

Original Article

Effect of Selenium on Testicular Tissue in Adult NMRI Mice Following Cyclophosphamide-Induced Toxicity

Malek Soleimani Mehranjani¹ , Zahra Safari¹ , Sepideh Ahmadi¹ 

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

✉ Corresponding author:

Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

Email:

m-soleimani@araku.ac.ir

Tel: +98 9181617098

Postal Code:

Received: November 09, 2025

Revised: May 12, 2026

Accepted: June 10, 2026

Citation:

Soleimani Mehranjani M, Safari Z, Ahmadi S. Effect of Selenium on Testicular Tissue in Adult NMRI Mice Following Cyclophosphamide-Induced Toxicity. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 34(4): 10134-149.

Introduction: Cyclophosphamide, as a chemotherapeutic drug, causes induction of oxidative stress and disruption in the testis structure and function. In this study, the effect of selenium as a strong antioxidant on the testicular tissue of male mice after treatment with cyclophosphamide was evaluated.

Methods: For this experimental study, 32 adult male NMRI mice were divided into four groups of eight: control, cyclophosphamide (100 mg/kg, administered once weekly), selenium (1 mg/kg daily for 35 days), and a combination of cyclophosphamide and selenium. Following the 35-day treatment period, the mice were dissected; the left testis was utilized to measure malondialdehyde (MDA) levels and total antioxidant capacity (TAC), while the right testis, after undergoing fixation, tissue processing, sectioning, and hematoxylin-eosin staining, was employed for stereological analyses. Data were analyzed using SPSS software, applying one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, with statistical significance set at $p < 0.05$.

Results: In the cyclophosphamide group compared to control, a significant decrease was observed in mean total testis volume, seminiferous tubules volume ($p < 0.001$), interstitial tissue volume ($p < 0.01$), as well as in the length, diameter, and height of the germinal epithelium, basement membrane thickness, number of spermatogenic, Sertoli and Leydig cells, spermatogenesis indices, Johnsen score, and TAC level of testicular tissue ($p < 0.001$), while the MDA level significantly increased ($p < 0.001$). In the cyclophosphamide plus selenium group, these changes were compensated at the control level.

Conclusion: The results showed that cyclophosphamide induces oxidative stress, causes disruption in the structure and function of the testis. While selenium reduced these damages and improved important histological and oxidative stress parameters to levels similar to the control group, suggesting a protective role against cyclophosphamide-induced testicular damage.

Keywords: Cyclophosphamide, Selenium, Mouse testis, Biochemical factors, Stereology.

اثر سلنیوم بر بافت بیضه در موش‌های بالغ NMRI به دنبال القاء سمیت ناشی از سیکلوفسفامید

ملک سلیمانی مهرنجانی^۱ , زهرا صفری^۱ , سپیده احمدی^۱ ^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

✉ نویسنده مسئول:

ملک سلیمانی مهرنجانی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

پست الکترونیک:

m-soleimani@araku.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۸۱۶۱۷۰۹۸

صندوق پستی:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۰

ارجاع:

سلیمانی مهرنجانی ملک، صفری زهرا، احمدی سپیده. اثر سلنیوم بر بافت بیضه در موش‌های بالغ NMRI به دنبال القاء سمیت ناشی از سیکلوفسفامید. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۴ (۴): ۱۴۹-۱۰۱۳۴.

مقدمه: سیکلوفسفامید به عنوان یک داروی شیمی درمانی باعث القاء استرس اکسیداتیو و اختلال در ساختار و عملکرد بیضه می‌شود. در این مطالعه اثر سلنیوم به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی بر بافت بیضه موش‌های نر پس از تیمار با سیکلوفسفامید ارزیابی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش نر بالغ NMRI در چهار گروه (n=۸) شامل کنترل، سیکلوفسفامید (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم، هفته‌ای یک بار)، سلنیوم (۱ میلی گرم/کیلوگرم روزانه به مدت ۳۵ روز) و سیکلوفسفامید + سلنیوم تقسیم شدند. پس از ۳۵ روز تیمار، موش‌ها تشریح شدند؛ بیضه چپ برای سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل (TAC) و بیضه راست پس از فیکساسیون، پاساژ بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین برای بررسی‌های استریولوژیک استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار نسخه ۱۶ SPSS، آزمون ANOVA یک‌طرفه و تست Tukey تحلیل شدند ($p < 0.05$).

نتایج: در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌دار میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز ($p < 0.001$)، حجم بافت بینابینی ($p < 0.01$)، طول، قطر، ارتفاع اپیتلیوم زایشی، ضخامت غشاء پایه، تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک، سرتولی و لیدیک، شاخص‌های اسپرماتوژنز، امتیاز جانسن و سطح TAC بافت بیضه ($p < 0.001$) مشاهده شد، اما سطح MDA به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.001$). در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم، این تغییرات در سطح گروه کنترل جبران شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سیکلوفسفامید با القاء استرس اکسیداتیو موجب اختلال در ساختار و عملکرد بیضه می‌شود. در حالی که سلنیوم این آسیب‌ها را کاهش داد و پارامترهای مهم بافت‌شناسی و اکسیداتیو را تا سطح گروه کنترل جبران کرد، که نشان‌دهنده اثر محافظتی آن بر بافت بیضه تیمار شده با سیکلوفسفامید است.

واژه‌های کلیدی: سیکلوفسفامید، سلنیوم، بیضه موش، فاکتورهای بیوشیمیایی، استریولوژی

مقدمه

سیکلوفسفامید یکی از رایج‌ترین داروهای شیمی‌درمانی است و به‌عنوان یک عامل آلکیل‌کننده، در درمان انواع سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمنی و همچنین برای جلوگیری از رد پیوند تجویز می‌شود (۱). مکانیسم عملکرد عوامل آلکیل‌کننده‌ای مانند سیکلوفسفامید بر ایجاد اتصال متقابل در رشته‌های DNA استوار است که موجب اختلال در رشد سلولی، فعالیت میتوزی، تکثیر و تمایز سلول‌ها می‌شود. این عملکرد، اساس اثرات درمانی سیکلوفسفامید را تشکیل می‌دهد، اما در عین حال منشأ اثرات سمی آن نیز می‌باشد. به همین دلیل این دارو می‌تواند بر سلول‌های طبیعی در حال تقسیم، به‌ویژه سلول‌هایی با سرعت تقسیم بالا مانند سلول‌های جنسی، اثرات سمی قابل‌توجهی ایجاد کند (۲،۳،۴). در همین راستا، گزارش‌هایی مبنی بر اثر سیکلوفسفامید در کاهش باروری مردان، کاهش وزن بیضه‌ها و تغییرات پاتولوژیک در این اندام و نیز افزایش وقوع الیگواسپرمی و آزواسپرمی، در مردان درمان شده با سیکلوفسفامید، وجود دارد (۵،۶،۷). یکی از عوارض سمی سیکلوفسفامید، ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو از طریق تأثیر بر پروتئین‌ها و مولکول‌های کلیدی دخیل در حفاظت سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو است. از جمله‌ای این عوامل می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلووتاتیون و ویتامین‌های E و C اشاره کرد که سیکلوفسفامید با کاهش سطح آن‌ها موجب افزایش استرس اکسیداتیو و در نهایت آسیب به بافت بیضه می‌شود (۸، ۷). همچنین سیکلوفسفامید باعث کاهش میزان آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز می‌گردد؛ آنزیمی که در تولید (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) NADPH نقش داشته و برای بازسازی گلووتاتیون ضروری است (۹). علاوه بر این، سیکلوفسفامید موجب کاهش سطح Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) می‌شود (۲)؛ پروتئینی کلیدی که با تنظیم تولید آنتی‌اکسیدانت‌ها و هماهنگ‌سازی عملکرد سایر پروتئین‌های محافظ، در کاهش

