مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر بوسولفان بر تغییرات بیان ژن‌های *Nrf -2* و *Keap-1* در بافت بیضه رت‌های نر نژاد ویستار

ساسان کلانتری [۱]، طاهره ناجی [۲*] و رحیم احمدی [۳]

۱- دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- گروه فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: طاهره ناجی، دکتری تخصصی ، naji_t@iaups.ac.ir /tnaji2002@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۵/۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۷/۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۲۹

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: یکی از شناخته ترین عوارض داروهای ضد سرطان ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز است که در موارد زیادی ایجاد ناباروری می‌گردد. هدف بررسی حاضر ارزیابی تغییر بیان ژن های *Nrf-2* و *Keap-1* در اثر تزریق صفاقی بوسولفان در موش‌های نر نژاد ویستار انجام گردید.

روش مطالعه: در این مطالعه تعداد ۲۰ رت نر ویستار آلبینو بالغ دوماهه به وزن تقریبی ۲۰۰-۱۵۰ گرم در دو گروه کنترل (سالم) و گروه دریافت کننده بوسولفان وارد مطالعه شدند. پس از گذشت دوره مد نظر بافت بیضه موش‌ها جداسازی شد به لحاظ بیان ژن های *Nrf-2* و *Keap-1* و همچنین تغییرات هورمون های تستوسترون، FSH و LH مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌ها با نرم افزارSPSS وآزمون آماری One-way ANOVA مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.

نتایج: بررسی آماری نتایج حاصله نشان داد بیان ژن *Nrf-2* و *Keap-1* در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرده است اما این کاهش به لحاظ آماری معنادار نبود (0.2951 و P=0.3528). سطح هورمون LH و تستوسترون بین دو گروه کنترل و مورد درمان تفاوت معناداری نداشت (0.1327 و P =0.0809) اما سطح هورمون FSH بین دو گروه معنادار (P =0.0189) بود.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که بوسولفان می‌تواند با تغییراتی که در بیان ژن‌های *keap1* و *Nrf2* داشته باشد، سطح هورمون FSH که در فرآیند اسپرماتوژنز موثر است را تحت تاثیر قرار دهد و موجب ناباروری گردد. لذا از این فاکتورهای ژنی و هورمونی می‌توان جهت پیش آگاهی ناباروری استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ناباروری، بوسولفان، اکسیداسیون اکسیداتیو، تغییرات بیان ژن

مقدمه

طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت ناباروری عدم توانایی زوجین در بارداری بعد از یک سال از آمیزش بدون پیش گیری است. ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات در جهان است که در حدود ۱۵درصد زوج‌ها دیده می‌شود. بسته به جنس عوامل مختلفی می‌تواند در بروز ناباروری نقش داشته باشد(Olooto *et al.*, 2012). ناباروری دلایل متعددی دارد اما می‌توان به ناهنجاری های ژنتیکی، عوامل عفونی، اختلالات هورمونی، استرس اکسیداتیو و مصرف داروهای ضد تومور اشاره کرد (Craft *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2013; Alahmar, 2019). گزارشاتی از اختلال میزان هورمون‌های جنسی از جمله تستوسترون، FSH و LH در مردان و زنان نابارور به ثبت رسیده است که نشان می‌دهد تغییرات این هورمون‌ها می‌توانند موجب نتایج نامطلوبی در کیفیت باروری شود (Matin-du-Pan and Bischof, 1995; Babu *et al.*, 2004; Foresta *et al.*, 2004). استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) بازتاب‌دهنده عدم تعادل میان تظاهرات

