

## تأثیر یرقان انسدادی حاد بر روی پارامترهای اسپرم موش های صحرایی بالغ

دکتر ابراهیم نصیری\*، دکتر احمد رضا دهپور\*\*، دکتر علیرضا زمانی\*\*\*، دکتر ایرج امیری\*

دریافت: ۸۳/۹/۹، پذیرش: ۸۴/۵/۳۰

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** کلتاز یا یرقان انسدادی نوعی بیماری کبدی است که با تجمع اسیدهای صفراوی، افزایش تونوس اوبیوئیدهای درونساز، نیتریک اکساید و سیتوکین ها در پلاسما همراه است. از آنجائیکه این پیامدها میتوانند روی هورمون های جنسی تأثیر بگذارند و بلحاظ اینکه باروری مناسب نتیجه توازن فیزیولوژیک هورمون های جنسی می باشد، این مطالعه به تعیین تغییرات احتمالی هورمون های گنادوتروپین و پارامترهای اسپرم در موش کلتاتیک پرداخته است.

**روش کار:** برای این مطالعه تجربی سه گروه و در هر گروه هشت سر موش صحرایی بکار برده شد: شاهد (بدون جراحی)، شاهد جراحی یا شم (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه کلتاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی). سه هفته بعد از انجام جراحی غلظت سرمی هورمون های FSH و LH توسط روش ایمونورادیومتریک اسی و پارامترهای اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری اندازه گیری شد.

**نتایج:** نتایج این پژوهش بیانگر کاهش معنی دار هورمون های FSH، LH در گروه کلتاتیک نسبت به گروه های شاهد و شاهد - جراحی بوده است ( $P < 0.05$ ). ولی تغییر معنی داری در پارامترها و مورفولوژی اسپرم گروه کلتاتیک نسبت به گروه های دیگر مشاهده نشده است ( $P > 0.05$ ).

**نتیجه نهایی:** یرقان انسدادی حاد باعث کاهش هورمون های گنادوتروپینی شده ولی تأثیر معنی داری روی پارامترهای اسپرم نداشته است از نتایج این مطالعه حدس زده می شود که اسپرماتوژنز سلول های زاینده بیضه موش های بالغ تنها وابسته به هورمون های گنادوتروپین نیست بلکه فاکتورهای دیگری نیز ممکن است دخالت داشته باشند.

**کلید واژه ها:** اسپرم / موش / هورمونهای محرک غدد جنسی / یرقان انسدادی

### مقدمه:

اکساید، استرس های اکسیداتیو و سیتوکین ها را در پلاسما نشان می دهد (۵-۱). بیشتر این فاکتورها روی محور جنسی مؤثر بوده، باعث تغییر در ترشح گنادوتروپینها می گردند. اوبیوئیدهای اندوژن ترشح گنادوتروپین ها را با مهار هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) (Gonadotropin-Releasing Hormone) مترشح از هیپوتالاموس، کاهش می دهد (۶). نیتریک اکساید اگزوژن باعث مهار محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) (Hypothalamus-Pituitary-Gonad) می شود (۷).

کلتاز انسدادی حاد نوعی بیماری کبدی است که بیشتر بعلت گیر کردن سنگ صفراوی در مجرای صفراوی مشترک، آمپول واتر یا کارسینوما سرپانکراس بوجود می آید. دوره این بیماری سه هفته بوده که بعد از این دوره بیماری مزمن شده و تبدیل به سیروز کبدی می گردد، این بیماری با تجمع نمک های صفراوی و بیلی روبین در پلاسما همراه است. تحقیقات جدید در کلتاز انسدادی افزایش اوبیوئیدی درونساز، نیتریک

\* استادیار گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (ebrahimnasiri@yahoo.com)

\*\* استاد گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\* استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

(داخل صفاقی ۵۰ mg/kg) و کلروپرومازین (۱۰ mg/kg) لاپاراتومی انجام گردید.