سطح گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) و حفظ تعادل سلولی در برابر استرس اکسیداتیو نقش اساسی دارد (۱۰). سلنیوم یک عنصر کمیاب ضروری است که در ساختار برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی نقش دارد و در دفاع سلول در برابر استرس اکسیداتیو مؤثر است. این عنصر جزء اصلی آنزیم گلووتاتیون پراکسیداز بوده و به تبدیل پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای چربی به مولکول‌های پایدارتر کمک می‌کند. در نتیجه، این فرآیند از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کرده و از غشای سلولی و اندامک‌های درون سلول در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۱،۱۲). نتایج مطالعات Mohammadpour و همکاران در سال ۲۰۲۱ درباره اثر حفاظتی سلنیوم و ویتامین E بر اسپرماتوژن در موش‌های صحرایی مقاوم به انسولین نشان داد که سلنیوم به‌عنوان یک عنصر حیاتی در بافت بیضه شناخته می‌شود و نقش ضروری در فرآیند اسپرماتوژن و باروری مردان ایفا می‌کند (۱۳). همچنین نتایج پژوهش Apaydin و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی موش نشان داد که سلنیت سدیم نقش محافظتی قابل‌توجهی در کاهش سمیت بیضه ناشی از نیترات سرب در موش‌های دیابتی و غیردیابتی دارد (۱۴). علاوه بر این، در مطالعه Mahrous و همکاران (۲۰۲۰) یافته‌ها بیانگر آن بود که سلنیوم موجب کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، افزایش سطح سرمی هورمون محرک فولیکول (FSH) و هورمون لوتئینه‌کننده (LH)، بهبود ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک بیضه و همچنین جلوگیری از کاهش وزن بیضه می‌شود (۱۵). با توجه به اینکه تجویز سیکلوفسفامید در مردان مبتلا به سرطان می‌تواند موجب اختلالات باروری شود و اثر همزمان سلنیوم و این دارو بر بافت بیضه با استفاده از تکنیک استریولوژی تاکنون بررسی نشده است، در این مطالعه اثر سلنیوم به‌عنوان یک ریزمغذی ضروری با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قوی، بر شاخص‌های بیوشیمیایی و تغییرات استریولوژیک بافت بیضه در موش‌های نر بالغ نژاد

NMRI تیمار شده با سیکلوفسفامید مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

گروه بندی و روش تیمار حیوانات: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش نر بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی 25 ± 36 گرم (۶ هفته‌ای) از خانه حیوانات دانشگاه اراک تهیه شد و سپس در طول مدت تیمار، در شرایط کاملاً استاندارد (دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنائی) و دسترسی آزاد به آب و غذا، در خانه حیوانات دانشگاه اراک نگهداری شد. موش‌ها پس از توزین، به صورت کاملاً تصادفی، به ۴ گروه ($n=8$) تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه سیکلوفسفامید (سیکلوفسفامید منویدرات، شرکت سیگما، آلمان، Cat. No. C0768) (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، هفته‌ای یکبار، اول هر هفته به مدت ۵ هفته) (۱۶-۱۸)، گروه سلنیوم (سلنیت سدیم، شرکت سیگما، آلمان، Cat. No. 6214485) (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، روزانه به مدت ۳۵ روز) (۱۹،۲۰) و گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم. تیمارها به صورت تزریق درون صفاقی انجام شد.

تشریح موش‌ها: پس از تمام شدن دوره ۳۵ روزه تیمار و وزن‌کشی نهایی (وزن ثانویه)، موش‌ها با استفاده از مواد کتامین (Ketamine 10%, Alfasan, 100 mg/kg; Woerden, the Netherlands) و زایلازین (Xylazine 2%, Alfasan, Woerden, and the Netherlands) (10 mg/kg) بیهوش شدند. با ایجاد شکاف در اسکروتوم، بیضه‌چپ به منظور اندازه‌گیری میزان MDA و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل (TAC) بافت و بیضه راست به منظور بررسی‌های استریولوژیک، از بدن جدا شد. حجم کل بیضه به روش غوطه‌ورسازی محاسبه شد، بدین منظور یک بشر حاوی آب مقطر بر روی ترازو قرار گرفت و سپس ترازو را صفر کرده و در ادامه بافت بیضه توسط یک نخ نازک، آویزان شده و کاملاً غوطه‌ور گردید. پس از آن عدد نشان داده شده توسط ترازو، به عنوان حجم بیضه بر حسب سانتی‌متر مکعب در نظر

گرفته شد. به عبارت دیگر در این مرحله حجم کل بیضه قبل از چروکیدگی بافت، محاسبه گردید (۱۷). بیضه راست به منظور بررسی‌های استریولوژیک پس از توزین به داخل فیکساتیو (MDF (Modified Davidson's Fluid) انتقال داده شد و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید (۱۷) و سپس برش‌های IUR (Isotropic uniform random sampling) از بافت بیضه گرفته شد. پس از طی نمودن مراحل پاساژ بافت، بلوک‌گیری با پارافین مذاب انجام شد و توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت‌های ۵ و ۲۰ میکرون، از نمونه‌های بافتی تهیه شد و در نهایت رنگ‌آمیزی برش‌ها با روش همتوکسیلین-ئوزین (مرک، آلمان) صورت گرفت.

محاسبه چروکیدگی بافت بیضه: به منظور اندازه‌گیری چروکیدگی بافت، سه قطعه گرد از برش‌های موبوط به بافت بیضه هر موش تهیه و ۲ قطر عمود برهم این قطعات، توسط کولیس ورنیه، اندازه‌گیری شد و میانگین شعاع آن‌ها به عنوان شعاع قبل از چروکیدگی (r_{before}) در نظر گرفته شد. پس از طی مراحل پاساژ بافتی و بلوک‌گیری، از هر قطعه، ۳ برش ۵ میکرونی توسط دستگاه میکروتوم گرفته و پس از رنگ‌آمیزی، مجدداً ۲ قطر عمود برهم این قطعات، توسط کولیس ورنیه اندازه‌گیری شده و میانگین شعاع آن‌ها به عنوان شعاع بعد از چروکیدگی (r_{after}) لحاظ گردید. میزان چروکیدگی بافت بیضه به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{Shrinkage} = 1 - \left(\frac{r_{\text{after}}^2}{r_{\text{before}}^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

حجم کل بافت بیضه بعد از چروکیدگی از طریق ضرب مقدار عدم چروکیدگی در حجم کل بیضه قبل از چروکیدگی (حجمی که به روش غوطه‌ورسازی به دست آمد) محاسبه شد (۲۱).

تخمین حجم بافت بینابینی و لوله‌های منی‌ساز: به منظور تخمین حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی، با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک به طور میانگین پنج میدان دید با فاصله یکسان، از هر برش ۵ میکرونی با میکروسکوپ مدل Olympus BX41TE تجهیز

طولی لوله‌های منی‌ساز و قطر کوچک آن در امتداد قطر کوچک لوله‌ها قرار گرفت؛ نهایتاً قطر کوچک ۲۰۰-۱۰۰ لوله منی‌ساز را با استفاده از نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها به‌عنوان قطر لوله‌های منی‌ساز در نظر گرفته شد (۱۷).