سیستماتیک گونه‌های فعال (واکنش‌پذیر) اکسیژن (ROS) و توانایی یک سیستم زیستی در خنثی سازی و مهار میانجی‌های سمی آن یا ترمیم آسیب‌های وارده است (Chen *et al.*, 2015). امروزه گزارش‌هایی از تاثیر داروهای ضد تومور بر توان باروری به ثبت رسیده است. بوسولفان یکی از رایج‌ترین داروهای شیمی درمانی محسوب می‌گردد که قبل از پیوند مغز استخوان در کودکان و بالغین استفاده می‌گردد (ANJAM *et al.*, 2007; ABIDEMI, 2011). بعلاوه بوسولفان در درمان لوسمی میلوژنیک مزمن (CML) و سرطان تخمدان (Ovarian cancer) به‌طور وسیع تجویز می‌گردد (Choi *et al.*, 2004; Nieto *et al.*, 2012). بوسولفان از داروهای آلکیله کننده بوده و یک دی متان سولفانات می‌باشد که در شیمی درمانی به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد (ANJAM *et al.*, 2007). گزارش شده است که بوسولفان موجب آسیب به DNA، القاء پیری سلولی (Cellular senescence) و آپوپتوز (Apoptosis) در سلول‌های زایای بیضه می‌گردد (Choi *et al.*, 2004; Probin *et al.*, 2007; Ghasemi *et al.*, 2009). *Nrf2* (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) فاکتور رونویسی می‌باشد که سیگنال‌های استرس سلولی را کامل می‌کند و از طریق برنامه‌های رونویسی متنوع به آن‌ها پاسخ می‌دهد. بیش از ۱۰ سال قبل *Nrf2* یک پروتئین ناشناخته محسوب می‌گشت که تحقیقات کمی نقش دفاعی آن را در مهار استرس‌های اکسیداتیو و الکتروفیلیک و مهار سرطان زایی بررسی کرده بودند (Hayes *et al.*, 2000). فاکتور رونویسی *Nrf2* همراه با دو پروتئین دیگر، *Nrf1* و *Nrf3*، عضو خانواده CNC بوده و دارای نقش کلیدی در تنظیم هموستاز سلولی می‌باشد (Itoh *et al.*, 1997). *Nrf2* فاکتور رونویسی متعلق به گروه پروتئینی زیپ لوسین است که توسط ژن *NFE2L2* کد می‌شود (Kaspar *et al.*, 2009). *Keap1* ژنی است که ارتباط نزدیکی با *Nrf2* دارد. مسیر پیام رسانی *Keap1*- *Nrf2* به عنوان تنظیم کننده اصلی پاسخ‌های حفاظت سلولی (Cytoprotective) در برابر استرس‌های درون زا و برون زای ناشی از ROS و الکتروفیل‌ها است (Itoh *et al.*, 1997). تصور بر آن است که *Keap1* به عنوان یک تنظیم کننده منفی بالا دست *Nrf2* می‌باشد که از طریق واکنش کمپلکس-یوبی کوئیتین لیگاز (*Ubiquitin* ligase) با *Nrf2* این کار را انجام می‌دهد و منجر به یوبی کوئیتینه شدن و شکسته شدن *Nrf2* می‌شود (Homma *et al.*, 2009; Schafer *et al.*, 2010). با توجه به این موضوع که ژن‌های ذکر شده با هماهنگی هم سعی بر تنظیم استرس اکسیداتیو وارد شده بر سلول دارند، لذا سلول‌های زایای بیضه که تحت تاثیر داروهای ضد تومور از جمله بوسولفان هستند بسیار نیازمند به بیان هماهنگ این دو ژن دارند. در فرآیند اسپرماتوژنز سطوح هورمون‌های جنسی LH، FSH و تستوسترون بسیار با اهمیت است. تغییر میزان سطوح این هورمون‌ها نیز در توان باروری و زایایی بسیار مشخص است. پژوهش حاضر با هدف بررسی تغییر بیان ژن های *Nrf-2* و *Keap-1* و سطوح هورمونی LH، FSH و تستوسترون در اثر تزریق صفاقی بوسولفان در موش‌های نر نژاد ویستار انجام گردیده است.