در گروه شاهد- جراحی، مجرای صفراوی با استفاده از پنست فقط مشاهده گردید، در گروه کلستاتیک، مجرای صفراوی با دو گره در فاصله چند میلی متری بسته شد و حد فاصل بین دو گره با قیچی قطع گردید سپس جدار شکم در دو لایه فاسیا و پوست بخیه گردید. میزان مرگ و میر بعد از عمل در گروه آزمایش حدوداً ۱۰٪ بود. بعد از ۲۱ روز موش های صحرایی ابتدا با اثر بیهوش گردیدند و سپس قطع نخاع شدند و مقدار ۵ سی سی خون با استفاده از سرنگ استریل از قلب آنان استخراج شد و سپس با سانتریفیوژ نمونه ها در ۱۵۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه سرم جدا گردید. سرم ها تا زمان آزمایش در منهای هفتاد درجه نگهداری گردیدند. همزمان قسمت دمی اپیدیدیم راست حیوان برداشته شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در محلول بافر ۳۷ درجه به میزان ۵ سی سی در یک پلیت قرار گرفت و بوسیله تیغ بیستوری کاملاً تکه تکه گردید و در داخل انکوباتور برای ارزیابی پارامترها و مورفولوژی اسپرم نگهداری شد.

مقادیر FSH سرم با روش ایمونورادیومتریکی با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد FSH رتی متصل به لوله های پلی استیرنی که قابلیت تسخیر FSH رتی را در حضور آنتی بادی مونوکلونال ثانویه حاوی ید رادیواکتیو ضد FSH رتی را دارند و بر اساس دستورالعملهای شرکت تولید کننده کیت و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اندازه گیری شد (۱۵).

مقادیر LH سرم با روش ایمونورادیومتریکی رقابتی با استفاده از LH رتی حاوی ید رادیواکتیو (۱۲۵قرمز رنگ) و آنتی بادی پلی کلونال ضد یدید رادیواکتیو تهیه شده در خرگوش و براساس دستورالعملهای شرکت تولید کننده کیت و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اندازه گیری شد (۱۵).

برای بررسی موتیلیتی اسپرم، مقداری از نمونه (تکه تکه اپیدیدیم) که در داخل انکوباتور قرار داشت، برداشته و بر روی لام نئوبار قرار دادیم و نمونه را زیر میکروسکوپ نوری گذاشته و با دید ۱۰ بررسی کردیم. اسپرمهایی که حرکت نداشتند شمارش شدند سپس نمونه را فیکس کرده و کل تعداد اسپرمها را شمارش نمودیم. سپس تعداد اسپرمهایی را که حرکت نداشتند از کل اسپرمها کم کردیم و از رابطه زیر موتیلیتی اسپرم ها محاسبه گردید:

هورمون های محور جنسی فرآیند استروئیدوژنز و اسپرماتوژنز را کنترل می کند. همچنین تحقیقات زیادی افزایش تولید نیتریک اکساید را در ناباروری نشان می دهند (۸-۱۱). برخی از این تحقیقات نشان می دهد که نیتریک اکساید روی حرکت اسپرم نقش مهمی داشته و افزایش سطح آن موجب ناباروری در مردان می شود (۱۲، ۱۳). با در نظر گرفتن اثرات مهاری اویپوئیدهای درونساز بر روی گنادوتروپینها و نیز نقش مهاری نیتریک اکساید بر روی حرکت اسپرم و نقش احتمالی آن در ناباروری و این واقعیت که سطح اویپوئیدهای درونساز و نیتریک اکساید در جریان کلستاز افزایش می یابد، منطقی است تصور شود که کلستاز انسدادی می تواند بر روی دستگاه تناسلی تأثیر بگذارد.

بهمین منظور این مطالعه با هدف تعیین تغییرات احتمالی هورمونهای گنادوتروپین و پارامترهای اسپرم در موش کلستاتیک انجام شد.

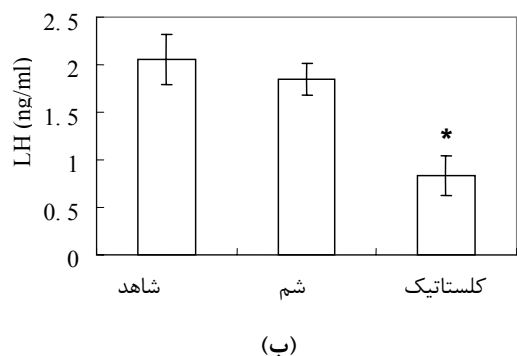
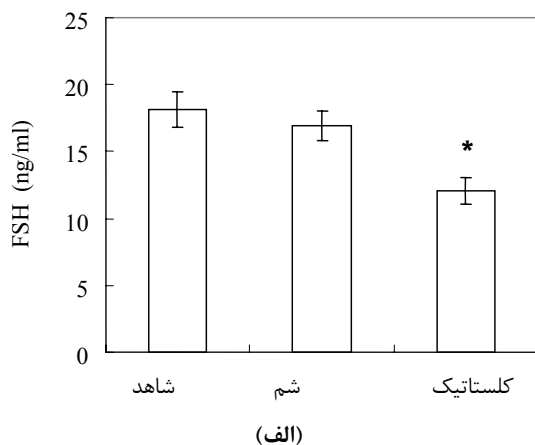
### روش کار:

مواد: کیت های ایمونورادیومتریکی اسی (IRMA) برای سنجش هورمونهای FSH و LH از شرکت دی-اس-ال (Diagnostic Systems Laboratories) (وبستر، تگزاس، امریکا) خریداری شد. موشهای صحرایی نر ۱۲-۱۶ هفته ای با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم، نژاد اسپراک - داوولی (Sprague-Dawley) از بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج تهیه گردیدند.

روشها: این مطالعه از نوع تجربی می باشد. قبل از انجام مطالعه، موش ها به بخش حیوانات آزمایشگاهی بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی منتقل شد و با حیوانات بر اساس مقررات و دستورالعملهای تدوین شده توسط انستیتو ملی بهداشت آمریکا (Health National Institute USA) رفتار شد. موش ها بطور تصادفی به سه گروه هشت تایی تقسیم شدند. گروه شاهد (بدون جراحی)، گروه شاهد- جراحی یا شام (sham) (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه آزمایش یا کلستاتیک (BDL) (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی Bile Duct Ligated) و در تمام مدت مطالعه غذای پلیت و آب به میزان کافی در اختیار حیوانات قرار داشت و با برقراری سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. انسداد مجرای صفراوی بر اساس پروتکل موجود در مطالعات قبلی صورت گرفت (۱۴).

برای این منظور تحت بیهوشی کامل با کتامین

را نشان می دهد. که در این رابطه میانگین غلظت هورمون LH در موش های کلستاتیک ( $0/83 \pm 0/21 \text{ ng/ml}$ ) نسبت به گروه های شاهد ( $2/058 \pm 0/26 \text{ ng/ml}$ ) و شـم ( $1/84 \pm 0/17 \text{ ng/ml}$ ) بطور معنی دار کاهش داشت ( $p=0/0029$ ).



#### نمودار ۱: تأثیر کلستازیس روی سطح سرمی FSH و LH

علامت (\*) نشانگر معنی دار بودن ( $P < 0.05$ ) اختلاف میانگین گروه کلستازیس با گروه های شاهد و شم می باشد.

(۲) عدم تاثیر کلستاز انسدادی بر روی موتیلیتی، تعداد و مورفولوژی اسپرمها.

تعداد اسپرمها (نمودار ۲- الف) در موشهای کلستاتیک ( $926000 \pm 1412$ ) نسبت به گروه های شاهد ( $1146000 \pm 505$ ) و شـم ( $1175556 \pm 1063$ ) تغییرات معنی داری را نشان نداد ( $P=0/209$ ).

موتیلیتی اسپرمها (نمودار ۲- ب) در موشهای کلستاتیک ( $81500 \pm 4578$ ) نسبت به گروه های شاهد ( $84800 \pm 4703$ ) و شـم ( $84000 \pm 4703$ ) تغییرات معنی داری را نشان نداد ( $P=0/139$ ).

$100 \times \frac{\text{تعداد اسپرمهای بیحرکت} - \text{تعداد کل اسپرمها}}{\text{تعداد کل اسپرمها}} = \text{موتیلیتی اسپرم}$

برای بررسی تعداد اسپرمها هم از لام نئوبار استفاده شد به این طریق که نمونه بدست آمده از اپیدیدیم ۴۰ برابر با فرمالدئید ۵٪ رقیق گردید سپس آن را روی لام نئوبار گذاشته و تعداد اسپرمها در چهار مربع بزرگ شمارش شد، عدد بدست آمده در ۵۰۰۰۰ ضرب گردید که عدد حاصل نمایانگر تعداد اسپرمها در اپیدیدیم دمی سمت راست بود (۱۶).

