
IR+CGA (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۳/۲۵ ± ۰/۲۷ <sup>bcd</sup>	۵۲/۸۴ ± ۱/۱۵ <sup>bcd</sup>	۱۴۸/۲۱ ± ۴/۷ <sup>bcd</sup>	۱۵/۸۶ ± ۰/۱۸ <sup>bcd</sup>
IR+CGA (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	۲/۸۵ ± ۰/۶۲ <sup>bcd</sup>	۴۹/۷۵ ± ۱/۲۲ <sup>bcd</sup>	۱۳۶/۷۵ ± ۳/۷۶ <sup>bcd</sup>	۱۴/۷۳ ± ۰/۱۴ <sup>bcd</sup>

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.  $P < 0/05$  نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

a نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم می‌باشد؛ b نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح با گروه IR می‌باشد؛ c نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ d نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ e نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.

زایمان شد ( $P < 0/05$ ) (جدول ۳). این نتایج نشان می‌دهد که درمان مزمن با CGA (به ویژه در دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به طور قابل توجهی عملکرد بیضه را پس از آسیب IR بهبود می‌بخشد.

جدول ۳. بررسی ظرفیت تولیدمثلی ۳۵ روز بعد از IR

گروه‌ها	پلاک واژینال	تعداد تولد زنده
شم	+	$8/5 \pm 0/5$
IR	-/+	$3/2 \pm 0/8^a$
IR+CGA (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)	-/+	$4/8 \pm 0/3^{ab}$
IR+CGA (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	-/+	$5/4 \pm 1/1^{abc}$
IR+CGA (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	+	$6/7 \pm 0/4^{abcd}$
IR+CGA (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	+	$8/3 \pm 0/5^{bcde}$
IR+CGA (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)	+	$7/2 \pm 0/3^{bcde}$

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است.  $P < 0/05$  نشانه‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

a نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم می‌باشد؛ b نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه IR می‌باشد؛ c نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ d نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ e نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.

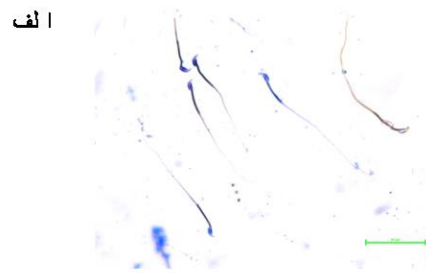
## بحث

در این مطالعه به بررسی تأثیر خاصیت کلروژنیک اسید در دوزهای مختلف بر وزن بیضه، روند اسپرماتوژنز، میزان زنده‌مانی اسپرم و میزان باروری موش‌های تحت تابش پرتو X پرداخته شد. در مطالعه‌ی ما در گام نخست، تابش پرتو یونیزان اثر خود را با کاهش معنی‌دار وزن بیضه نمونه‌های گروه IR نمایان کرد. بر اساس مطالعات انجام شده تعداد سلول‌های سرتولی و تولید اسپرم با اندازه و وزن بیضه رابطه‌ی مستقیم داشت. از طرفی، این سلول‌ها دارای آنزیم آروماتاز (تبدیل‌کننده‌ی آندروژن به استروژن) هستند که در روند اسپرماتوژنز ضروری است (۱۴).

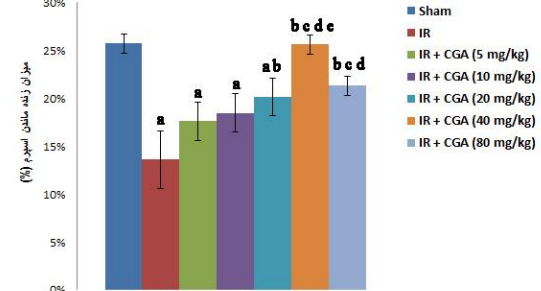
همچنین یکی دیگر از شاخص‌های تعیین‌کننده‌ی اندازه‌ی بیضه‌ها، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت لایه‌ی ژرمینال است. در مطالعه‌ی حاضر، کاهش معنی‌دار این دو شاخص در گروه IR نشان‌دهنده‌ی اثر مستقیم IR بر اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز است. در تأیید نتایج فوق، داده‌های هیستولوژیک نیز کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید، اسپرماتوسیت اولیه و لایدیگ در گروه IR نسبت به گروه شم نشان داد که در نتیجه آن میزان زنده‌مانی اسپرم و میزان باروری نیز کاهش یافته بود. مطالعات قبلی نشان داد، به دنبال کاهش ضخامت اپی‌تلیوم، منع