روش مطالعه

مطالعه حاضر پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران واحد علوم دارویی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.107 انجام گرفت. در این بررسی تعداد ۲۰ رت نر ویستار آلبینو بالغ دوماهه به وزن تقریبی ۲۰۰-۱۵۰ گرم وارد مطالعه شدند. حیوانات پس از یک هفته سازش و تطابق با شرایط جدید و نیز رسیدن به وزن مطالعه، جهت شروع مطالعه به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم بندی شدند. گروه کنترل شامل۱۰ رت سالم و گروه تحت تیمار ۱۰ رت دریافت کننده بوسولفان. به گروه تحت تیمار بوسولفان با دوز ۴۰ میلی گرم به ازای ۱ کیلوگرم وزن حیوان بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. جهت تزریق، بوسولفان در یک محلول ۵۰ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شد و سپس بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. رت‌های گروه کنترل حجم مساوی از DMSO و آب را دریافت کردند. سی روز پس از تزریق بوسولفان، رت‌ها وزن شده و از ورید اجوف تحتانی (Venae *cavae*) رت‌ها خون گیری صورت گرفت، بدین ترتیب که پس از بیهوشی با تزریق ۵۰ mg/kg کتامین (Ketamine) و شکم جراحی گردید و بعد از کنار زدن احشا به ورید اجوف تحتانی دسترسی پیدا کرده و با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری خون‌گیری صورت گرفت. سپس آن را در لوله عاری از ضد انعقاد ریخته و سرم آن را در دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جدا نموده و سرم‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد فریز گردید. در ادامه بافت بیضه با جراحی از بدن حیوان خارج شد و جهت استخراج Total RNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA: نمونه‌های بافت بیضه به صورت کامل در دستگاه هموژنایزر قرار گرفتند و به مدت ۳۰ ثانیه و ۳ مرتبه بر روی یخ هموژنیزه گردیدند، پس از اطمینان از همگن شدن کامل نمونه و اتمام فرآیند هموژنیزاسیون نمونه‌ها درون میکروتیوب انتقال داده شدند. در ادامه فرآیند استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول (GeneAll-*South Korea*) صورت پذیرفت (Adamian *et al.*, 2021; Forouzesh *et al.*, 2021). پس از استخراج با استفاده از نانودرآپ نسبت جذب ۲۶۰/۲۹۰ نانومتر نمونه‌ها جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده اندازه‌گیری گردید. در ادامه به منظور سنتز cDNA از کیت سنتز شرکت پارس توس (مشهد-ایران. Cat no:

A101161) مطابق پروتکل کیت استفاده گردید، طراحی primer توسط نرم افزار oligo-7 صورت پذیرفت و سنتز آن توسط شرکت سیناکلون (ایران-تهران) انجام شد.

بررسی بیان ژن توسط تکنیک Real time-PCR: به منظور بررسی بیان ژن‌ها *Keap1* و *Nrf2* از تکنیک Real time-PCR استفاده گردید. جدول شماره ۱ لیست توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی حاضر را نشان می‌دهد. در این بررسی از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی واکنش PCR استفاده گردید. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر بوده است. تمامی تست ها ۳ بار تکرار و به صورت جداگانه انجام گردید. برنامه دمایی زمانی به صورت دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه ۵ دقیقه، طویل سازی ۸۵ درجه ۵ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۴۰ ثانیه انجام شد. اطلاعات کمی حاصل از Real time به صورت داده‌های Ct و بیان ژن با استفاده از روش Fold Change و توسط نرم افزار REST آنالیز شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

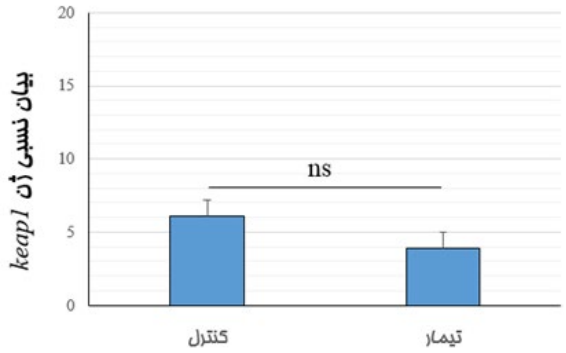
نام ژن	توالی پرایمر	TM(°C)
Nrf2	F: 5'-CACATCCAGACAGACACCAGT-3'	۵۸ °C
	R: 5'-CTACCCTGGGAATGTCTCTGC-3'	۵۹ °C
Keap1	F: 5'-AGCGTCGAGAGATATGAGCC-3'	۵۳ °C
	R: 5'-AGCCGGTTAGTCCCATCAAA-3'	۵۲ °C
GAPDH	F: 5´-ATCACTGCCACTCAGAAGAC	۵۸/۵ °C
	R: 5´-ACATTGGGGGTAGGAACAC	۵۹ °C

تجزیه و تحلیل آماری: پس از جمع آوری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad و SPSS و روش One Way ANOVA نسخه نهایی به بررسی و تجزیه و تحلیل اطلاعات پرداخته و نتایج حاصل استخراج گردید. آنالیز با آزمون‌های T test ، post hoc و Tukeyانجام شد. داده‌ها بصورت mean ±SD ارائه می‌شوند و سطح معنی دار شدن $P\leq0.05$ در نظر گرفته می‌شود.