تخمین ارتفاع اپیتلیوم زایشی

به منظور تخمین ارتفاع اپیتلیوم زایشی، روی تصاویر حاصله از هر میدان دید، پروب مخصوص سطح انداخته شد و به‌طور میانگین ۲۰۰-۱۰۰ نقطه برخورد کرده با کل بافت بیضه، شمارش گردید. در ادامه نقاط برخوردی با اپیتلیوم زایشی، و نیز نقاط برخورد کرده با سطح لومنی اپیتلیوم زایشی، به‌طور جداگانه شمارش شد. سپس با تقسیم کل نقاط برخورد کرده با اپیتلیوم زایشی ($\sum_{i=1}^n P_{epitellium}$) بر کل نقاط برخورد کرده با بافت بیضه، دانسیته حجمی اپیتلیوم زایشی (V_v)، براساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$V_v(epitellium) = \frac{\sum_{i=1}^n P_{epitellium}}{\sum_{i=1}^n P_{total}}$$

دانسیته سطحی اپیتلیوم زایشی (S_v) نیز با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد:

$$S_v = 2 \times \frac{\sum_{i=1}^n I_i}{I/p \times \sum P_i}$$

که در آن، $\sum I$: مجموع نقاطی از پروب که با سطح لومنی اپیتلیوم زایشی برخورد کرده‌اند، $\sum P$: مجموع نقاط برخوردی با بافت بیضه و I/p : طول هر خط پروب بر هر نقطه در مقیاس واقعی بافت می‌باشد.

در نهایت با قراردادن S_v و V_v در فرمول $H = \frac{V_v}{S_v}$ ، ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز محاسبه گردید (۱۷).

تخمین ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز: برای تخمین میانگین ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز از روش اندازه‌گیری هارمونیک استفاده شد. ابتدا، پروب مخصوص که دارای ۳ خط موازی است به‌صورت تصادفی، روی تصاویر گرفته شده از میدان‌های دید انتخابی انداخته شد. از نقطه برخورد خطوط پروب با سطح داخلی غشاء پایه، خطی عمود بر مماس سطح خارجی غشاء رسم کرده و با استفاده از نرم‌افزار موتیک طول این خط اندازه‌گیری گردید

شده به دوربین عکس‌برداری مدل Olympus (DP12) و نرم‌افزار Olysia انتخاب گردید. سپس با قرار دادن پروب نقطه‌ای به‌طور تصادفی و بدون سوگیری روی تصاویر مقاطع بافتی در هر میدان، کلیه نقاط برخوردی پروب با هر میدان دید ($\sum_{i=1}^n P_{(total)}$) و سپس نقاط برخورد کرده با لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی ($\sum_{i=1}^n P_{(structure)}$) به‌صورت مجزا شمارش شد. دانسیته حجمی هر یک از اجزا براساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$V_v(Structure) = \frac{\sum_{i=1}^n P_{(structure)}}{\sum_{i=1}^n P_{(total)}}$$

در نهایت به منظور محاسبه حجم نهایی لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی، دانسیته حجمی به‌دست آمده برای هر یک از ساختارهای فوق، در حجم کل بیضه ضرب گردید (۲۱).

تخمین طول لوله‌های منی‌ساز: جهت تخمین طول لوله‌های منی‌ساز، پنج میدان دید تصادفی از هر برش ۵ میکرونی، با استفاده از ob10 میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. سپس، پروب مخصوص شمارش به‌صورت تصادفی روی تصاویر حاصل از میدان‌های دید انتخابی، قرار گرفته و در هر میدان دید، به‌طور میانگین ۲۰۰-۱۰۰ لوله منی‌ساز که با خطوط ممنوعه تماس نداشته مورد شمارش قرار گرفت و به‌عنوان $\sum Q_i$ لحاظ گردید. در ادامه دانسیته طولی لوله‌های منی‌ساز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$L_v = 2 \times \frac{\sum_{i=1}^n Q_i}{a/f \times \sum_{i=1}^n P_i}$$

که در آن، $\sum_{i=1}^n Q_i$: مجموع لوله‌های منی‌ساز انتخاب شده و شمارش‌شده، a/f : سطح فریم در مقیاس واقعی بافت و $\sum_{i=1}^n P_i$: مجموع نقاط برخورد کرده با تصویر بیضه است. سپس طول لوله‌های منی‌ساز با ضرب دانسیته طولی در حجم نهایی بیضه به‌دست آمد (۱۷).

تخمین قطر لوله‌های منی‌ساز: جهت تخمین قطر لوله‌های منی‌ساز، با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰x، از هر برش ۵ میکرونی، ۵ میدان دید مورد بررسی قرار گرفت. سپس پروب صلیب مانند به‌گونه‌ای روی لوله‌های انتخاب شده انداخته شد که طول بلند صلیب در راستای

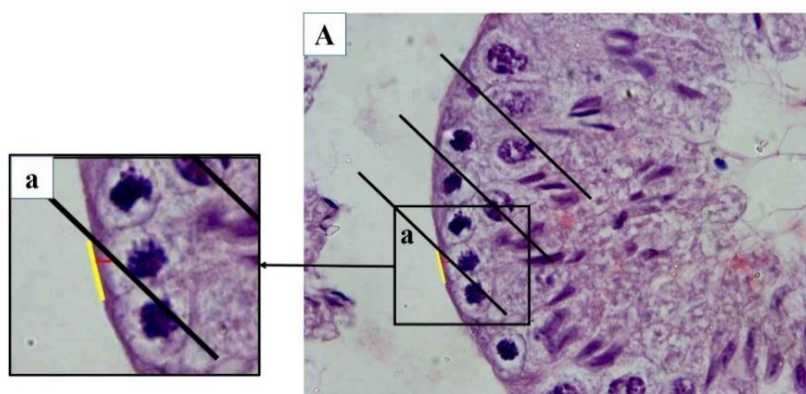
$$\text{ضخامت غشاء} = \frac{8\pi}{3} \times \frac{\text{number of measurements}}{\text{sum of the reciprocal intercept length}}$$

پایه

sum of the reciprocal intercept length

$$= \frac{1}{Oi1} + \frac{1}{Oi2} + \frac{1}{Oi3} + \frac{1}{Oi4} + \dots$$

که به عنوان O_i لحاظ گردید (شکل ۱). برای بیضه هر موش به طور میانگین ۱۰۰ الی ۲۰۰ برخورد اندازه گیری شد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر میانگین ضخامت غشاء پایه لوله های منی ساز محاسبه گردید (۲۲):



شکل ۱: روش اندازه گیری ضخامت غشاء پایه

ابتدا پروب اندازه گیری ضخامت غشاء پایه به طور کاملاً تصادفی، روی میدان دید انتخابی انداخته شد. سپس از نقطه برخورد خطوط پروب با سطح داخلی غشاء پایه، خطی عمود (با رنگ قرمز) بر مماس سطح خارجی غشاء (با رنگ زرد) رسم کرده و سپس اندازه آن گرفته شد (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی $\times 100$).

در حالت فوکوس در داخل فریم شمارش قرار گرفته و با خطوط ممنوعه برخورد نکرده بود. سپس به منظور تخمین دانسیته عددی انواع سلول ها، از فرمول زیر استفاده گردید:

$$Nv = \frac{\sum_{i=1}^n Qi}{h \times \sum_{i=1}^n Pi \times a/f}$$

که در آن، $\sum_{i=1}^n Qi$: مجموع تعداد سلول های شمارش شده، h : ارتفاعی از برش که شمارش سلول ها در آن انجام شد، $\sum_{i=1}^n Pi$: مجموع نقاط برخورد کرده با میدان های دید انتخابی و a/f : سطح فریم در مقیاس واقعی بافت است.

در نهایت با ضرب دانسیته عددی در حجم کل بیضه، تعداد کل هر یک سلول های مورد نظر محاسبه شد (۲۳).

