مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۲۷۸-۲۷۳

تاثیر امگا۳ برمیزان متیلاسیونDNA اسپرم وساختار هیستولوژیک بیضه رت بعد از درمان با بلئومایسین، اتوپوساید وسیس پلاتین

شهناز رضوی (PhD)[۱*]، فاطمه هاشمی (MSc)[۱]، فرناز خدیوی (MSc)[۱]

۱-گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۹۷/۷/۲۳، اصلاح: ۹۷/۱۲/۱۲، پذیرش: ۹۸/۲/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: در طی روند درمان سرطان، شیمی درمانی علاوه بر اثرات مخرب بر روی سلولهای تومری به بافتهای سالم نیز آسیب می رساند و همچنین تعادل سطح اکسیدان و آنتی اکسیدانها بهم می خورد. لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر امگا۳ به عنوان آنتی اکسیدان بر متیلاسیون DNA اسپرم و ساختار بافت بیضه رت بعد از درمان با داروی ترکیبی شیمی درمانی، ترکیب بلئومایسین، اتوپوساید وسیس پلاتین (Bleomycin, Etoposide, Cisplatine: BEP) می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر رت نر به صورت تصافی به چهار گروه ۱۰ تایی کنترل،BEP، BEP +امگا۳ و امگا۳ تقسیم شدند. گروه کنترل با نرمال سالین ۰/۹٪، به صورت داخل صفاقی و به مدت ۱۸ هفته تیمار شدند. گروه دوم(BEP)، ابتدا به مدت ۹ هفته نرمال سالین ۰/۹٪ را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. سپس به مدت ۹هفته، داروی BEP را با دوزmg/kg ۵/۱، داروی سپس پلاتین و اتوپوساید را با دوز mg/kg ۵/۷ به صورت خوراکی از طریق لوله دریافت ۵ روز اول هفته و دو روز استراحت و همچنین داروی بلئومایسین را با دوز mg/kg ۷۵ به صورت دو روز اول هفته و پنج روز استراحت، دریافت کردند،گروه سوم نیز با داروی BEP به روش قبلی تیمار شده و سپس امگا۳ رادر ۹ هفته دوم، به عنوان آنتی اکسیدان به میزانmg/kg ۳۰۰ روزانه و به صورت خوراکی از طریق لوله دریافت کردند. میزان متیلاسیون DNA اسپرم و ساختار بافت بیضه شامل لوله های منی ساز و ضخامت غشای پایه به ترتیب با کمک رنگ آمیزی ایمنوفلورسانس وپریودیک اسید شیف (PAS) پس از دوره درمان ۱۸ هفته در گروههای مختلف بررسی شد.

یافته‌ها: میانگین درصد متیلاسیون DNA اسپرم در گروه تیمار شده با BEP (۵۲/۲۲±۳/۱۱) به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل (۸۱/۸۰±۲/۹۲) کاهش یافت (p<۰/۰۰۱). درحالیکه میانگین درصد متیلاسیون DNA اسپرم با مصرف امگا۳ بعد از درمان با BEP (۶۷±۲/۱۸) در مقایسه با گروهBEP (؟؟؟±؟؟؟) به طور معنی داری افزایش یافت (p<۰/۰۱). در بررسی بافت بیضه با میکروسکوپ نوری، در گروه تیمار با BEP تعداد سلول های اسپرماتوگونی(۴۴/۹۵±۱/۵۶)، اسپرماتوسیت اولیه(۴۷/۶۰±۱/۴۵) و همچنین ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز (۱۴۵/۵±۵/۶۴) و غشای پایه (۷/۰۷±۰/۲۹) در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت (p<۰/۰۰۱). در حالیکه با مصرف امگا۳ پس از درمان با BEP، بهبود معنی داری در تعداد سلولهای رده زایا وضخامت اپیتلیوم لوله های منی ساز وغشای پایه مشاهده شد(p<۰/۰۱).

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه امگا۳ می‌تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان اثرات سمیت سلولی ناشی از داروهای شیمی درمانی را بهبود بخشد و پیشنهاد می شود بعد از شیمی درمانی برای بیماران سرطانی استفاده شود تا سمیت سلولی ناشی از این داروها را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، اکسیداتیو استرس، امگا ۳، شیمی درمانی، متیلاسیون DNA.