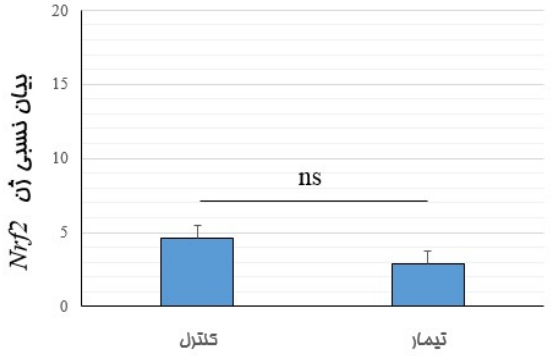
بررسی و ارزیابی سطوح هورمونی: به منظور سنجش هورمون های تستوسترون، FSH و LH از کیت های تجاری سنجش بر پایه الایزا استفاده گردید. استاندارد سازی برای هر هورمون انجام شد و پس از انجام مراحل مطابق پروتکل استاندارد کیت میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شدند.

نتایج

آنالیز نتایج بیان ژن‌ها: آنالیز نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که بیان *Keap-1* در گروه تحت تیمار نسبت به گروه کنترل، به میزان ۱/۸۲۱ برابر کاهش یافته است، اما این اختلاف ایجاد شده معنادار نمی‌باشد (P=0.2951) (نمودار ۱). آنالیز نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که بیان *Nrf2* در گروه تحت تیمار نسبت به گروه کنترل، به میزان ۱/۴۴ برابر کاهش یافته است، اما این اختلاف ایجاد شده معنادار نمی‌باشد (P=0.2951) (نمودار ۲).



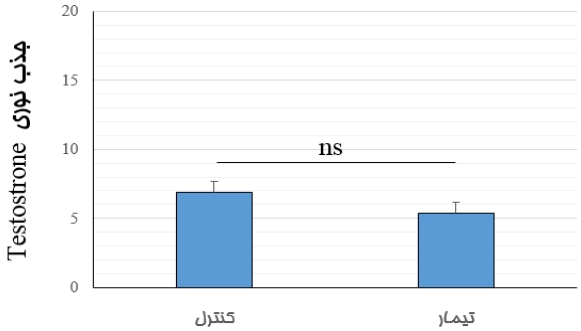
نمودار ۱. نمودار آنالیز آماری ژن *Keap-1* بین گروه کنترل و تیمار که ارتباط معناداری را نشان نمی‌دهد. بیان *Keap-1* در گروه تحت تیمار نسبت به گروه کنترل، به میزان ۱/۸۲۱ برابر کاهش یافته است.



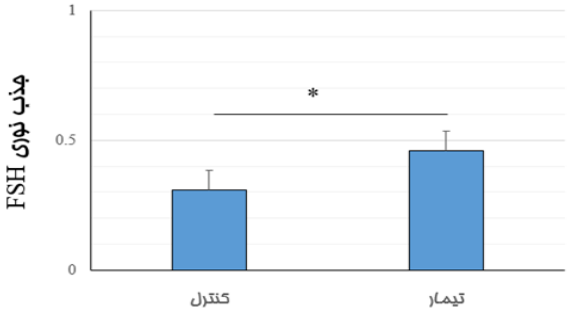
نمودار۲- نمودار آنالیز آماری ژن *Nrf2* بین گروه کنترل و تیمار که ارتباط معناداری را نشان نمی‌دهد. بیان *Nrf2* در گروه تحت تیمار نسبت به گروه کنترل، به میزان ۱/۴۴ برابر کاهش یافته است.