ارزیابی میزان زنده ماندن اسپرم‌ها؛ همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، زنده ماندن اسپرم ( $TB^+$  اسپرم) در گروه IR در مقایسه با گروه شم و IR+CGA (در غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومولار) روند کاهشی را نشان داد. به طور کلی، نتایج ما نشان داد که درمان با ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم CGA به طور قابل توجهی زنده‌مانی اسپرم را پس از آسیب IR بهبود می‌بخشد.

## الف



## ب



شکل ۴. ارزیابی زنده ماندن اسپرم

الف) ارزیابی زنده ماندن اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری به دنبال رنگ‌آمیزی TB. اسپرم‌های زنده رنگ تریان‌بلو را به خود نگرفتند در نتیجه قسمت سر و ته آن رنگ و حالت روشن تری دارد؛ در حالی که اسپرم‌های مرده به دلیل نقص در غشاهای پلاسمایی خود رنگ تریان‌بلو را به خود گرفته، به رنگ تیره در آمدند. ب) آنالیز میزان زنده ماندن اسپرم. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است.  $P < 0/05$  نشانه‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

a نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شم می‌باشد؛ b نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه IR می‌باشد؛ c نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ d نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد؛ e نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) IR+CGA می‌باشد.

بررسی ظرفیت تولیدمثلی: داده‌های موجود ما را به این فکر واداشت که آیا اسپرم‌های زنده مانده قادر به تلقیح تخمک هستند و در نتیجه توانایی تولیدمثلی خود را حفظ می‌کنند. بنابراین ما ظرفیت تولیدمثلی موش‌های آزمایشی مختلف را در روز ۳۵ پس از IR (با توجه به اینکه یک چرخه اسپرم‌زایی موش ۳۵ روز طول می‌کشد). بررسی کردیم. به طور کلی، پتانسیل باروری به طور قابل توجهی در موش‌های نر تحت تابش کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). در مقابل، درمان با CGA آسیب بیضه را پس از آسیب IR کاهش داد و منجر به افزایش چشمگیر نرخ لقاح و

فاکتور رشد (Transforming growth factor beta)  $TGF-\beta$  و فاکتور تومور نکروز آلفا (Tumour Necrosis Factor alpha) TNF alpha (۲۳-۲۵).

نکته‌ی مهمی که وجود دارد این است که نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، در بافت بیضه بیشترین اثرات تابش بر سلول‌های اسپرماتوسیت است در حالی که سلول‌های لایدیگ در برابر تابش مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. تاکنون چندین نویسنده عوامل مختلفی برای تعدیل آسیب سلولی مرتبط با قرار گرفتن در معرض تابش پیشنهاد کرده‌اند. آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان عوامل حفاظت بیولوژیکی در برابر آسیب‌های ناشی از پرتو در انسان پیشنهاد می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند در چندین مرحله‌ی مختلف عمل کنند: از بین بردن اکسیژن یا کاهش موضعی غلظت‌های  $O_2$ ، مهار رادیکال‌های آغازین، مهار اکسیژن آزاد، شکستن زنجیره‌ی توالی آغاز شده و موارد دیگر. گستره‌ی مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی موجود در سلول و خارج سلول باید برای محافظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو کافی باشد. با این حال، تعادل می‌تواند به دلیل تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد با قرار گرفتن در معرض پرتو ایکس و پرتو گاما از بین برود. بنابراین، میزان آسیب بافتی نتیجه‌ی تعادل بین رادیکال‌های آزاد تولید شده و سیستم دفاعی حفاظتی آنتی‌اکسیدانی است. آنتی‌اکسیدان‌ها برای محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب اولیه‌ی رادیکال‌های آزاد، باید در زمان تابش در غلظت کافی در بافت وجود داشته باشند. مشخص شده که بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌ها چنانچه قبل از قرار گرفتن در معرض پرتو یونیزان مصرف شوند اثرات محافظت کننده دارند (۲۶).