برای بررسی مورفولوژی اسپرم ها از همان نمونه ای که برای بررسی موتیلیتی اسپرم تهیه شده بود استفاده گردید بدین صورت که گستره ای بر روی لام تهیه شد، و بعد در مجاورت هوا خشک گردید. سپس یکبار به آرامی با آب مقطر شستشو داده شد و دوباره در مجاورت هوا خشک گردید. سپس زیر میکروسکوپ نوری با دید ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت. در هر نمونه تعداد ۳۰۰ اسپرم بطور دقیق بررسی شدند (۱۷). اسپرمها بر اساس شکل ظاهری به ۵ گروه تقسیم شدند: ۱- طبیعی ۲- بدون دم ۳- ناهنجاری سر با دم سالم ۴- ناهنجاری دم با سر سالم ۵- ناهنجاری توام سر و دم.

آنالیز آماری: تمامی مقادیر بصورت میانگین  $\pm$  خطای انحراف استاندارد نشان داده شده است، ارزیابی آماری داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA انجام گردید و بر همین اساس ارزش P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

#### نتایج:

یک روز بعد از لاپاراتومی رتهای کلستاتیک علائم کلستازیس (زردی، ادرار تیره، و استاتوره) را بروز دادند و پس از ۲۱ روز رتها کشته شدند و هورمون های FSH و LH در سرم اندازه گیری گردید و پارامترهای اسپرم نیز بررسی شد.

(۱) کلستازیس موجب کاهش معنی دار هورمون های FSH و LH میشود.

با توجه به نمودار ۱- الف) میانگین غلظت هورمون FSH در موش های کلستاتیک ( $13/22 \pm 1/038 \text{ ng/ml}$ ) نسبت به گروه های شاهد ( $18/14 \pm 1/27 \text{ ng/ml}$ ) و شم ( $16/92 \pm 1/07 \text{ ng/ml}$ ) بطور معنی دار کاهش یافت ( $P=0/019$ ).

نمودار ۱- ب) تاثیر کلستازیس بر روی هورمون LH

کاهش میزان FSH و LH در پلاسمای موش های کلستاتیک باشد.

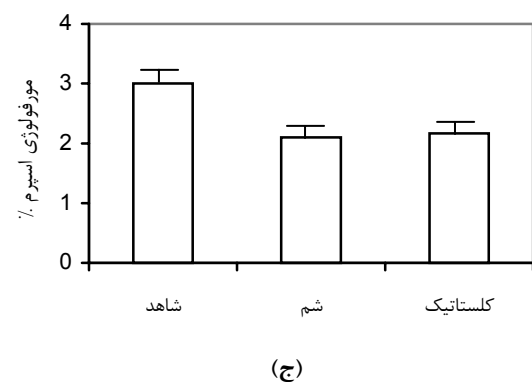
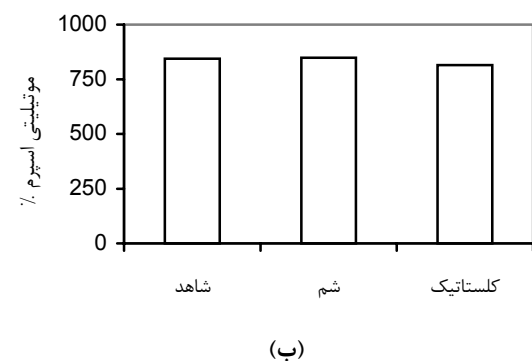
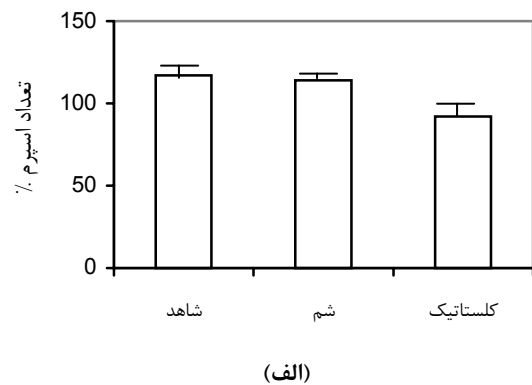
در جریان کلستاز انسدادی افزایش بیش از حد نیتریک اکساید اتفاق می افتد که مقدار زیاد آن برای بسیاری از سلول ها، عوارض سمی (Cytotoxic) دارد (۲۰). در مطالعاتی که با نیتریک اکساید آگزوزن صورت گرفته است، نیتریک اکساید باعث مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناده شده است (۷) و تجویز آزاد کننده نیتریک اکساید (DETO/NO) باعث مهار فرآیند استروئیدوژنیز در سلولهای لایدیگ گردیده است (۲۱)، لذا این احتمال وجود دارد که افزایش نیتریک اکساید ناشی از کلستازیس بر کاهش گنادوتروپین ها دخالت داشته باشد.