آنالیز نتایج تغییرات سطوح هورمونی: آنالیز نتایج بدست آمده از سطح هورمون تستوسترون در پژوهش حاضر نشان داد در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد، ارتباط معناداری وجود ندارد

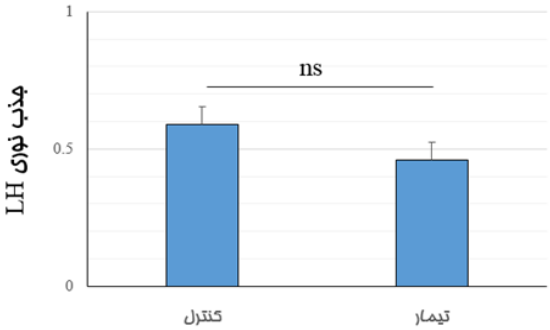
(*P*=0.0809) (نمودار ۳). آنالیز نتایج بدست آمده از سطح هورمون FSH در پژوهش حاضر نشان داد در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد، ارتباط معناداری وجود دارد (*P*=0.0189) (نمودار ۴). آنالیز نتایج بدست آمده از سطح هورمون LH در پژوهش حاضر نشان داد در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد، ارتباط معناداری وجود ندارد (*P*=0.1327) (نمودار ۵).



نمودار ۳- تغییر میزان هورمون تستوسترون در گروه کنترل و موش‌های تحت تیمار بوسولفان. در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد، ارتباط معناداری وجود ندارد (*P*=0.0809).



نمودار ٤- تغییر میزان هورمون FSH در گروه کنترل و موش‌های تحت تیمار بوسولفان. در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد، ارتباط معناداری وجود دارد (*P*=0.0189).



نمودار ۵- تغییر میزان هورمون LH در گروه کنترل و موش‌های تحت تیمار بوسولفان. در گروه تیمار (بوسولفان) نسبت به گروه شاهد، ارتباط معناداری وجود ندارد (*P*=0.1327).

بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهد که ژن‌ها نقش کلیدی بر روی بیماری‌ها از جمله ناباروری دارد. یکی از علل ایجاد نازایی آسیب‌های وارد شده به ژنوم زیگوت است، از مهمترین عوامل آسیب DNA اسپرم که در اکثر انواع ناباروری‌های مردان تأثیرات مضری دارد می‌توان به افزایش سطح استرس اکسیداتیو اشاره نمود (Simon *et al.*, 2013; Gharagozloo *et al.*, 2016). این مطالعه با هدف ارزیابی اثر بوسولفان بر تغییرات بیان ژن‌ها *Keap1* و *Nrf2* در سلول‌های بافت بیضه موش نژاد نر ویستار و هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH انجام شد. بررسی آماری نتایج حاصله نشان داد بیان ژن‌های *Keap1* و *Nrf2* در دریافت کننده بوسولفان نسبت به گروه شاهد تغییر معناداری پیدا نکرده است. هورمون های LH و تستوسترون نیز در دوگروه مورد بررسی تغییر معناداری را از خود نشان ندادند این در حالی است که سطح هورمون FSH در گروه تحت تیمار با بوسولفان نسبت به گروه شاهد به لحاظ آماری افزایش میزان معناداری (*P*=0.0189) را از خود نشان داده است (نمودارهای ۳ تا ۵). در مقام مقایسه نتایج بررسی حاضر با بررسی Nakamura و همکاران در سال ۲۰۱۰ در زمینه بررسی بیان ژن *Nrf-2* همسو می‌باشد، در این بررسی مشخص شد حذف ژن *Nrf-2* باعث استرس اکسیداتیو بیضه و اپیدیدیم می‌شود، که نتیجه این فرآیند اختلال در اسپرماتوژنز می‌شود (Nakamura *et al.*, 2010). همانطور در بررسی حاضر هم نشان داده شد تزریق بوسولفان موجب کاهش بیان ژن *Nrf-2* و نتیجتا موجب کاهش توانایی باروری و نازایی در موش‌ها می‌گردد. Gutierrez و همکاران در سال ۲۰۱۵ که در بررسی های خود ثابت نمودند تزریق داخل صفاقی بوسولفان در موش موجب القاء ناباروری در موش‌ها و اسپرماتوژنز غیر عادی در آن‌ها خواهد شد (Gutierrez *et al.*, 2016)، این موضوع در پژوهش حاضر نیز تایید گردید و مشخص شد داروی بوسولفان نقش مهمی بسیار در ایجاد نازایی و کاهش فرآیند اسپرماتوژنز طبیعی در موش‌ها دارد. در بررسی Qin و همکاران مشخص شد تزریق بوسولفان بصورتی وریدی تاثیری زیادی بر القاء ناباروری در موش‌ها ندارد اما چنانچه بوسولفان در بیضه موش‌ها تزریق گردد موجب بر هم خوردن فرآیند اسپرم سازی در موش‌ها می‌گردد (Qin *et al.*, 2016). در بررسی حاضر نشان داده شد که تزریق صفاقی بوسولفان به حیوان آزمایشگاهی می‌تواند موجب کاهش کیفیت و کمیت اسپرماتوژنز گردد و بیان ژن‌های کلیدی و هورمون‌هایی مانند FSH و LH و تستوسترون را تا حدودی تحت تاثیر قرار می‌دهد. Wu و همکاران نشان دادند که تزریق بوسولفان می‌تواند موجب القاء فرآیند آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوزم گردد و در نتیجه کیفیت اسپرماتوژنز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Wu *et al.*, 2016)، با توجه به این موضوع که اشاره شد ژن‌های *Keap1* و *Nrf2* در مسیر