شواهد نشان داد که در سیستم تولید مثل مذکر درمان با کوکتل آنتی‌اکسیدان از آسیب ناشی از تابش به بیضه جلوگیری می‌کند و باعث بهتر شدن بازسازی بافت بیضه می‌شود. درمان آنتی‌اکسیدانی منجر به کاهش قابل توجه آپوپتوز سلول‌های زایا می‌گردد. در نتیجه، استفاده از کوکتل آنتی‌اکسیدان یک اثر مهارتی قوی در مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌های زایا ایجاد می‌کند، از آسیب بیضه جلوگیری کرده و اسپرمتوزونز را در مدل موش تحت تابش گامای تمام بدن بهبود می‌بخشد (۲۶).

داده‌های مورفولوژیکی ما نیز (با استفاده از رنگ‌آمیزی H & E) اثرات بهبودبخش CGA (به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی) بر روند اسپرمتوزونز، میزان زنده‌مانی اسپرم و میزان باروری در بیضه‌های در معرض تابش را نشان داد. نتایج ما نشان داد که درمان با CGA می‌تواند اثرات سمی IR را کاهش دهد. به طور مشابهی در مطالعه‌ای که توسط Cinkilic و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، لنفوسیت‌ها در معرض دوزهای مختلف تابش پرتو X قرار گرفتند و با غلظت‌های مختلف اسید کلروژنیک درمان شدند. نتایج نشان داد لنفوسیت‌های

تقسیمات میتوزی اسپرماتوگونیا نوع B و افزایش طول فاز G1 چرخه‌ی سلولی کاهش تعداد سلول‌های دودمانی سازنده‌ی اسپرم شده را القاء می‌کند (۱۵) که در نهایت باعث نقص در تولید اسپرم می‌شود. این نقص اسپرم می‌تواند منجر به ناباروری از طریق اولیگواسپرمی یا آزواسپرمی شود (۱۶).

در راستای نتایج به دست آمده، Gong و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که تابش پرتو ایکس باعث آسیب بافتی در بیضه‌ها می‌شود که شواهد آن در لوله‌های سمینفر کوچک شده، توبول‌های بی‌نظم و کاهش در سلول‌های زایا، اختلال در غشای پایه و توبول‌های خالی دیده شد. برخی از مطالعات تحقیقاتی بر روی انسان، کاهش تعداد اسپرم پس از تابش پرتو ایکس را گزارش کرده‌اند و نشان داده شده است که پرتو یونیزان، تعداد کل اسپرماتوزوئیدها و تعداد اسپرماتوزوئیدهای متحرک انسان را کاهش می‌دهد (۱۷).

بر اساس مطالعات انجام شده، توجیه تأثیرات منفی IR بر روی بافت بیضه به این سه موضوع تمرکز می‌یابد:

۱. بافت بیضه به دلیل فراوانی اسیدهای چرب بسیار اشباع نشده، فعالیت متابولیکی بالا، فعالیت میتوزی بالا و وجود سیستم‌های بالقوه‌ی تولید ROS در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو آسیب پذیر است (۱۸). نرخ بالای تقسیم سلولی میزان بالای مصرف اکسیژن توسط میتوکندری اپی‌تلیوم زایا را در این فرایند نشان می‌دهد. شواهد نشان داد که اثرات مخرب تشعشعات یونیزان بر روی بافت بیولوژیکی از طریق فعل و انفعالات مستقیم یا غیرمستقیم ایجاد می‌شود، در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن افزایش غیرطبیعی TNF alpha (Tumour Necrosis Factor alpha) سیتوتوکسیک و آسیب اکسیداتیو رخ می‌دهد (۲۰-۱۸).

۲. تابش یونیزه باعث فعال شدن آپوپتوز سلول اسپرماتوژنیک از طریق فعال‌سازی و تنظیم انواع ژن‌های بالا دست و پایین دست می‌شود که در نهایت منجر به جهش زایی یا آپوپتوز سلول‌های حساس به پرتو یونیزان، کاهش تعداد اسپرم و عملکرد ناقص اسپرم می‌شود. همچنین مسیرهای انتقال سیگنال‌های متعدد که توسط تابش یونیزان تحریک می‌شوند توسط خانواده‌ی بزرگ MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) واسطه‌گری می‌شوند، از جمله کیناز تنظیم‌کننده‌ی سیگنال خارج سلولی ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (۲۱)، کیناز ترمینال P38 MAPK و JNK (Jun N-terminal kinase c) (۲۲).