ارزیابی شاخص های اسپرماتوژنز: به طور کلی، ۱۰۰ مقطع لوله منی ساز گرد، از برش های ۵ میکرونی بافت بیضه در هر موش، به طور تصادفی در زیر میکروسکوپ نوری با ob40 انتخاب گردید. سپس شاخص های اسپرمزایی شامل شاخص ضریب تمایز لوله ای، شاخص اسپرمزایی، شاخص میوزی و

تخمین تعداد سلول های اسپرماتوژنیک (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و کشیده)، سرتولی و لیدیگ: به منظور تخمین تعداد سلول های اسپرماتوژنیک، سرتولی و لیدیگ، از روش اپتیکال دایسکتور، فریم مخصوص شمارش و دستگاه میکروکیتور مدل (ND 221 B, Heidenhain, Germany) استفاده گردید. برای این منظور، با استفاده از ob100 میکروسکوپ نوری، به طور تصادفی، تعدادی از میدان های دید برش های با ضخامت ۲۰ میکرونی مورد بررسی قرار گرفتند. در هر میدان دید، از دو ناحیه حفاظت شده به ضخامت ۵ میکرون از بالا و پایین برش، به دلیل وجود آرتیفک های احتمالی صرف نظر گردید. پس از آن، به میزان ۱۰ میکرون در جهت محور z ، در عمق بافت پیش رفته و در حین حرکت در عمق برش، تمام انواع سلول هایی که در فریم شمارش انتخاب شدند، مورد شمارش قرار گرفتند. ملاک انتخاب، سلول هایی بودند که هسته آن ها

شاخص سلول سرتولی محاسبه گردید. جهت تعیین شاخص ضریب تمایز لوله‌ای، درصد لوله‌های اسپرم‌ساز حاوی حداقل سه رده سلول زایای تمایز یافته محاسبه شد. برای ارزیابی شاخص اسپرم‌زایی، لوله‌های حاوی اسپرماتوزوآ در لومن، به عنوان اسپرمیوژنز مثبت و لوله‌های فاقد اسپرماتوزوآ در لومن، به عنوان اسپرمیوژنز منفی در نظر گرفته شدند و در نهایت نتیجه به صورت درصد لوله‌های دارای اسپرمیوژنز مثبت، گزارش شد. جهت سنجش شاخص میوزی، نسبت

مجموع اسپرماتیدهای گرد به مجموع اسپرماتوسیت‌های اولیه در ۱۰۰ لوله منی‌ساز، محاسبه شد. به منظور تخمین شاخص سلول سرتولی، نسبت تعداد کل اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌ها به مجموع تعداد سلول‌های سرتولی در ۱۰۰ لوله منی‌ساز، محاسبه گردید (۲۱). همچنین اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم‌ساز با استفاده از سیستم امتیازدهی جانسن، مطابق با جدول ۱ ارزیابی شد (۱۷):

جدول ۱: سیستم امتیازدهی جانسن.

امتیازدهی	سطح اسپرماتوژنز
۱۰	اسپرماتوژنز کامل
۹	اسپرماتوژنز ناقص و وجود تعداد زیادی اسپرماتید ثانویه، وجود اپیتلیوم زایشی نامنظم
۸	کمتر از ۵ درصد اسپرماتوزوآ در هر لوله و تعداد کمی اسپرماتید ثانویه
۷	فاقد اسپرماتید ثانویه، تعداد زیادی اسپرماتید اولیه
۶	فاقد اسپرماتید ثانویه، تعداد کمی اسپرماتید اولیه؛ توقف اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتید
۵	تعداد زیادی اسپرماتوسیت، فاقد اسپرماتید
۴	تعداد کمی اسپرماتوسیت؛ توقف اسپرماتوژنز در مرحله اولیه اسپرماتوسیت، فاقد اسپرماتید
۳	فقط اسپرماتوگونی وجود دارد
۲	فاقد سلول‌های زایا، فقط سلول‌های سرتولی وجود دارد
۱	هیچ سلولی در اپیتلیوم زایشی وجود ندارد، اسکروز لوله‌ای

اندازه‌گیری سطح MDA و TAC بیضه: میزان MDA بافت

بیضه با کیت Nalondi™-Lipid Peroxidation Assay Kit (MDA, Cat. No. NS-15022 (شرکت نوند سلامت، ایران) با روش تیوباربتوریک‌اسید اندازه‌گیری شد. طبق پروتکل ارائه شده توسط کیت، محلول کاری تهیه شد و ۸۰۰ میکرولیتر از آن با ۲۰۰ میکرولیتر نمونه مخلوط گردید. مخلوط حاصل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از رسیدن به دمای اتاق، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند (۱۵ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه) و جذب نوری مایع رویی توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. میزان TAC بافت بیضه با استفاده از کیت Naxifer™-Total Antioxidant Capacity Assay Kit-TAC, Cat. No. NS-15012 (شرکت نوند سلامت، ایران) و براساس روش (Ferric Reducing Antioxidant Power)

FRAP سنجیده شد. برای این منظور، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار آماده شده به ۵ میکرولیتر از نمونه اضافه شد و جذب نوری نمونه‌ها پس از ۵ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانش شد. در نهایت، با استفاده از نرم‌افزار اکسل، نمودار منحنی استاندارد براساس جذب‌های به‌دست‌آمده رسم گردید و براساس معادله خط حاصل از نمودار، میزان MDA و TAC بافت محاسبه شد (۲۴،۲۵).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS version 16 و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه: بیضه و لوله‌های منی-ساز در گروه کنترل، بافت‌شناسی طبیعی را نشان دادند

(شکل A۲). این در حالی بود که مطالعات بافت‌شناسی در گروه سیکلوفسفامید، ظاهر غیرطبیعی در بافت بیضه از جمله آتروفی لوله‌های منی‌ساز، گسترش فضای بین‌لوله‌ای، کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی و همچنین واکوئل‌شدن و دژنراسیون اپیتلیوم ژرمینال را آشکار کرد (شکل B۲). در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم، لوله‌های منی‌ساز و اپیتلیوم زایشی، ساختاری منظم و طبیعی‌تر پیدا کردند و نمای بافت نیز نسبت به گروه سیکلوفسفامید بهبود یافته بود (شکل C۲)؛ در گروه سلنیوم نیز، بیضه و لوله‌های منی‌ساز، نمایی مشابه با گروه کنترل داشتند (شکل D۲).

حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز و حجم بافت بینابینی:
میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز ($p < 0/001$) و حجم بافت بینابینی ($p < 0/01$) در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری را نشان داد. افزایش معنی‌داری در میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز و حجم بافت بینابینی در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم نسبت به گروه سیکلوفسفامید دیده شد ($p < 0/05$) و این افزایش به سطح گروه کنترل رسید ($p > 0/05$). در گروه سلنیوم نسبت به گروه کنترل، در هیچ‌یک از پارامترهای ذکرشده، تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۲).

میانگین طول، قطر، ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز: کاهش معنی‌داری در میانگین طول، قطر، ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$). در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم، افزایش معنی‌داری در میانگین طول ($p < 0/01$)، قطر، ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز ($p < 0/001$) در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید دیده شد. به‌طوری‌که قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز به سطح گروه کنترل رسید ($p > 0/05$). هیچ‌یک از پارامترهای ذکرشده در گروه سلنیوم نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0/05$) (جدول ۳).

CC BY-NC 4.0

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید کشیده، سرتولی و لیدیگ: در گروه سیکلوفسفامید، کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید کشیده، سرتولی و لیدیگ در مقایسه با گروه کنترل، دیده شد ($p < 0/001$). در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم، در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ($p < 0/05$)، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید کشیده، سرتولی و لیدیگ ($p < 0/01$) نسبت به گروه سیکلوفسفامید، افزایش معنی‌داری مشاهده شد. این افزایش در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید گرد و اسپرماتید کشیده به حد گروه کنترل رسید ($p > 0/05$). در گروه سلنیوم نسبت به گروه کنترل در هیچ‌یک از پارامترهای یاد شده، تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۴).