تنظیم استرس اکسیداتیو نقش دارند لذا می‌توان عنوان کرد که القاء آپوپتوز در اسپرم‌ها احتمالا با تغییر میزان بیان این ژن‌ها ارتباط داشته باشد، در بررسی حاضر هم اگرچه ارتباط معناداری میان تغییر ژن‌های ذکر شده در دو گروه موش‌های مورد ارزیابی گزارش نشد ولی تغییرات میزان بیان در گروه تحت تیمار نسبت به گروه شاهد کاملا وجود داشت. خسروشاهی و همکارانش نشان دادند که تزریق بوسولفان به صورت داخل صفاقی به موش‌ها می‌تواند بر روی مراحل اسپرماتوژنز اثر بگذارد و باعث کاهش معنی دار در تعداد، تحرک و شکل طبیعی اسپرم ها در مقایسه با گروه کنترل که به آن ها بوسولفان تزریق نشده است گردد (FERDOSI *et al.*, 2013)، در این ارزیابی نیز مشخص شد تزریق بوسولفان می‌تواند موجب استرس اکسیداتیو و تغییر در بیان ژن‌های موثر در مقابله با استرس اکسیداتیو گردد. در انتها با در نظر گرفتن تمامی نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر و مقایسه این نتایج با بررسی‌های گذشته می‌توان عنوان نمود، در فرآیند نازایی یکسری ژن‌های بسیار کلیدی وجود دارند که در تنظیم سیکل سلولی، القاء فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول و همچنین پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو نقش اساسی را بر عهده دارند از جمله *Keap1* و *Nrf2* که در تمامی بررسی‌ها نتایج مشابهی با تحقیق حاضر گزارش شده است یعنی این ژن‌ها در طی فرآیند استرس اکسیداتیو تغییرات سطح بیان را از خود نشان می‌دهند. پس چنانچه بتوان بیان این ژن‌ها را با استفاده از miRNAها، siRNAها و یا داروهای گیاهی و طب مکمل مدیریت کرد می‌توان امیدوار بود بتوان تا حدودی از اثرات ناخواسته داروهای شیمی درمانی بخصوص بوسولفان کاست و به درمان هدفمندتری برای سرطان دست پیدا نمود تا بیماران مخاطرات ناشی از درمان با داروهایی نظیر بوسولفان را کمتر حس نمایند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که بوسولفان می‌تواند با تغییراتی که در بیان ژن های *keap1* و *Nrf2* داشته باشد، سطح هورمون FSH که در فرآیند اسپرماتوژنز موثر است را تحت تاثیر قرار دهد و موجب ناباروری گردد. لذا از این فاکتورهای ژنی و هورمونی می‌توان جهت پیش آگاهی ناباروری استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

از تمامی همکاران و پرسنل زحمتکش مرکز حیوانات و آزمایشگاه تحقیقاتی بیمارستان بقیه الله (عج) تهران که در طول این تحقیق همراه و همیار ما بوده‌اند، بی نهایت سپاسگزاری و قدردانی مینماییم.

مراجع

Abidemi, A.A. 2011. Protective effect of tahitian noni juice on the reproductive functions of male wistar rats traeted with cyclophosphamide. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics, 10(1): 39-30.