نیتریک اکساید (در غلظتهای داخل بدن) برای موتیلیتی کافی اسپرم ضروری به نظر می رسد (۲۲). بعضی مطالعات نشان می دهد که غلظت نیتریک اکساید در پلاسمای منوی مردان نابارور افزایش یافته و موتیلیتی اسپرم را کاهش می دهد (۱۲). افزودن نیتروپروسایدسیم (یک تولید کننده نیتریک اکساید) در محیط آزمایشگاهی (In vitro) درصد اسپرمهای متحرک، سرعت پیشروی و غلظت سلولهای متحرک را بطور قابل توجهی کاهش می دهد. با افزودن اکس هموگلوبین (یک مهار کننده نیتریک اکساید) اثرات آن را کاملا مهار می شود (۱۳). اما اینکه آیا نیتریک اکساید بتواند به طور پایدار موتیلیتی اسپرم را کاهش دهد کاملاً آشکار نیست. در جریان کلستاز، نیتریک اکساید افزایش می یابد و انتظار میرود که افزایش سطح نیتریک اکساید بر موتیلیتی اسپرم ها تأثیر بگذارد و آن را کاهش دهد. در این مطالعه ما در مقایسه گروه های کنترل، شم و کلستاتیک از نظر میزان موتیلیتی، تعداد و مورفولوژی تغییر معنی داری را پیدا نکردیم. ولی احتمالاً این یافته کاملاً این مسئله را که کلستاز باعث کاهش موتیلیتی، تعداد و مورفولوژی می شود، رد نمی کند. چون ما برای گرفتن نمونه اسپرم قطعه دیستال اپیدیدیم را در محیط بافر قرار دادیم، به عبارت دیگر اسپرمها را از محیط طبیعی پلاسمای منوی، که میزان نیتریک اکساید بالاتری دارد، جدا کردیم. علاوه بر این نیمه عمر نیتریک اکساید بسیار کوتاه است و در این مطالعه فاصله بین گرفتن نمونه تا آنالیز حدوداً ۱۵ دقیقه بود.

### نتیجه نهائی :

جمع بندی نتایج حاصل از مطالعات فوق نشان

مورفولوژی اسپرمها (نمودار ۲-ج) در موشهای کلستاتیک (۲/۱۷ ± ۰/۳۴) نسبت به گروه های شاهد (۳/۰۶۷ ± ۰/۵۱) و شم (۲/۱۰ ± ۰/۲۷) تغییرات معنی داری را نشان نداد (P=۰/۱۵۵).



نمودار ۲: تأثیر کلستازیس روی پارامترهای اسپرم

### بحث:

نتایج این بررسی نشان داد که در موش های کلستاتیک، کاهش معنی داری در ترشح FSH و LH در پلاسمای ایجاد شده است. از آنجائیکه در کلستاز چندین فاکتور، شامل: اوبیوئیدها، نیتریک اکساید، استرس های اکسیداتیو و سیتوکین ها افزایش می یابند (۵-۱) لذا احتمال می رود که افزایش این فاکتور ها دلیلی برای