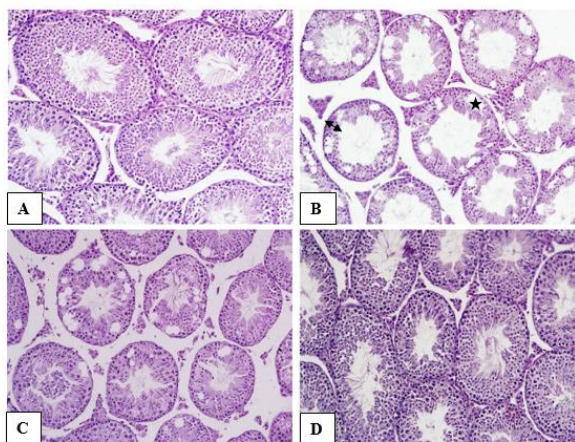
بررسی شاخص‌های اسپرماتوژنز و امتیاز جانسن: شاخص ضریب تمایز لوله‌ای، میزان اسپرمیوژنز، ضریب سلولی سرتولی و ضریب میوزی، در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$). در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم، افزایش معنی‌داری در تمامی شاخص‌های فوق در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید مشاهده شد ($p < 0/001$). این افزایش در شاخص ضریب تمایز لوله‌ای و میزان اسپرمیوژنز به سطح گروه کنترل رسید ($p > 0/05$). میانگین امتیاز جانسن، کاهش معنی‌داری در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0/001$). در حالی‌که میانگین این پارامتر در گروه سیکلوفسفامید + سلنیوم نسبت به گروه سیکلوفسفامید، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$) که این افزایش در حد گروه کنترل بود ($p > 0/05$). در گروه سلنیوم نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری در هیچ‌یک از شاخص‌ها و امتیاز جانسن مشاهده نشد ($p > 0/05$) (جدول ۵).

بررسی میزان MDA و TAC در بافت بیضه: افزایش معنی‌داری در میانگین غلظت MDA و کاهش معنی‌داری در میانگین TAC بافت بیضه در گروه سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$). این در حالی‌است که در

نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$). میانگین این دو پارامتر در گروه سیکلوفسفامید + سلیوم، در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$) و به سطح گروه کنترل رسید ($p > 0.05$). تفاوت معنی‌داری در میانگین وزن ثانویه بدن موش‌ها و وزن بیضه در گروه سلیوم در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۷).

گروه سیکلوفسفامید + سلیوم، میانگین غلظت MDA کاهش معنی‌دار ($p < 0.001$) و میانگین غلظت TAC افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) نسبت به گروه سیکلوفسفامید نشان داد. میانگین سطح MDA و TAC بافت در گروه سلیوم نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$) (جدول ۶).

وزن موش و وزن بیضه: میانگین وزن اولیه بدن موش‌ها، در بین ۴ گروه آزمایش، تفاوت معنی‌داری نداشت. اما میانگین وزن ثانویه بدن موش‌ها و میانگین وزن بیضه، در گروه سیکلوفسفامید



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف. رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی $\times 20$. (A) گروه کنترل (آرایش منظم و طبیعی در لوله‌های منی‌ساز و اپیتلیوم زایشی به همراه وجود اسپرماتوزوآ در لومن). (B) گروه سیکلوفسفامید (واکوله شدن اپیتلیوم زایشی (علامت ستاره در شکل)، کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی (پیکان در تصویر) همراه با آرایش نامنظم و غیر طبیعی لوله‌های منی‌ساز و فقدان یا کاهش اسپرماتوزوآ در لومن). گروه سیکلوفسفامید + سلیوم (C) آرایش بهبود یافته بافت نسبت به گروه سیکلوفسفامید همراه با ساختار منظم و طبیعی‌تر لوله‌های منی‌ساز و اپیتلیوم زایشی در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید. گروه سلیوم (D) نمایی مشابه با گروه کنترل همراه با آرایش منظم لوله‌های منی‌ساز و اپیتلیوم زایشی.

جدول ۲: مقایسه میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز و حجم بافت بینابینی در گروه‌های مختلف.

گروه‌ها	حجم بیضه mm^3	حجم لوله‌های منی‌ساز mm^3	حجم بافت بینابینی mm^3
کنترل	$71/01 \pm 18/54^a$	$53/48 \pm 13/63^a$	$17/52 \pm 5/80^a$
سیکلوفسفامید	$34/82 \pm 8/69^b$	$25/30 \pm 6/55^b$	$9/51 \pm 2/44^b$
سیکلوفسفامید + سلیوم	$60/91 \pm 12/19^a$	$45/25 \pm 9/44^a$	$15/65 \pm 3/86^a$
سلیوم	$74/48 \pm 16/71^a$	$58/02 \pm 13/04^a$	$16/44 \pm 4/21^a$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$). در هرستون، میانگین‌های با حروف مختلف (a و b) بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند.

جدول ۳: مقایسه میانگین طول لوله‌های منی‌ساز (m)، قطر لوله‌های منی‌ساز (μm)، ضخامت غشاء پایه (μm) و ارتفاع اپیتلیوم زایشی (μm) لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های مختلف.

گروه‌ها	طول لوله‌های منی‌ساز	قطر لوله‌های منی‌ساز	ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز	ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز
کنترل	$1/72 \pm 0/50^a$	$229/86 \pm 4/08^a$	$5/65 \pm 0/38^a$	$87/82 \pm 3/34^a$
سیکلو فسفامید	$0/58 \pm 0/16^b$	$188/08 \pm 8/61^b$	$4/43 \pm 0/10^b$	$53/40 \pm 3/28^b$
سیکلو فسفامید + سلنیوم	$1/19 \pm 0/26^c$	$225/43 \pm 6/66^a$	$5/34 \pm 0/20^a$	$82/21 \pm 4/54^c$
سلنیوم	$1/85 \pm 0/35^a$	$233/22 \pm 3/68^a$	$5/63 \pm 0/23^a$	$89/71 \pm 2/81^a$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0/05$). در هرستون، میانگین‌های با حروف مختلف a و b و c بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند.

جدول ۴: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید کشیده، سرتولی و لیدیک در گروه‌های مختلف.

گروه‌ها	تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتید کشیده $\times 10^6$	تعداد سلول‌های سرتولی $\times 10^6$	تعداد سلول‌های لیدیک $\times 10^6$
کنترل	$6/61 \pm 2/20^a$	$25/62 \pm 6/26^a$	$37/46 \pm 12/34^a$	$36/54 \pm 10/88^a$	$3/94 \pm 1/00^a$	$3/72 \pm 0/84^a$
سیکلو فسفامید	$2/75 \pm 0/71^b$	$8/24 \pm 2/31^b$	$13/16 \pm 3/89^b$	$12/43 \pm 3/24^b$	$1/27 \pm 0/37^b$	$1/07 \pm 0/26^b$
سیکلو فسفامید + سلنیوم	$5/25 \pm 1/16^a$	$17/86 \pm 3/27^c$	$28/28 \pm 6/13^a$	$26/82 \pm 4/82^a$	$2/88 \pm 0/54^c$	$2/64 \pm 0/59^c$
سلنیوم	$7/13 \pm 1/50^a$	$27/89 \pm 5/25^a$	$38/51 \pm 8/09^a$	$37/15 \pm 8/79^a$	$4/44 \pm 0/98^a$	$3/96 \pm 0/91^a$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0/05$). در هرستون، میانگین‌های با حروف مختلف a و b و c بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند.

جدول ۵: مقایسه میانگین ضریب تمایز لوله‌ای، شاخص میزان اسپرمیوژن، ضریب سلول سرتولی، ضریب میوزی و امتیاز جانسن در گروه‌های مختلف.