۳. علاوه بر نقش ROS و آپوپتوز در آسیب سلولی غیرهدفمند ناشی از پرتو، مجموعه‌ای از مطالعات شواهد واضحی را برای نقش اصلی سیتوکین‌ها نشان داده است. از جمله سیتوکین‌هایی که به عنوان سمیت پرتو یونیزه گزارش شده‌اند: ایلترلوکین IL-6 (Interleukin 6).

و بهبود پارامترهای عملکردی بیضه، می‌تواند در برابر اثرات مضر قرار گرفتن در معرض اشعه‌ی X مفید باشد. نتایج ما نشان داد که پیش‌درمانی با اسید کلروژنیک یک روش محافظت کارآمد در مقابل اشعه‌ی یونیزان است. روی هم رفته، فرضیات ما این بود که CGA ممکن است با تأثیر بر وضعیت اکسیداسیون، آپوپتوز و التهاب، زنده ماندن سلول‌های زیبا را افزایش دهد و این بازتابی از عملکردها چندگانه‌ی این پلی‌فنول می‌باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد استفاده از CGA در آینده یک استراتژی بسیار جذاب برای حفظ باروری در مردان در معرض تابش یونیزان باشد. CGA یک ماده‌ی فعال بیولوژیکی از محصولات طبیعی است که دارای عوارض جانبی ناچیزی است و می‌تواند به عنوان یک مکمل بالقوه برای پرتودرمانی معمولی استفاده شود. به نظر می‌رسد که اثرات مثبت CGA می‌تواند در تعدیل آبشارهای سیگنالینگ در جلوگیری از مرگ سلولی در بیضه‌های در معرض تابش یونیزان باشد. این واقعیت پتانسیل دارویی CGA را برای کاربرد بالینی آینده نشان می‌دهد.

صرف نظر از این تأثیرات مشاهده شده، تحقیقات بیشتری برای تعیین اینکه آیا مداخلات محافظتی رادیویی سود طولانی مدت یا کاهش سمیت در جمعیت‌های بالینی مربوطه دارد، لازم است. علاوه بر این با توجه به این که پژوهش حاضر اولین مطالعه‌ی است که به بررسی اثر CGA بر اختلالات بافتی بیضه تحت تابش پرتو X پرداخته است، لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی، پیرامون شناخت دقیق مکانیسم‌های سلولی و مولکولی CGA در کنترل اختلالات بافتی و هورمونی ناشی از تابش پرتو X انجام شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی ارومیه حمایت شده است (شماره مصوب پایان‌نامه: ۹۴۱۱، کد اخلاق در پژوهش: IR.UMSU.REC.1398.367).

درمان شده با اسید کلروژنیک قبل از تابش، کاهش قابل توجهی در آسیب DNA دارند (۲۸).

در چندین مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی کلروژنیک اسید با استفاده از روش آنیون سوپراکسید و رادیکال اسکونجر ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل نشان داده شد (۱۱) و پیشنهاد شد که اسید کلروژنیک یک فیتوکمیکال با خاصیت قوی آنتی‌اکسیدان است. مطالعات نشان می‌دهند که تجویز پیش از تابش با مواد فیتوکمیکال فنلی نظیر کورکومین، اسید کافئیک و نظیر آن برای محافظت از لنفوسیت‌های انسانی در برابر شکستگی رشته DNA و آسیب‌های کروموزومی ناشی از پرتو مؤثر است (۲۷).