Adamian, M., Hekmat, A. and Hajebrahimi, Z. 2021 .The impacts of simulated microgravity on the cell viability and claudin-1 and claudin-3 expression of mcf-7 breast cancer cells. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 32(2): 105-114.

Alahmar, A.T. 2019. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. Journal of human reproductive sciences, 12(1): 4.

Anjam, R.S., Movahedin, M., POURBEYRANVAND, S. and MOULA, S.J. 2007. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment.

Babu, S.R., Sadhnani, M., Swarna, M., Padmavathi, P. and Reddy, P. 2004. Evaluation of fsh, lh and testosterone levels in different subgroups of infertile males. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 19(1): 45-49.

Chen, J., Bhandar, B. and Kavdia, M. 2015. Interaction of ros and rns with gsh and gsh/gpx systems. The FASEB Journal, 29: 636.637.

Choi, Y.-J., Ok, D.-W., Kwon, D.-N., Chung, J.-i., Kim, H.-C., Yeo, S.-M., Kim, T., Seo, H.-G. and Kim, J.-H. 2004. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a fas/fasl-and p53-independent manner. FEBS letters, 575(1-3): 41-51.

Craft, I., Bennett, V. and Nicholson, N. 1993. Fertilising ability of testicular spermatozoa. The Lancet, 342(8875.٨٦٤ :(

Ferdosi, K.A., Bakhtiari, M., SOLEIMANI, R.J., Koroji, M., Roshangar, L., Janzadeh, A., Kerdari, M. and Jameie, B. 2013. Study of the effect of exogenous melatonin on sperm fertility in busulfan induced oligospermic of pinealectomeized rat.

Foresta, C., Bettella, A., Spolaore, D., Merico, M., Rossato, M. and Ferlin, A. 2004. Suppression of the high endogenous levels of plasma fsh in infertile men are associated with improved sertoli cell function as reflected by elevated

levels of plasma inhibin b .Human Reproduction, 19(6): 1431-1437.

Forouzesh, F., Hajimirza Shafiesoltani, P., Ghiaghi, M. and Shabani, M. 2021. Anti-proliferative effect of sodium butyrate against caco-2 cell line of human colorectal cancer by reducing the expression ratio of bcl-2 to bax mrna. Research in Karyotic Cell & Tissue, 1(3): 16-24.

Gharagozloo, P., Gutiérrez-Adán, A., Champroux, A., Noblanc, A., Kocer, A., Calle, A., Pérez-Cerezales, S., Pericuesta, E., Polhemus, A. and Moazamian, A. 2016. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: Promising preclinical evidence from animal models. Human Reproduction, 31(2): 252-262.

Ghasemi, M., Bahadori, M., Faghani, M., Nasiri, E. and Soleimani Rad, J. 2009. Buserelin inhibits apoptosis in male germ cells induced by busulfan in mouse testis. J Iran Anat Sci, 7: 45-54.

Gutierrez, K., Glanzner, W.G., Chemeris, R.O., Rigo, M.L., Comim, F.V., Bordignon, V. and Gonçalves, P.B. 2016. Gonadotoxic effects of busulfan in two strains of mice. Reproductive Toxicology, 59: 31-39.

Hayes, J., Chanas, S., Henderson, C., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G., Wolf, C. and Yamamoto, M. 2000. The nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione s-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. Portland Press Ltd.

Homma, S., Ishii, Y ,.Morishima, Y., Yamadori, T., Matsuno, Y., Haraguchi, N., Kikuchi, N., Satoh, H., Sakamoto, T. and Hizawa, N. 2009. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. Clinical Cancer Research, 15(10): 3423-3432.

Itoh ,K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K. and Hatayama, I. 1997. An nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase ii detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochemical and biophysical research communications, 236(2): 313-322.

Kaspar, J.W., Niture, S.K. and Jaiswal, A.K. 2009. Nrf2: Inrf2 (keap1) signaling in oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 47(9): 1304-1309.

Matin-du-Pan, R. and Bischof, P .1995 .Increased follicle stimulating hormone in infetile men: Is increased plasma fsh always due to damaged germinal epithelium? Human Reproduction, 10(8): 1940-1945.