گروه‌ها	ضریب تمایز لوله‌ای	شاخص میزان اسپرمیوژن	ضریب سلولی سرتولی	ضریب میوزی	امتیاز جانسن
کنترل	$87/25 \pm 2/81^a$	$88/00 \pm 3/46^a$	$12/17 \pm 0/48^a$	$2/352 \pm 0/10^a$	$9/11 \pm 0/26^a$
سیکلو فسفامید	$51/62 \pm 6/47^b$	$47/50 \pm 3/74^b$	$8/89 \pm 0/51^b$	$1/05 \pm 0/04^b$	$5/27 \pm 0/27^b$
سیکلو فسفامید + سلنیوم	$82/12 \pm 3/31^a$	$83/75 \pm 2/65^a$	$10/37 \pm 0/43^c$	$2/00 \pm 0/21^c$	$8/82 \pm 0/17^a$
سلنیوم	$87/62 \pm 3/24^a$	$88/25 \pm 3/28^a$	$12/50 \pm 0/61^a$	$2/35 \pm 0/03^a$	$9/14 \pm 0/24^a$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0/05$). در هرستون، میانگین‌های با حروف مختلف a و b و c بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند.

جدول ۶: مقایسه میانگین میزان MDA و TAC در بافت بیضه در گروه‌های مختلف.

گروه‌ها	MDA بیضه (nmol/g)	TAC بیضه (mmol Fe/L)
کنترل	$0/07 \pm 0/32^a$	$0/84 \pm 0/11^a$
سیکلو فسفامید	$0/69 \pm 0/59^b$	$0/39 \pm 0/13^b$
سیکلو فسفامید + سلنیوم	$0/23 \pm 0/87^c$	$0/62 \pm 0/11^c$
سلنیوم	$0/06 \pm 0/17^a$	$0/86 \pm 0/12^a$

مقادیر به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0/05$). در هرستون، میانگین‌های با حروف مختلف a و b و c بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند.

جدول ۷: مقایسه میانگین وزن بدن و وزن بیضه موش‌ها در گروه‌های مختلف.

گروه‌ها	وزن اولیه بدن (g)	وزن ثانویه بدن (g)	وزن بیضه (g)
کنترل	$36/87 \pm 1/30^a$	$37/57 \pm 1/21^a$	$0/13 \pm 0/01^a$
سیکلوفسفامید	$36/65 \pm 1/05^a$	$28/55 \pm 3/51^b$	$0/08 \pm 0/00^b$
سیکلوفسفامید + سلنیوم	$36/67 \pm 1/59^a$	$35/22 \pm 1/30^a$	$0/12 \pm 0/00^a$
سلنیوم	$36/73 \pm 1/34^a$	$37/98 \pm 1/36^a$	$0/13 \pm 0/00^a$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, $p < 0/05$). در هرستون، میانگین‌های با حروف مختلف (a و b) بیانگر تفاوت‌های معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند.

بحث

حیوانات تحت درمان شده است (۱۷،۲۹). از نظر مکانیسم‌های مولکولی، سیکلوفسفامید با کاهش بیان پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانتی Nrf2 و Heme Oxygenase-1 (HO-1)، افزایش بیان kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (مهارکننده Nrf2) و نیز افزایش نسبت Bax/Bcl-2 باعث ایجاد اختلال گسترده در ساختار و عملکرد بافت بیضه می‌شود (۷). کاهش سطح Nrf2 که تنظیم‌کننده ژن‌های وابسته به عناصر پاسخ آنتی‌اکسیدانتی (Antioxidant Response Element: ARE) است، حساسیت سلول‌های بیضه را نسبت به استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد (۳۰). علاوه بر این، سیکلوفسفامید از طریق ایجاد پیوند متقابل در رشته‌های DNA موجب آسیب ژنومی در سلول‌های در حال تقسیم سریع، از جمله سلول‌های زایا، می‌شود. این آسیب DNA با افزایش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک مانند Bax همراه بوده و در نتیجه نرخ مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها افزایش می‌یابد (۳۰،۴). در همین راستا، مطالعه Nayak و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان داد که سیکلوفسفامید با کاهش بیان Oct4 (مارکر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تمایزنیافته) و Ddx4 (مارکر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تمایز یافته)، موجب کاهش جمعیت سلول‌های اسپرماتوژنیک می‌شود (۳۱). همچنین این دارو از طریق مهار فعالیت آنزیم‌های کلیدی استروئیدوژن شامل سیتوکروم p450scc، آروماتاز و ۱۷ هیدروکسی استروئید دهیدروژناز، سبب کاهش سنتز تستوسترون می‌شود که این امر یکی از عوامل مهم ایجاد اختلال در اسپرماتوژن به شمار می‌رود (۳۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز همزمان سلنیوم با سیکلوفسفامید توانست تا حد

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز و حجم بافت بینابینی می‌شود. همچنین طول، قطر، ضخامت غشای پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت. در کنار این تغییرات ساختاری، تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک، سرتولی و لیدیک و نیز شاخص‌های اسپرماتوژن در گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. یافته‌های هیستوپاتولوژیک گزارش‌شده در مطالعات پیشین نیز این نتایج را تأیید می‌کنند. در مطالعه انجام‌شده توسط Moustafa و همکاران (۲۰۲۰)، آتروفی همراه با تغییرات دژنراتیو در لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی در حیوانات تیمار شده با سیکلوفسفامید مشاهده شد (۲۶). همچنین مطالعه Karimi و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان داد که سیکلوفسفامید باعث کاهش معنادار قطر و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز می‌شود (۲۷). این تغییرات به‌طور عمده ناشی از ریزش سلول‌های اپیتلیال و آسیب به سلول‌های سرتولی است که نقش حیاتی در تداوم روند اسپرم‌زایی دارند (۲۸). نتایج گزارش‌شده توسط Delgarm و همکاران در سال ۲۰۲۲ و Kordedeh و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیز همسو با یافته‌های حاضر نشان داد که سیکلوفسفامید موجب کاهش قابل‌توجه سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لیدیک می‌شود. این تغییرات همراه با آتروفی شدید لوله‌های منی‌ساز، متلاشی و واکوئل شدن اپیتلیوم ژرمینال، کاهش ارتفاع اپیتلیوم و کاهش تعداد رده‌های سلول‌های زایا بوده و در نهایت منجر به کاهش اسپرم‌زایی در

زیادی اثرات مخرب سیکلوفسفامید بر پارامترهای مورد بررسی را جبران کند؛ این یافته با نتایج مطالعات پیشین همسو است. Bagheri و همکاران در سال ۲۰۲۰ در بررسی اثر حفاظتی سلنیوم در برابر آسیب‌های ناشی از تشعشعات طی رادیوتراپی یا رادیولوژی نشان دادند که سلنیوم می‌تواند از توقف فرآیند اسپرم‌زایی و آتروفی لوله‌های منی‌ساز جلوگیری کرده و به حفظ سلامت کلی بافت بیضه در موش‌ها کمک کند (۳۲). همچنین گزارش شده است که سلنیوم با کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو و مهار فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز، موجب افزایش جمعیت سلول‌های زایا، حفظ ساختار طبیعی بافت بیضه و افزایش قطر و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز شده و در نتیجه آسیب سلولی ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش می‌دهد (۳۳). سلنیوم به‌عنوان یک عنصر معدنی ضروری با خواص آنتی‌اکسیدانتی قوی، نقش مهمی در محافظت از بافت بیضه در برابر استرس اکسیداتیو و حفظ یکپارچگی ساختاری و عملکردی لوله‌های اسپرم‌ساز ایفا می‌کند. این عنصر جزء اصلی سلنوپروتئین‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیداز است که نقش اساسی در خنثی‌سازی ROS دارند. افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی وابسته به سلنیوم می‌تواند به‌طور مؤثری استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۳۴، ۳۵). در نتیجه، سلنیوم با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب مستقیم به DNA و غشای سلولی سلول‌های اسپرماتوژنیک و همچنین سلول‌های لیدینگ جلوگیری می‌کند و بدین ترتیب از آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز و اختلال در فرآیند اسپرم‌زایی پیشگیری می‌نماید (۳۳). علاوه بر این، گزارش شده است که سلنیوم می‌تواند بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با سنتز تستوسترون از جمله HSD17B1 (Hydroxysteroid 17 Beta Dehydrogenase 1) (CYP17A1 (Cytochrome P450 17A1, StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein را افزایش دهد و از این طریق تولید تستوسترون در سلول‌های لیدینگ بیضه را بهبود بخشد؛ فرآیندی که در نهایت اثرات مثبتی بر اسپرماتوژنز دارد (۳۶). در بخش دیگری از نتایج این مطالعه، کاهش معنی‌دار TAC بافت بیضه و در مقابل افزایش