مقدمه

هدف از درمان سرطان، ریشه کن کردن سلولهای تومور در بدن بیماران است. معمولا شیمی درمانی و رادیوتراپی برای کامل کردن روند درمان بعد از جراحی و جلوگیری از متاستاز استفاده می شود (۱). داروهای شیمی درمانی علاوه بر درمان سرطان، باعث آسیب به بافت های دیگر از جمله سیستم تولید مثل در مردان می‌شوند (۲). معمولا تعادل میزان اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها در طول درمان با داروهای ضد سرطان بهم می خورد(۳). از اثرات پاتولوژیک استرس اکسیداتیو (ROS) می توان به کاهش تحرک اسپرم، آسیب DNA، پروتیین و همچنین آپوپتوز اشاره کرد.همه ترکیبات سلول از جمله کربوهیدراتها، پروتیین ها، لیپید و اسیدهای نوکلئیک ازاهداف بالقوه ROS هستند و افزایش استرس اکسیداتیو به عنوان یک عامل مخرب می تواند به اسپرم آسیب برساند و سبب تغییرساختار اسپرم و در نهایت کاهش قدرت باروری اسپرم شود (۵و۴). از داروهای شیمی درمانی می‌توان به تاثیر Bleomycine, Etoposide and Cisplatin (BEP) بر ارگان تولید مثل از جمله کاهش وزن بیضه، کاهش تعداد و حرکت اسپرم، آسیب به DNA، اختلال در روند اسپرماتوژنزیس و آپوپتوز سلولها اشاره نمود (۷و۶).

▣ این مقاله حاصل پایان نامه فاطمه هاشمی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح و طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹۶۱۴۵ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر شهناز رضوی
آدرس: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح. تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۹۰۵۵
E-mail: razavi@med.mui.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.42.7]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.273]

مردان در طی درمان با BEP تحت تاثیر عوامل ایجاد کننده آسیب DNA قرار می‌گیرند که این مسئله بر باروری آنها تاثیر گذار است (۸)، زیرا توانایی باروری اسپرم به سلامت DNA آنها بستگی دارد(۶). متیلاسیون DNA یکی از مکانیسم های اپی ژنتیک است که به خوبی مطالعه شده و شامل اضافه شدن گروه متیل به کربن شماره ۵ در حلقه سیتوزین از طریق پیوند کوالانسی و با کمک آنزیم DNA متیل ترانسفراز می باشد. در مردان، اکتساب الگوی صحیح متیلاسیون DNA سلول های زایا عمدتا در مرحله جنینی رخ می دهد، سپس در بزرگسالی و طی فرآیند اسپرماتوژنز با گذر از اپی دیدیم کامل می‌شود. الگوی صحیح متیلاسیون DNA در تعدادی از پروسه های سلولی مانند توقف در رونویسی برخی ژن‌ها اهمیت دارد(۹). در رت‌هایی که با BEP تیمارشده اند، مشاهده شد الگوی متیلاسیون DNA در بیضه تغییر می‌یابد(۱۰).

ازآنجاکه بدن برای مقابله با آسیب‌های ناشی از رادیکالهای آزاد دارای یک سیستم دفاعی به نام آنتی اکسیدان می باشد. در حال حاضر مشخص شده است که آنتی اکسیدانی مانند امگا ۳ اکسیدانهای تولید شده ناشی از داروی داکسی روبیسین و لیپید پراکسید را در بافت بیضه از طریق عوامل تعدیل کننده اکسیداتیو استرس همچون سوپراکسید دسموتاز وگلوتاتیون پراکسیداز (SODوGSH-PX) کاهش می‌دهد (۱۱). بعلاوه امگا۳ به عنوان یک اسید چرب غیراشباع دارای خواص ضدالتهابی، آنتی اکسیدان و ضد آپوپتوز است و به عنوان یک عامل مهار کننده تکثیر سلولی و تشکیل تومور در سرطان شناخته شده است (۱۲). هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات حفاظتی امگا۳ بر بهبود متیلاسیون DNA اسپرم، رده سلولهای زایا و ساختار بافت بیضه بعد از تیمار با داروی شیمی درمانی BEP می باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی حیوانات: در این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با کد ۳۹۶۱۴۵ بر روی ۴۰ رت نر بالغ ویستار (*wistar*) با وزن ۱۸۰ تا۲۵۰ گرم با سن تقریبی ۱۳- ۱۲ که هفته از موسسه انستیتو پاستور تهران خریداری شد. قبل ازشروع مطالعه، حیوانات به مدت ۱۰ روز تحت شرایط مشابه در ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ساعت روشنایی قرار گرفتند. رت ها در شرایط استاندارد در قفس های مخصوص در دمای۲±۲۱ درجه سانتیگراد همراه با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان در لانه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان نگهداری شدند. تمامی مواد به جز موارد ذکر شده از شرکت Sigma خریداری شدند.