CGA دارای گروه‌های هیدروکسیل و سینال بر روی یک باقی‌مانده آروماتیک هستند، که ممکن است علت فعالیت‌های ضد جهش، ضد سرطان‌زایی و آنتی‌اکسیدان در شرایط *in vitro* باشد که به این ترکیب اجازه می‌دهد گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر را جاروب کند (۲۸). علاوه بر این از ویژگی‌های متمایز در مطالعه‌ی ما، کاهش چشمگیر مرگ سلول‌های زیبا ناشی از تابش یونیزان است که در حضور درمان با CGA اتفاق افتاد. این ممکن است به توضیح اثرات محافظتی CGA در برابر آسیب تابش یونیزان کمک کند زیرا از دست دادن سلول‌های زیبا پس از قرار گرفتن در معرض تابش یونیزان به آپوپتوز نسبت داده شده است. تحقیقات اخیر نشان داده است که CGA سبب مهار تخریب DNA و غیر فعال شدن کاسپاز ۳ می‌شود و از طریق مهار پروتئین‌های خانواده BAX سبب مهار آپوپتوز می‌گردد (۱۳). اگرچه هنوز برای درک بهتر اثر CGA در سطح سلولی و مولکولی کار بیشتری لازم است، اما به احتمال زیاد عملکرد محافظتی CGA ممکن است شامل فعال شدن چندین مسیر اصلی مرتبط با آپوپتوز باشد.

### نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که CGA با ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک

## References

- De Felice F, Marchetti C, Marampon F, Casciagli G, Muzii L, Tombolini V. Radiation effects on male fertility. *Andrology* 2019; 7(1): 2-7.
- Topcu A, Mercantepe F, Rakici S, Tumkaya L, Uydu HA, Mercantepe T. An investigation of the effects of N-acetylcysteine on radiotherapy-induced testicular injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2019; 392(2): 147-57.
- Li W, Zeng Y, Zhao J, Zhu CJ, Hou WG, Zhang S. Upregulation and nuclear translocation of testicular ghrelin protects differentiating spermatogonia from ionizing radiation injury. *Cell Death Dis* 2014; 5(5): e1248.
- Ding J, Wang H, Wu ZB, Zhao J, Zhang S, Li W. Protection of murine spermatogenesis against ionizing radiation-induced testicular injury by a green tea polyphenol. *Biol Reprod* 2015; 92(1): 6.
- Tsunoda S, Kimura N, Fujii J. Oxidative stress and redox regulation of gametogenesis, fertilization, and embryonic development. *Reproduct Med Biol* 2014; 13(2): 71-9.
- Marjault HB, Allemand I. Consequences of irradiation on adult spermatogenesis: Between infertility and hereditary risk. *Mutat Res* 2016; 770(Pt B): 340-8.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol* 2011; 25(2): 287-302.



8. Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16(1): 80-84.
9. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; (1): Cd007411.
10. Grin L, Girsh E, Harlev A. Male fertility preservation—Methods, indications and challenges. *Andrologia* 2021; 53(2): e13635.
11. Nguyen TV, Tanihara F, Do L, Sato Y, Taniguchi M, Takagi M, et al. Chlorogenic acid supplementation during in vitro maturation improves maturation, fertilization and developmental competence of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2017; 52(6): 969-75.
12. Nguyen TV, Wittayarat M, Do LTK, Nguyen TV, Nii M, Namula Z, et al. Effects of chlorogenic acid (CGA) supplementation during in vitro maturation culture on the development and quality of porcine embryos with electroporation treatment after in vitro fertilization. *Anim Sci J* 2018; 89(8): 1207-13.
13. Tajik N, Tajik M, Mack I, Enck P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur J Nutr* 2017; 56(7): 2215-44.
14. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, Weitz M, Kearns BP, et al. *Ganong's review of medical physiology*. 26<sup>th</sup> ed. New York, NY: McGraw Hill Education; 2019.
15. Sisodia R, Yadav RK, Sharma KV, Bhatia AL. *Spinacia oleracea* Modulates Radiation-Induced Biochemical Changes in Mice Testis. *Indian J Pharm Sci* 2008; 70(3): 320-6.
16. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 2012; 327(1-2): 48-60.
17. Gong EJ, Shin IS, Son TG, Yang K, Heo K, Kim JS. Low-dose-rate radiation exposure leads to testicular damage with decreases in DNMT1 and HDAC1 in the murine testis. *J Radiat Res* 2014; 55(1): 54-60.
18. Sisodia R, Yadav RK, Sharma KV, Bhatia AL. *Spinacia oleracea* Modulates Radiation-Induced Biochemical Changes in Mice Testis. *Indian J Pharm Sci* 2008; 70(3): 320-6.
19. Sharma P, Parmar J, Sharma P, Verma P, Goyal PK. Radiation-Induced Testicular Injury and Its Amelioration by *Tinospora cordifolia* (An Indian Medicinal Plant) Extract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 20: 64-8.
20. Jyothi K, Kalyani D, Nachiappan V. Effect of acute exposure of N,N-dimethylformamide, an industrial solvent on lipid peroxidation and antioxidants in liver and kidney of rats. *Indian J Biochem Biophys* 2012; 49(4): 279-84.
21. Kucuk Z, Erkeyiran U, Caydere M, Kayaalp D, Karca Altincaba D. The role of melatonin in preventing ovarian tissue damage in rats exposed to magnetic fields. *Turk J Med Sci* 2018; 48(5): 1073-9.
22. Luo Q, Li J, Cui X, Yan J, Zhao Q, Xiang C. The effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the male rats' reproductive system and spermatogenic cell apoptosis exposed to low-dose ionizing irradiation. *J Ethnopharmacol* 2014; 154(1): 249-58.
23. Lierova A, Jelcova M, Nemcova M, Proksova M, Pejchal J, Zarybnicka L, et al. Cytokines and radiation-induced pulmonary injuries. *J Radiat Res* 2018; 59(6): 709-53.
24. Marconi R, Serafini A, Giovanetti A, Bartoleschi C, Pardini MC, Bossi G, et al. Cytokine modulation in breast cancer patients undergoing radiotherapy: a revision of the most recent studies. *Int J Molec Sci* 2019; 20(2): 125-31.
25. Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI, Cammarata FP, Lio D, Messa C, et al. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm (Lond)* 2015; 12: 14-20.
26. Sadaghiani S, Fallahi S, Heshmati H, Teshnizi SH, Chaijan HA, Ebrahimi FFA, et al. Effect of antioxidant supplements on sperm parameters in infertile male smokers: a single-blinded clinical trial. *Am J Public Health* 2020; 7(1): 92-9.
27. Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T, Vatan O, Yilmaz D, Cavas T, et al. Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. *Food Chem Toxicol* 2013; 53: 359-63.