معنی‌دار سطح MDA در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که نشان‌دهنده القای استرس اکسیداتیو در بافت بیضه است. مطالعات نشان داده‌اند که سیکلوفسفامید از طریق افزایش بیان پروتئین Keap1 موجب مهار فاکتور رونویسی Nrf2 شده و در نتیجه بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی کلیدی مانند HO-1 و GPX4 (Glutathione Peroxidase 4) کاهش می‌یابد (۷، ۸). مهار مسیر Nrf2 با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش سطح MDA همراه است که در نهایت منجر به تشدید شرایط استرس اکسیداتیو در بافت بیضه می‌شود (۷). در مقابل، در گروه دریافت‌کننده سلنیوم همراه با سیکلوفسفامید کاهش معنی‌داری در سطح MDA و افزایش معنی‌داری در سطح TAC بافت بیضه مشاهده شد. سلنیوم که در ساختار سلنوپروتئین‌ها به شکل سلنوسیستئین حضور دارد و بخشی از ایزوفرم‌های مختلف آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز محسوب می‌شود، به‌عنوان یک مرکز ردوکس عمل کرده و با کمک گلوتاتیون پراکسیدازها از لیپیدهای غشایی در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند. این عملکرد منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه کاهش تولید MDA می‌شود (۱۱، ۱۲). یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تیمار با سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن و وزن بیضه در موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد. گزارش شده است که سیکلوفسفامید با کاهش سطح چربی‌ها و مهار سنتز پروتئین می‌تواند منجر به کاهش وزن بدن گردد (۱۷). علاوه بر این، سیکلوفسفامید از طریق القای استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تحریک آپوپتوز در سلول‌های بیضه، موجب کاهش تعداد سلول‌های اسپرم‌ساز و اختلال در فرآیند اسپرم‌زایی می‌شود؛ پدیده‌ای که به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در کاهش وزن بیضه در اثر تیمار با این دارو مطرح شده است (۷). همچنین، این دارو با تأثیر منفی بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد سبب کاهش قابل‌توجه سطح FSH، LH و تستوسترون می‌شود و این عدم تعادل هورمونی می‌تواند به کاهش وزن بیضه منجر گردد (۴، ۳۷). از

کند و ساختار بیضه را تا حد زیادی به شرایط طبیعی نزدیک کند. بنابراین، سلیوم می‌تواند به‌عنوان یک عامل محافظتی مؤثر در کاهش آسیب‌های بیضه‌ای ناشی از سیکلوفسفامید به‌عنوان یک راهکاری درمانی برای کاهش عوارض تولیدمثلی داروهای شیمی‌درمانی مورد توجه قرار گیرد.

سیاس‌گذاری

این مقاله حاصل از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد می‌باشد. از حمایت‌های مالی معاون پژوهشی و فناوری و همچنین آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک صمیمانه سپاس‌گذاری می‌گردد.

حامی مالی

معاون پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه اراک مورد تایید قرار گرفته است (کد اخلاق:

IR.ARAKU.REC.1402.066)

مشارکت نویسندگان

ملک سلیمانی مهربانی: مفهوم‌سازی، مدیریت پروژه، نظارت، تحلیل، نگارش - بررسی و ویرایش. زهرا صفری: روش‌شناسی، گردآوری داده‌ها. سپیده احمدی: روش‌شناسی، گردآوری داده‌ها، تحلیل، نگارش - پیش‌نویس اصلی. همه نویسندگان نسخه نهایی را خوانده و تأیید کرده‌اند.

سوی دیگر، تیمار همزمان با سلیوم در گروه سیکلوفسفامید + سلیوم موجب افزایش معنی‌دار وزن بدن و وزن بیضه نسبت به گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید به تنهایی شد. سلیوم به‌عنوان یک عنصر آنتی‌اکسیدانسی مهم با کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سنتز تستوسترون می‌تواند موجب بهبود فرآیند اسپرماتوژنز و در نتیجه افزایش وزن بیضه شود (۳۶). علاوه بر این، سلیوم در متابولیسم و تولید هورمون‌های تیروئیدی نقش اساسی دارد که این هورمون‌ها تنظیم‌کننده متابولیسم بدن هستند (۱۳)؛ بنابراین، حضور سلیوم می‌تواند به حفظ وزن بدن کمک کرده و اثرات نامطلوب سیکلوفسفامید بر کاهش وزن بدن را تا حدی تعدیل کند. به‌دلیل محدودیت‌های مالی، امکان ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با استرس اکسیداتیو فراهم نشد که از محدودیت‌های مطالعه حاضر بوده است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده بیان ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در مسیرهای آنتی‌اکسیدانسی و استرس اکسیداتیو برای تکمیل بخش مولکولی مطالعه بررسی شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های استریولوژیک و بیوشیمیایی این پژوهش نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های نر با ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی موجب بروز آسیب‌های ساختاری قابل‌توجهی در بافت بیضه می‌شود. در مقابل، تجویز همزمان سلیوم با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانسی وابسته به سلنوپروتئین‌ها و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی توانست بخش قابل‌توجهی از این تغییرات نامطلوب را اصلاح

References:

1. Tripathi DN, Jena GB. *Intervention of Astaxanthin Against Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and DNA Damage: A Study in Mice*. Chem Biol Interact 2009; 180(3): 398-406.
2. Ghobadi E, Moloudizargari M, Asghari MH, Abdollahi M. *The Mechanisms of Cyclophosphamide-Induced Testicular Toxicity and the Protective Agents*. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017; 13(5): 525-36.