تیمار با BEP و آنتی اکسیدان: رت ها به چهار گروه ۱۰تایی تقسیم شده و به مدت ۱۸ هفته که تقریبا معادل با دو سیکل اسپرماتوژنزیس در رت می باشد، تحت آزمایش قرار گرفتند. گروه کنترل با نرمال سالین ۰/۹٪، به صورت داخل صفاقی و به مدت ۱۸ هفته تیمار شدند. گروه دوم(BEP)، ابتدا به مدت ۹ هفته نرمال سالین ۰/۹٪ را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. سپس به مدت ۹هفته، داروی BEP را با دوز۵/۱ mg/kg، داروی سپس پلاتین و اتوپوساید را با دوز ۵/۷ mg/kg به صورت خوراکی از طریق لوله دریافت ۵ روز اول هفته و دو روز استراحت و همچنین داروی بلئومایسین را با دوز ۷۵ mg/kg به صورت دو روز اول هفته و پنج روز استراحت، دریافت کردند،گروه سوم نیز با داروی BEP به روش قبلی تیمار شده و سپس امگا۳ رادر ۹ هفته دوم، به عنوان آنتی اکسیدان به میزان۳۰۰ mg/kg روزانه و به صورت گاواژ دریافت کردند(۶). تمامی داروها از داروخانه هلال احمر اصفهان خریداری شدند.

تهیه نمونه اسپرم از دم اپی دیدیم: پس از اتمام دوره تیمار، رت ها ابتدا با دوز بالای کتامین ۴۰ mg/kg و زایلزین ۱۰ mg/kg کشته شدند، سپس اپی دیدیم سمت چپ خارج شد. انتهای دیستال دم اپی دیدیم جدا گردید و در پتری دیش حاوی ۱ میلی لیتر نرمال سالین در دمای ۳۷ ^{o}C قرار داده شد، به منظور خروج بهتر اسپرم‌ها چندین برش روی اپی دیدیم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ ^{o}C قرار گرفت و سوسپانسیون از اسپرم تهیه شد.

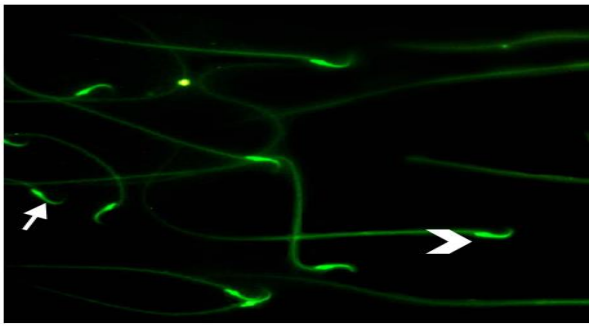
بررسی اثرمتیلاسیون DNA اسپرم با استفاده از تکنیک ایمنوسایتوشیمی: پس از تهیه اسمیر از سوسپانسیون سلولی وفیکس نمودن آنها به مدت۱۰ دقیقه در محلول کارنوی، با بافر فسفات (Phosphate buffered saline PBS) آنها را شسته و برای ۳۰ دقیقه با محلول بلاکینگ حاوی سرم بز و در دمای اتاق انکوبه شدند. برای حذف محلول بلاکینگ، اسمیرها ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شسته شد.سپس اسمیرها در دمای اتاق و برای ۲ ساعت با آنتی بادی مونوکلونال اولیه (Mouse anti 5-Methyl cytidine) از شرکت Acrise انکوبه شدند جهت حذف آنتی بادی اولیه سه بار با PBS شستشو انجام شد و لامها با آنتی بادی ثانویه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) از شرکت Abcam به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. پس از شستشو با PBS نمونه ها توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. تعداد حداقل ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه با بزرگنمایی ۴۰۰x بررسی و درصد اسپرم‌های دارای متیلاسیون DNA مشخص گردید. رنگ سبز درخشان مربوط به اسپرم های متیله شده می باشد، در حالیکه در اسپرم های با رنگ سبز کدر متیلاسیون DNA صورت نگرفته است(۶).