Nakamura, B.N., Lawson, G., Chan, J.Y., Banuelos, J., Cortés, M.M., Hoang, Y.D., Ortiz ,L., Rau, B.A. and Luderer, U. 2010. Knockout of the transcription factor nrf2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. Free Radical Biology and Medicine, 49(9): 1368-1379.

Nieto, Y., Thall, P., Valdez, B., Andersson, B., Popat, U., Anderlini ,P., Shpall, E.J., Bassett, R., Alousi, A. and Hosing, C. 2012. High-dose infusional gemcitabine combined with busulfan and melphalan with autologous stem-cell transplantation in patients with refractory lymphoid malignancies. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 18(11): 1677-1686.

Olooto, W.E., Amballi, A.A. and Banjo, T.A. 2012. A review of female infertility; important etiological factors and management. J Microbiol Biotech Res, 2(3): 379-385.

Probin, V., Wang, Y. and Zhou, D. 2007. Busulfan-induced senescence is dependent on ros production upstream of the mapk pathway. Free Radical Biology and Medicine, 42(12): 1858-1865.

Qin, Y., Liu, L., He, Y., Wang, C., Liang, M., Chen, X., Hao, H., Qin, T., Zhao, X. and Wang, D. 2016. Testicular busulfan injection in mice to prepare recipients for spermatogonial stem cell transplantation is safe and non-toxic. PLoS One, 11(2): e0148388.

Schafer, M., Dütsch, S., Auf dem Keller, U. and Werner, S. 2010. Nrf2: A central regulator of uv protection in the epidermis. Taylor & Francis: pp: 2917-2918.

Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D. and Lewis, S. 2013. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after ivf. Reproductive biomedicine online, 26(1): 6: 78-88.

Wu, C.-H., Yang, J.-G., Chang, Y.-J., Hsu, C.-C. and Kuo, P.-L. 2013. Screening of a panel of steroid-related genes showed polymorphisms of aromatase genes confer susceptibility to advanced stage endometriosis in the taiwanese han population. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 52(4): 485-492.

Wu, C., Zhang, Y., Shen, Q., Zhou, Z., Liu, W. and Hua, J. 2016. Resveratrol changes spermatogonial stem cells (sscs) activity and ameliorates their loss in busulfan-induced infertile mouse. Oncotarget, 7(50): 82085.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 2, Issue 3, 2021, Pages 12-17

Research Article

The effect of busulfan on the expression changes of *Nrf -2* and *Keap-1* genes in testicular tissue of male Wistar rats

Sasan Kalantari [1], Tahereh Naji [2,*], Rahim Ahmandi[3]

[1] Pharmacy Student, Department of Basic Sciences School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2.] Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[3.] Department of Physiology, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

*Correspondence to Tahereh Naji, Ph.D., naji_t@iaups.ac.ir /tnaji2002@gmail.com

Received 31st July 2021 Revised 1st October 2021 Accepted 20th December 2021

Abstracts

Introduction and Aim: One of the most well-known side effects of anticancer drugs is disruption of spermatogenesis, which in many cases causes infertility. The present study aimed to evaluate the expression change of *Nrf-2* and *Keap-1* genes due to peritoneal injection of busulfan in male Wistar rats.

Methods: In this study, 20 two-month-old adult male Wistar albino rats weighing approximately 200-150 g were studied in two groups: the control group (healthy) and the busulfan group. After this period, the testicular tissue of the mice was isolated and evaluated for the expression of *Nrf-2* and *Keap-1* genes, as well as changes in testosterone, FSH, and LH. Data were analyzed using SPSS software and a one-way ANOVA statistical test.

Results: The statistical analysis of the results showed that the expression of *Nrf-2* and *Keap-1* genes in the treatment group (busulfan) decreased compared to the control group, but this decrease was not statistically significant (0.2951 and P = 0.3528). LH and testosterone levels were not significantly different between the control and treated groups (0.1327 and P = 0.0809) but FSH levels were significant between the two groups (P = 0.0189).

Conclusion: The results of this study showed that busulfan can affect the level of FSH, which is effective in spermatogenesis, by causing changes in the expression of keap1 and *Nrf-2* genes and causing infertility. Therefore, these genetic and hormonal factors can be used to predict infertility.

Keywords: Infertility, Busulfan, Oxidative stress, Gene expression changes