3. Liu X, Li Q, Wang Z, Liu F. *Identification of Abnormal Protein Expressions Associated with Mouse Spermatogenesis Induced by Cyclophosphamide*. J Cell Mol Med 2021; 25(3): 1624-32.
4. Olowe TG, Oyovwi MO, Nwangwa KE, Ohwin EP, Oghenetega OB. *Cytotoxic Properties of Cyclophosphamide: A Focus on Its Mechanistic Impacts on Male Gonadal Functions*. J Explor Res Pharmacol 2024; 9(2): 106-15.
5. Al-Salih HA, Al-Sharafi NM, Al-Qabi SS, Al-Darwesh AA. *The Pathological Features of Cyclophosphamide Induced Multi-Organs Toxicity in Male Wister Rats*. Syst Rev Pharm 2020; 11(6): 45-9.
6. Oyagbemi AA, Omobowale TO, Saba AB, Adedara IA, Olowu ER, Akinrinde AS, et al. *Gallic Acid Protects Against Cyclophosphamide-Induced Toxicity in Testis and Epididymis of Rats*. Andrologia 2016; 48(4): 393-401.
7. Zhang H, Li N, Zhang Y, Xu Y, Lu F, Lin D, et al. *Ganoderma Lucidum Polysaccharide Peptide Alleviates Cyclophosphamide-Induced Male Reproductive Injury by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis*. Biomedicines 2024; 12(8): 1632.
8. Qin Y, Zhao G, Wang Z, Liu M, Deng H, Guo L, et al. *Polygonatum Sibiricum Polysaccharide Attenuates Cyclophosphamide-Induced Testicular Damages and Sperm Defects in Male Mice Via Nrf2 Mediating Antioxidant Protective Mechanisms*. Int J Biol Macromol 2025; 307(Pt3): 141968.
9. Selvakumar E, Prahalathan C, Mythili Y, Varalakshmi P. *Beneficial Effects Of DL-A-Lipoic Acid On Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress In Mitochondrial Fractions Of Rat Testis*. Chem Biol Interact 2005; 152(1): 59-66.
10. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. *The Emerging Role of Nrf2 in Mitochondrial Function*. Free Radic Biol Med 2015; 88(Pt B): 179-88.
11. Ibrahim HA, Shalaby SI, Hassan AA, Hebishy RM, Ghani EM. *Effects of Bleomycin, Selenium, and Vitamin E on Male Fertility: A Review*. J Adv Vet Res 2022; 12(6): 815-9.
12. Kaur S, Kaur A, Jaswal N, Anika A, Sadwal SH, Bharati S. *Selenium Attenuates Venlafaxine Hydrochloride-Induced Testicular Damage in Mice Via Modulating Oxidative Stress and Apoptosis*. Andrologia 2021; 53(6): e14050.
13. Mohammadpour AA, Mohammadeini A. *Protective Effect of Selenium in Prednisolone Testicular Toxicity*. Comp Clin Pathol 2021; 30(5): 847-56.
14. Apaydin FG, Kalender S, Bas H, Demir F, Kalender Y. *Lead Nitrate Induced Testicular Toxicity in Diabetic and Non-Diabetic Rats: Protective Role of Sodium Selenite*. Braz Arch Biol Technol 2014; 58: 68-74.
15. Ibrahim MA, Wani FA, Khalifa AM, Kelleni MT, Anwar MM, Thirunavukkarasu A, et al. *Protective Effects of Selenium on Malathion-Induced Testicular Toxicity in Mice*. Indian J Anim Res 2020; 54(3): 335-41.
16. Mahmoodi M, Bakhshi S, Sadeghzadeh F. *Neutralizing the Adverse Effects of Cyclophosphamide on the Mouse Testis and*

- Sperm Parameters Through Pentoxifylline: A Molecular and Stereological Study*. *Andrologia* 2022; 54(10): e14543.
17. Kordedeh ZS, Ghorbani S, Ahmadi S, Mehranjani MS. *Silymarin Mitigates Toxic Effects of Cyclophosphamide on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Mice*. *Reprod Biol* 2024; 24(4): 100946.
 18. Salimnejad R, Rad JS, Nejad DM. *Protective Effect of Ghrelin on Oxidative Stress and Tissue Damages of Mice Testes Followed by Chemotherapy with Cyclophosphamide*. *Crescent J Med Biol Sci* 2018; 5(2): 138-43.
 19. Gunes S, Sahinturk V, Karasati P, Sahin IK, Ayhanci A. *Cardioprotective Effect of Selenium Against Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity in Rats*. *Biol Trace Elem Res* 2016; 1(177): 107-14.
 20. Gunes S, Sahinturk V, Uslu S, Ayhanci A, Kacar S, Uyar R. *Protective Effects of Selenium on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Kidney Injury*. *Biol Trace Elem Res* 2018; 185: 116-23.
 21. Sadeghzadeh F, Mehranjani MS, Mahmoodi M. *Vitamin C Ameliorates the Adverse Effects of Dexamethasone on Sperm Motility, Testosterone Level, And Spermatogenesis Indexes in Mice*. *Hum Exp Toxicol* 2019; 38(4): 409-18.
 22. Moghanlo H, Shariatzadeh SMA. *Beneficial Effects of Spirulina Platensis on Mice Testis Damaged by Silver Nanoparticles*. *Andrologia* 2022; 54: e14606.
 23. Soleimani Mehranjani M, Azizi M, Sadeghzadeh F. *The Effect of Melatonin on Testis Histological Changes and Spermatogenesis Indexes in Mice Following Treatment with Dexamethasone*. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(3): 1140-9.
 24. Ahmadi S, Soleimani Mehranjani M. *Taurine Improves Follicular Survival and Function of Mice Ovarian Grafts Through Increasing CD31 and GDF9 Expression and Reducing Oxidative Stress and Apoptosis*. *Eur J Pharmacol* 2021; 903: 174134.
 25. Roostaei Z, Soleimani Mehranjani M, Cheraghi E. *Fluoxetine Mitigates Human Sperm Quality by Disrupting the Antioxidant Defense System and Altering the Expression of Apoptosis-Related Genes: An in Vitro Study*. *Reprod Sci* 2025; 32(2): 326-42.
 26. Moustafa N, Abdul-Hamid M, El-Nesr KA, Abukhadra AM. *Protective Effect of Alpha Lipoic Acid and Royal Jelly Against the Side Effects of Cyclophosphamide in Testis of Male Albino Rats*. *Egypt J Histol* 2020; 43(2): 539-53.
 27. Karimi A, Behmard V, Toghiani S, Moravej FS. *The Study of The Protective Effect of Vitamin E and Retinoic Acid on Testicular Tissue in Mice Treated with Cyclophosphamide*. *Arch Med Lab Sci* 2020; 6: 1-8.
 28. Hosseini A, Zare S, Borzouei Z, Pakdel FG. *Cyclophosphamide-Induced Testicular Toxicity Ameliorates by American Ginseng Treatment: An Experimental Study*. *IJRM* 2018; 16(11): 711-18.
 29. Delgarm N, Morovati-Sharifabad M, Salehi E, Afkhami-Ardakani M, Heydarnejad MS. *Exploring the Main Effects of Phoenix Dactylifera on Destructive Changes Caused by Cyclophosphamide in Male Reproductive System in Mice*. *Vet Res Forum* 2022; 13(2): 249-55.

30. Raee P, Aghamir S, Ghaffari Novin M, Afshar A, Aghajanpour F, Abdi F, et al. *Therapeutic Effects of Curcumin Nanoemulsion on Cyclophosphamide-Induced Testicular Toxicity in Adult Male Mice*. Clin Exp Reprod Med 2025; 52(2): 157-66.
31. Nayak G, Rao A, Mullick P, Mutalik S, Kalthur SG, Adiga SK, et al. *Ethanollic Extract of Moringa Oleifera Leaves Alleviate Cyclophosphamideinduced Testicular Toxicity by Improving Endocrine Function and Modulating Cell Specific Gene Expression in Mouse Testis*. J Ethnopharmacol 2020; 259: 112922.
32. Bagheri H, Salajegheh A, Javadi A, Amini P, Shekarchi B, Shabeeb D, et al. *Radioprotective Effects of Zinc and Selenium on Mice Spermatogenesis*. J Biomed Phys Eng 2020; 10(6): 707-12.
33. Kaur S, Maan KS, Sadwal S, Aniq A. *Studies on the Ameliorative Potential of Dietary Supplemented Selenium on Doxorubicin-Induced Testicular Damage in Mice*. Andrologia 2020; 52(11): e13855.
34. Khalid A, Khudhair N, He H, Peng Z, Yaguang T, Guixue Z. *Effects of Dietary Selenium Supplementation on Seminiferous Tubules and Selw, Gpx4, LHCGR, And ACE Expression in Chicken Testis*. Biol Trace Elem Res 2016; 173: 202-9.
35. Yildirim S, Sengul E, Aksu EH, Cinar I, Gelen V, Tekin S. *Selenium Reduces Acrylamide-Induced Testicular Toxicity in Rats by Regulating HSD17B1, Star, And CYP17A1 Expression, Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, Autophagy, And DNA Damage*. Environ Toxicol 2024; 39(3): 1402-14.
36. Rezaei S, Hosseini-mehr SJ, Zargari M, Karimpour Malekshah A, Mirzaei M, Talebpour Amiri F. *Protective Effects of Sinapic Acid Against Cyclophosphamide-Induced Testicular Toxicity Via Inhibiting Oxidative Stress, Caspase-3 and NF-Kb Activity in BALB/C Mice*. Andrologia 2021; 53(10): e14196.