بررسی بافت شناسی بیضه با رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS): پس از کشته شدن رت ها و خارج کردن بیضه چپ جهت جلوگیری از تغییرات سلولی نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در فیکساتیو بوئن قرار گرفتند. پاساژ بافت توسط دستگاه خودکار پردازنده اتوماتیک انجام شد و پس از قالب‌گیری و به کمک دستگاه میکروتوم مقاطع با ضخامت ۵µm از بیضه چپ تهیه گردید. برای رنگ آمیزی در ابتدا مقاطع تهیه شده در الکل‌های نزولی با غلظت ۹۰-۸۰-۷۰درصد قرار گرفتند (به مدت ۱ دقیقه برای هریک). سپس لام ها به مدت ۵ دقیقه در محلول اسید پریودیک در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از شستشو با آب جاری، بمدت ۱۵ دقیقه در محلول معرف شیف در دمای اتاق قرار گرفته و پس از شستشو بمدت ۵ دقیقه با آب در محلول هماتوکسیلین بمدت ۹۰ ثانیه قرارگرفت. آبگیری از نمونه ها در الکل‌های صعودی با غلظت‌های ۹۰-۱۰۰-۱۰۰درصد(هر غلظت ۳ ثانیه) انجام گرفت. سپس لام‌ها در ۲ مرحله و هر بار به مدت ۲ دقیقه در محلول گزیلل قرار داده شد. پس از مونت لام ها، به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ x از مقاطع بافتی عکس تهیه شد. شمارش سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، لایدیگ (بر اساس موقعیت، اندازه و مرفولوژی سلولها)، اندازه گیری قطر داخلی،خارجی و ضخامت اپی تلیوم لوله های منی سازوغشای پایه با استفاده از نرم افزار Image J و حداقل در ۵ مقطع از لوله های منی ساز برای هر نمونه انجام شد. آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS۲۲ وInc.,Chicago,IL انجام گرفت و از آزمون ANOVA One-way جهت بررسی اختلافات معنی‌دار بین گروه ها استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.42.7]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.273]

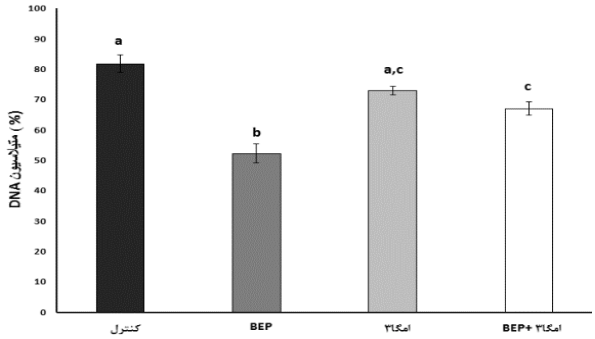
یافته ها

تاثیر امگا۳ برمتیلاسیون DNA اسپرم پس از تیمار با BEP: جهت تعیین میانگین درصد اسپرم های متیله شده، تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند که اسپرم های با رنگ سبز درخشان دارای DNA متیله شده هستند ومثبت در نظر گرفته شدند. درحالیکه، اسپرم های با رنگ سبز کدر متیلاسیون DNA انجام نشده و منفی در نظر گرفته شدند (شکل۱). میانگین درصد متیلاسیون DNA اسپرم در گروه تیمار شده با BEP (۵۲/۲۲±۳/۱۱) به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل (۸۱/۸۰±۲/۹۲) کاهش یافته بود (p<۰/۰۰۱) در حالیکه بعد از مصرف امگا۳ درگروه تیمار شده با BEP میانگین درصد اسپرم‌های متیله شده (۶۷±۲/۱۸) نسبت به گروهBEP بطور معنی داری افزایش یافته است (p<۰/۰۱). بعلاوه میانگین درصد اسپرم های دارای DNA متیله شده دراین گروه در مقایسه با گروه کنترل کمتر بوده و تفاوت معنی داری نیز در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (p<۰/۰۱). درحالیکه میانگین درصد متیلاسیون DNA در گروه امگا۳ (۷۳±۱/۳۹) نسبت به گروه BEP اختلاف معنی داری نشان داد (p<۰/۰۱) اما تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل نداشت (نمودار۱).