- lamic- Pituitary-gonadal axis in the male. *Fed Proc* 1980 Jan;39(8):2551-54.
7. Pinilla L, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Bellido C, Aguilar E. Effects of systemic blockade of nitric oxide synthase on pulsatile LH, prolactin and GH secretion in adult male rats. *Horm Res* 2001;55(5):229-235.
  8. Heinemun A, Stauber RE. The role of inducible nitric oxide synthase in vascular hyperactivity of endotoxine treated and portal hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 278:87-90.
  9. Niedergerger M, Martin PY, Gines P. Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hemodynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1995; 109:1624-1630.
  10. Inan M, Sayek I, Tel BC. Role endotoxine and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice. *Bri J Surg* 1997; 84:943-47.
  11. Sader S, Nahavandi A, Mani AR. The role of nitric oxide in stress induced gastric damage in cholestatic rats. *Acta Medica Iranica* 1999; 37:68-72.
  12. Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K. Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility. *Am J Report Immunol* 1996; 36(4): 193-7.
  13. Tomlinson MJ, East SJ, Barratt CL. Preliminary communication: possible role of reactive nitrogen intermediate in leucocyte mediate sperm dysfunction. *Am J Reprod Immunol* 1992; 27(1-2):89-92.
  14. Dehpour AR, Seyyedi A, Rastegar H, Namirania K, Moezi L, Sadeghipour H, et al. The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated Rats. *Eur J Pharmacol* 2002;445:31-36.
  15. Bradford AK, Stanczyk FZ, Sokol RZ. Serum Inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertility and Sterility* 2000; 74(2):234-38.
  16. Seed J, Chapin RE. Methodes for assessing sperm motility, morphology and counts in the rat, rabbit and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology* 1990;10(3):237-244.

می دهد که کلستاز انسدادی حاد باعث کاهش هورمونهای گنادوتروپین می شود و این کاهش شاید بخاطر افزایش تون اوپیوئیدها، نیتریک اکساید و یا رادیکال های آزاد دیگر در موش های کلستاتیک باشد. کلستاز انسدادی حاد تأثیری معنی داری بر موتیلیتی، مورفولوژی و تعداد اسپرمهای موش های صحرائی ندارد. لذا بنظر می رسد که فاکتورهای افزایش یافته در جریان کلستاز، علی رغم کاهش دادن هورمون های گنادوتروپینی نتوانسته اند منجر به تغییرات پارامترهای اسپرم گردد. بنابراین بنظر میرسد که وجود اختلال در محور هورمونی هیپوفیز - بیضه ای به تنهایی نمی تواند عامل ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم گردد. احتمالاً فاکتورهای دیگری که هنوز ناشناخته اند همراه با اختلال هورمونی روی پارامترهای اسپرم تاثیر دارند. بررسی های آینده در مورد شناخت عوامل دیگر فاکتورهای بقاء سلول های زاینده در جریان کلستاز انسدادی می تواند دانش ما را در مورد تظاهرات کلستاز کامل تر کند.

#### منابع :

1. Nahavandi A, Dehpour AR, Mani A, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini AR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol* 2001; 411:135-41.
2. Dehpour R, Seyyedi A, Rastegar H, Namirania K, Moezi L, Sadeghipour H, et al. The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated Rats. *Eur J Pharmacol* 2002;445:31-36.
3. Narimani K, Samini M, Ejtemaei Mehr S, Gaskari SA, Rastegar H, Homayoun H, et al. Mesenteric Vascular bed responsiveness in bile duct-ligated Rats: roles of opioid and nitric oxide systems. *Eur J Pharmacol* 2001; 423:185-93.
4. Zietz B, Wengler I, Messmann H, Lock G, Schomerich J, Straub RH. Early shifts of adrenal steroid synthesis before and after relief of short-term cholestasis. *J Hepatol* 2001; 35:329-337.
5. Mossad AM, Abou-seif , Abd-Allah Y. Oxidative stress and male IGF-1, gonadotropin and related hormones in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(7):618-623.
6. Cicero TJ. Effects of exogenous and endogenous opiates on the hypotha

17. Gaku I, Xiaozhang Yu, Junjoh K. Reproductive toxicity of 1-Bromopropane a newly introduced alternative to ozone layer depleting solvents in male rats. *Toxicolo Sci* 2000; 54:416-423.
18. Cicero TJ, Meyer ER, Wiest WG. Effects of chronic morphine administration on the reproductive system of male rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 192(3):542-8.
19. Cicero TJ, Bell RD, Meryer ER. Narcotic and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: acute androgen dependent systems. *J Pharmacol Exp Ther* 1977;201(1):76-83.
20. Marinella R, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decrease sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod* 1995;10(7):1786-90.
21. Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidgenesis. *Endocrinology* 1996; 137(12):5337-43.
22. Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(11): 873-8.