## Improvement of Spermatogenesis and Fertility in Mice under Ionizing Radiation Using Chlorogenic Acid

Masoumeh Zirak Javanmard<sup>1</sup>, Ahad Zeinali<sup>2</sup>, Sasan Ghazanfar Ahari<sup>3</sup>, Neda Abedpour<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** This study was performed to evaluate the effect of chlorogenic acid (CGA) on spermatogenesis in ionizing irradiated (IR) mice.

**Methods:** In this experimental study, 45 mice were divided into 3 equal groups including group 1 (normal saline), group 2 (IR + normal saline), and group 3 (IR + 5, 10, 20, 40, and 80 mg/kg CGA). After 35 days, the histomorphometry of testicular tissue, cells count in different developmental stages, viability of sperms and finally, fertilization capacity was evaluated. Data were analyzed by ANOVA one-way analysis of variance and post hoc Turkey's tests.

**Findings:** The results showed that testicular weight, germinal layer thickness and diameter of seminiferous tubules in the IR group were significantly different from the sham and IR + CGA (40 mg/kg) groups. In addition, in the IR group, the number of spermatogonia cells, primary spermatocytes, spermatid and Leydig cells were significantly decreased compared to the sham group. These changes were significantly ameliorated in the IR + CGA (40 mg/kg) group and histological studies did not show any tissue damage. At the same time, the number of germ cells, the thickness of the epithelium of the seminiferous tubules and the diameter of the seminiferous tubules didn't show significantly difference with the sham group.

**Conclusion:** The present study shows that CGA (40 mg/kg) can be beneficial against the harmful effects of X-ray exposure by improving histopathological changes in the testis.

**Keywords:** Chlorogenic acid; Antioxidants; Testicular; Tissue; Spermatogenesis; Ionizing radiation

**Citation:** Zirak Javanmard M, Zeinali A, Ghazanfar Ahari S, Abedpour N. **Improvement of Spermatogenesis and Fertility in Mice under Ionizing Radiation Using Chlorogenic Acid.** J Isfahan Med Sch 2023; 40(697): 981-90.

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

2- Associate Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Urmia Medical Sciences University, Urmia, Iran

3- Student Research Committee, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

4- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

**Corresponding Author:** Neda Abedpour, Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran; Email: abedpour.n@umsu.ac.ir