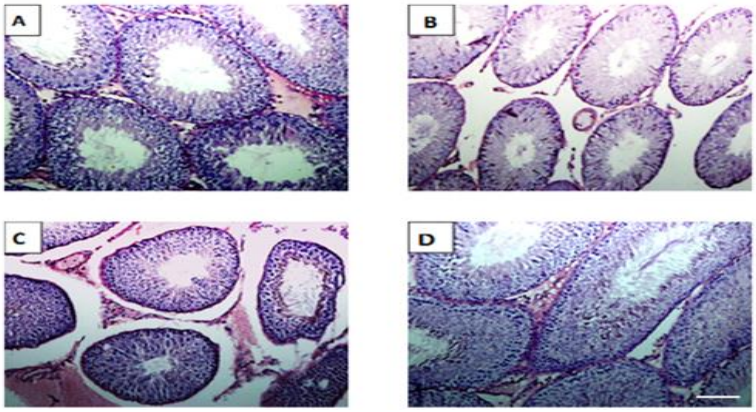
شکل ۱. فتومیکروگراف تهیه شده از اسپرم های دارای متیلاسیون DNA، علامت chevron اسپرم متیله شده با رنگ سبز درخشان نشان می دهد و علامت پیکان اسپرم متیله نشده را به رنگ سبز تیره نشان می دهد. (بزرگنمایی ۴۰۰×).(scale bar 100µm)

بررسی نتایج ساختار بافتی بیضه: پس از رنگ آمیزی PAS و با استفاده از نرم افزار Image J مقاطع تهیه شده از بافت بیضه بررسی و قطر داخلی و خارجی لوله های منی ساز اندازه گیری شد به علاوه ضخامت اپی تلیوم ژرمینال و غشای پایه محاسبه گردید. همچنین سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه ولایدیگ برای هر لوله شمارش شد. تمامی این سلول‌ها به کمک نرم افزار Image J شمارش شدند (شکل۲).



نمودار ۱. مقایسه میانگین درصد متیلاسیون DNA اسپرم در گروههای مختلف. داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده اند. حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار میباشند p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شده است

بعد از تیمار با BEP میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (۴۴/۹۵±۱/۵۶)، اسپرماتوسیت اولیه (۴۷/۶۰±۱/۴۵) ولایدیگ (۷/۵۱±۰/۵۸) در مقایسه با گروه کنترل که بترتیب ۶۱/۹±۲/۲۳ ۶۶/۲۰±۲/۱۶ و۱۸/۴۰±۱/۲۴ بود کاهش معنی‌داری یافت (p<۰/۰۰۱). همچنین تغییرات مورفولوژیک در لوله های منی ساز مانند به هم ریختگی ساختار بافتی، آتروفی لوله های منی ساز وکاهش معنی دار ضخامت اپی تلیوم(۱۴۵/۵±۵/۶۴) و غشای پایه (۷/۰۷±۰/۲۹) در لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه کنترل که به ترتیب ۳۷۷/۴±۹/۵۲ و ۱۲/۴۸±۰/۶۲ بود دیده شد (p<۰/۰۰۱). بعلاوه در گروه BEP تیمار با امگا۳ میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (۶۰/۵۵±۲/۳۰) و اسپرماتوسیت اولیه (۶۵/۷۰±۲/۳۰) و لایدیگ (۲۱/۵۰±۱/۱۹) و ضخامت اپی تلیوم (۱۸۸/۰±۱۳/۴۵) و غشای پایه (۱۲/۹۸±۰/۶) لوله های منی ساز افزایش معنی داری نسبت به گروه BEP مشاهده گردید (p<۰/۰۰۱). علاوه بر این در گروه تیمار با امگا۳ میانگین اسپرماتوگونی ۶۹/۲۴±۱/۱۰ و اسپرماتوسیت اولیه ۷۲/۹۶±۹/۶ و همچنین ضخامت اپیتلوم (۳۰۲/۵±۱۳/۰۵) غشای پایه (۱۲/۰۹±۰/۳۵) لوله های منی ساز نسبت به گروه BEP و BEP تیمار با امگا۳ افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۵) در حالیکه نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد(جدول۱).



شکل ۲. میکروگراف تهیه شده از مقاطع بافت بیضه ولوله های منی ساز بعد از رنگ آمیزی با روش PAS. مقاطع لوله های منی ساز در گروههای کنترل(A)، گروه(B) BEP، امگا۳ + BEP (C)و امگا۳(D)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.42.7]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.273]

جدول ۱. میانگین تعداد سلول های رده اسپرماتوژنز وضخامت اپی تلیوم لوله ها وغشای پایه در گروههای مختلف

گروه	اسپرماتوگونی Mean±SD	اسپرماتوسیت اولیه Mean±SD	سلولهای لایدیگ Mean±SD	ضخامت اپی تلیوم لوله منی ساز(µm) Mean±SD	ضخامت غشای پایه لوله منی ساز (nm) Mean±SD
کنترل	۶۱/۹±۲/۲۳ a	۶۶/۲۰±۲/۱۶ a	۱۸/۴۰±۱/۲۴ a	۳۷۷/۴±۹/۵۲ a	۱۲/۴۸±۰/۶۲ a
BEP	۴۴/۹۵±۱/۵۶ b	۴۷/۶۰±۱/۴۵ b	۷/۵۱±۰/۵۸ b	۱۴۵/۵±۵/۶۴ b	۷/۰۷±۰/۲۹ b
امگا۳	۶۹/۲۴±۱/۱۰ a,c	۷۲/۹۶±۹/۶a,c	۲۳/۱۳±۱/۶۰ c	۳۰۲/۵±۱۳/۰۵ c	۱۲/۰۹±۰/۳۵ a,c
BEP+امگا۳	۶۰/۵۵±۲/۳۰ a,d	۶۵/۷۰±۲/۳۰a,d	۲۱/۵۰±۱/۱۹a,c	۱۸۸/۰±۱۳/۴۵ d	۱۲/۹۸±۰/۶ a,c

حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۵$ می باشد

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد میزان متیلاسیون DNA بعد از تیمار با داروی BEP در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته، ولی بعد از مصرف امگا۳ متیلاسیون DNA در مقایسه با گروه BEP افزایش چشمگیری داشت. دربررسی مقاطع بافتی این مطالعه مشخص شد که در گروه تیمار شده با BEP تعداد سلولهای رده ژرم و لایدیگ و همچنین ضخامت اپی تلیوم وغشای پایه لوله های منی ساز کاهش یافته اما بعد از تیمار با امگا۳ اثرات بهبودی مشاهده شد. با بررسی تغییرات اپی ژنتیک در DNA اسپرم به دنبال درمان سرطان بیضه مشخص شد الگوی DNA متیلاسیون تغییر می یابد. به گونه ای که در اغلب ژن هایی که تحت تاثیر قرار گرفته بودند میزان متیلاسیون DNA تغییر یافته بود(۱۰). همچنین با بررسی اثرات داروهای BEP روی رت ها دریافتند، این داروها سبب افزایش شکست در DNA اسپرماتوزوا و تغییر در تمامیت کروماتین اسپرم می‌گردد که این تغییرات می توانند منجربه ناباروری شوند(۷). اخیرا مشخص شده است که BEP سبب از بین رفتن سلولهای زایای تشکیل دهنده پوشش لوله های منی ساز می‌گردد و مصرف آنتی اکسیدان روی، سبب بهبود این تغییرات می گردد (۱۳). بعلاوه امگا ۳ میتواند سبب حفاظت ساختار کروماتین در مقابل اثرات مخرب BEP گردد(۶). همچنین در بررسی مقاطع بافتی این مطالعه مشخص شد که در گروه تیمار شده با BEP تعداد سلولهای رده ژرم ولایدیگ و همچنین ضخامت اپی تلیوم وغشای پایه لوله های منی ساز کاهش یافته اما بعد از تیمار با امگا۳ اثرات بهبودی مشاهده شد. در این راستا مطالعه قبلی اثر حفاظتی امگا ۳ بر ساختار بافت بیضه در مقابل داکسی روبیسین که سبب بهم ریختگی بافت بیضه وکاهش رده‌های سلول های زایامی شود تایید شده است(۱۱). نتایج این مطالعه با بررسی حاضر مطابقت داشته و در این مطالعه نیز دیده شد که در گروه درمان شده با BEP تعداد سلولهای رده ژرم، سلولهای لایدیگ و همچنین ضخامت اپی تلیوم وغشای پایه لوله های منی ساز کاهش یافته اما بعد از درمان با امگا ۳ اثرات بهبودی مشاهده شد. مشخص شده است که داروی سیس پلاتین به تنهایی باعث ایجاد تغییرات مخرب هیستوپاتولوژیک در بافت بیضه شده وسبب بهم ریختگی بافت، واکوئلیزه شدن و دژنره شدن اپیتلیوم ژرمینال می شود و در زمان استفاده از آنتی اکسیدان این آسیب ها بهبودمی یابد(۱۴). در مطالعه حاضر داروهای BEP نیز اثرات مخرب بر پوشش لوله های منی ساز ایجاد نمود و با مصرف امگا۳ بخشی از این اثرات نامطلوب برطرف شد. همچنین مطابق با یافته های این مطالعه، دربررسی مقاطع بافتی پس از درمان با داروهای BEP کاهش در تعداد لوله های منی ساز،تعداد سلولهای اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه ولایدیگ مشاهده شده است (۱۵). بعلاوه درسال ۲۰۱۱ اثرات داروهای شیمی درمانی BEP بر روی سلول های اسپرماتوگونی رت گزارش شد این داروها منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می شوند و تخریب سلول-های بنیادی اسپرماتوگونی را به همراه دارند(۱۶)که با یافته های این مطالعه مطابقت دارد. در مجموع می‌توان دریافت امگا۳ می‌تواند اثرات سیتوتوکسیک BEP بر متیلاسیون DNA و ساختار هیستولوژیک لوله های منی ساز را بهبود بخشد. توصیه می‌شود بیماران تحت درمان با عوامل شیمی درمانی پس از شیمی درمانی، از امگا۳ جهت بهبودی اثرات سمیت داروهای شیمی درمانی استفاده نمایند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.42.7]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.273]

Effect of Omega-3 on Rat Sperm DNA Methylation and Histological Structure of Testis after Treatment with Bleomycin, Etoposide and Cisplatin (BEP)

Sh. Razavi (PhD)*[1], F. Hashemi (MSc)[1], F. Khadivi (MSc)[1]

1.Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 273-78

Received: Oct 15th 2018, Revised: Mar 3rd 2019, Accepted: May 20th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: During the cancer treatment course, in addition to the destructive effects on the tumor cells, chemotherapy also damages healthy tissues and disrupts the balance of oxidant and antioxidant levels. The present study was conducted to evaluate the effect of omega-3 on sperm DNA methylation and histological structure of rat testis after treatment with combination chemotherapy using bleomycin, etoposide and cisplatin (BEP).

METHODS: In this experimental study, 40 male rats were randomly divided into four groups of control, BEP, BEP+omega-3 and omega-3 (n=10). The control group was treated with 0.9% normal saline intraperitoneally for 18 weeks. The second group (BEP) first received 0.9% normal saline intraperitoneally for nine weeks. Then, it received BEP at 5.1 mg / kg for nine weeks, received etoposide and cisplatin at 5.7 mg/kg through gavage on days 1-5 of each week, and then received bleomycin at 75 mg/kg on days 2 of each week. The third group was gavaged with 0.9% saline for 9 weeks and then, orally received 300 mg/kg/day omega-3(capsule containing 1000 mg, 18% EPA and 12% DHA) for 9 weeks and in BEP + omega-3 group treated with BEP based on the same method and then orally received 300 mg/kg omega-3 as an antioxidant for the second nine weeks daily. Sperm DNA methylation and histological structure of rat testis including seminiferous tubules and basement membrane thickness were respectively evaluated by immunofluorescence staining and Periodic acid – Schiff (PAS) after 18 weeks of treatment in all groups.

FINDINGS: The mean percentage of sperm DNA methylation in the BEP-treated group (52.22±3.11) was significantly decreased compared to the control group (81.80±2.92) ($p<0.001$). However, the mean percentage of sperm DNA methylation increased significantly with omega-3 use after treatment with BEP (67±2.18) compared with BEP group ($p<0.01$). In light microscopy of testicular tissue, the number of spermatogonial cells (44.95±1.56), primary spermatocytes (47.60±1.45) as well as the epithelial thickness of seminiferous tubules (145.5±5.64) and basement membrane (7.07±0.29) decreased in the BEP-treated group in comparison with control group ($p<0.001$). However, the use of omega-3 after treatment with BEP significantly improved the number of germ cells and epithelial thickness of the seminiferous tubule and basement membrane ($p<0.01$).

CONCLUSION: Based on the results of this study, omega-3 as an antioxidant can improve the cytotoxic effects of chemotherapy drugs and it is recommended to be used for cancer patients after chemotherapy to reduce the cytotoxicity of these drugs.

KEY WORDS: *Antioxidant, Oxidative Stress, Omega-3, Chemotherapy, DNA Methylation.*

Please cite this article as follows:

Razavi Sh, Hashemi F, Khadivi F. Effect of Omega-3 on Rat Sperm Dna Methylation and Histological Structure of Testis after Treatment with Bleomycin, Etoposide and Cisplatin (BEP). J Babol Univ Med Sci. 2019;21: 273-78.

***Corresonding Author: Sh. Razavi (PhD)**

Address: Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran

Tel: +98 31 37929055

E-mail: razavi@med.mui.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.42.7]

[DOI: 10.22088/jbums.21.1.273]

References

1.Hervieu A, Rébé C, Végran F, Chalmin F, Bruchard M, Vabres P, et al. Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. J Invest Dermatol. 2013;133(2):499-508.

2.Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival. Chem Res Toxicol. 2009;23(1):6-10.

3.Sikka SC. Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl. 2004;25(1):5-18.

4.Akbari A, Jelodar GA. The effect of oxidative stress and antioxidants on men fertility. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15(7):e92918.

5.Dasdag S, Ketani M, Akdag Z, Ersay A, Sari I, Demirtas Ö, et al. Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. Urol Res. 1999;27(3):219-23.

6.Hashemi F, Razavi S, Khadivi F. The protective effects of omega3 on ubiquitination and protamination of rat sperm after bleomycin, etoposide, and cisplatin treatment. Nutr Cancer. 2018; 70(8):1308-14.

7.Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. J Androl. 2007;28(2):241-9.

8.Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, et al. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. Fertil Steril. 2004;81(4):965-72.

9.Oakes C, La Salle S, Smiraglia D, Robaire B, Trasler J. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. Dev Biol. 2007;307(2):368-79.

10.Chan D, Delbès G, Landry M, Robaire B, Trasler JM. Epigenetic alterations in sperm DNA associated with testicular cancer treatment. Toxicol Sci. 2011;125(2):532-43.

11.Uygur R, Aktas C, Tulubas F, Uygur E, Kanter M, Erboga M, et al. Protective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced testicular apoptosis and oxidative damage in rats. Andrologia. 2014;46(8):917-26.

12.Bas O, Songur A, Sahin O, Mollaoglu H, Ozen OA, Yaman M, et al. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. Neurochem Int. 2007;50(3):548-54.

13. Razavi S, Khadivi F, Hashemi F, Bakhtiari A. Effect of Zinc on Spermatogenesis and Sperm Chromatin Condensation in Bleomycin, Etoposide, Cisplatin Treated Rats. Cell J. 2019;20(4):521-6.

14.Heeba GH, Hamza AA, Hassanin SO. Induction of heme oxygenase-1 with hemin alleviates cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Toxicol Lett. 2016;264:38-50

15.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;7:122.

16.Coşkun N, Hatipoğlu MT, Özoğul C, Korkmaz C, Akyol SN, Mıcılı SC, et al. The protective effects of Acetyl L-Carnitine on testis gonadotoxicity induced by Cisplatin in rats. Balkan Med J. 2013;30(2):235-41.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.42.7]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.273]