مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۱۰، شماره۱، بهار ۱۳۸۶، ۳۵ – ۲۵
تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۷- تاریخ پذیرش: ۸۶/۵/٤

مطالعه اثر هایپرویتامینوز A و تغییرات بافت شناسی بیضه در موش کوچک

*[۱] دکتر احمد مظفری جوین، [۲] دکتر کاظم پریور، [۳] سینا مظفری جوین

چکیده

هدف

در بدن انسان و موش روش های هیستولوژیکی برای ویتامین A، الگوی توزیع بافتی مشابهی را نشان می دهند. بنابراین به منظور پی بردن به اثر ویتامین درمانی A با دوزهای بالا، بر باروری جنسی نر و شناخت تاثیر هایپرویتامینوز A بر گناد نر پستانداران، این مطالعه انجام شد.

مواد و روش کار

دراین مطالعه ۴۸ موش نر کوچک آزمایشگاهی بالغ و هم سن (۳ ± ۶۰ روزه) و تقریباً هم وزن (۲/۱۱ ±۳۹/۲۵گرم)، به طور تصادفی در ۳ گروه ۱۶تایی، تقسیم شدند: ۱) گروه تجربی (E_V) شامل ۱۶ موش نر که به مدت ۷ روز، روزانه ^{Iu}۲۵۰۰۰ ویتامین A تزریق داخل عضلانی شدند. پس از آخرین تزریق به فاصله های ۲، ۴ و ۸ روز هر بار ۴ موش تشریح شده و بیضه های آن ها خارج شدند. سپس ابعاد، وزن و قوام بافتی آن ها اندازه گیری شد و برای مطالعه بافت شناشی، بیضه ها مراحل آماده سازی و مقطع گیری را طی می کردند. برای هر موش گسترش مایع محتوی اسپرمی اپیدیدیم ها نیز تهیه شد و مورد مشاهده و بررسی قرارگرفتند. ۴ موش نر نیز بعد ازروز هشتم به قفس موش های ماده هم سن انتقال یافتند و تشکیل پلاک واژینال در ماده ها مورد بررسی قرار گرفت. ۲) گروه شاهد اول (S_V) به مدت ۷ روز، حجم معادل (۰/۵ میلی لیتر) سرم فیزیولوژیک، به طریق تزریق داخل عضلانی دریافت کردند و مشابه گروه تجربی (E_V) بررسی شدند. ۳)گروه شاهد دوم (S_P) به مدت۷ روز، حجم معادل (۰/۵ میلی لیتر) محلول اسید پا لمیتیک به طریق تزریق داخل عضلانی دریافت کردند و مشابه گروه تجربی (E_V) بررسی شدند.

نتایج

نتایج بر اساس آزمون آماری ویلکاکسون (Wilcoxon) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد وزن بیضه در گروه (E_V) کاهش یافته بود ($p \leq ۰/۰۰۲$). حجم بیضه نیز در گروه تجربی کاهش نشان داد ($p \leq ۰/۰۳$). به علاوه قوام بافتی بیضه ها در گروه تجربی کاهش معنی داری نشان داد ($p \leq ۰/۰۰۱$). بررسی بافت شناسی بیضه نیز نشان دهنده تضعیف شدید بافت همبندی در تونیکاآلبوژینه و تونیکاواسکولوزا بود. سلول های لیدیگ و لوله های اسپرم ساز، تحلیل قابل توجهی داشتند و به روند اسپرماتوژنز آسیب جدی وارد شده بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده که هایپرویتامینوز A، با تاثیرات شدید غشایی بر روند تمایزسلولی و احتمالاً فیدبک های هورمونی، موجب تحلیل سلول های اسپرم ساز و سلول های مولد هورمون شده بود، پیشنهاد می شود تجویز مقادیر زیاد ویتامین A به مردان و نیز اختلال در اسپرم زایی تا مدتی پس از پایان درمان، مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: هایپرویتامینوزA، آسیب شناسی، گناد.

---

۱ – گروه علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار، سبزوار، ایران
*مسئول مکاتبات: نمابر ۸۸۱۲٤۱٤– ۰۵۱۱، تلفن: ۰۹۱۵۳۱٦۰٤۳۸، amj2003@noavar.com
۲– گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
۳– پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فنّاوری زیستی ، تهران، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ویتامین A در درمان برخی از بیماری ها کاربرد قابل توجهی دارد. به عنوان مثال برای درمان بیماری داریه که نوعی بیماری هیپرکراتونیک ارثی (اتوزومال غالب) پوست است. در چندین گزارش، بیماران مردانی بودند که با دریافت روزانه ^{Iu}۱۰۰۰۰۰۰ویتامین A به مدت ۱۴ روز درمان شده بودند (۱). برای درمان ایکتیوزیس روزانه ^{Iu} ۴۰۰۰۰۰ واحد، طی۴۰ روز و برای درمان آکنه روزانه ^{Iu} ۱۰۰۰۰۰ واحد، گاه به مدت شش ماه و در درمان زن هایی که دارای تنش های پیش قاعدگی هستند، طی نیمه دوم دوره جنسی روزانه ^{Iu} ۲۰۰۰۰۰ واحد ویتامین تجویز می شود(۱ – ۴). در بالغین دریافت روزانه ^{Iu} ۲۰۰۰۰ واحد برای دوره های طولانی، بی خطر در نظر گرفته می شود؛ همچنین دریافت روزانه ^{Iu} ۳۰۰۰۰ واحد برای مادران از نظر تراتولوژی، خطری ندارد (۵).در زنان یائسه با دریافت روزانه۳۰۰۰ میکروگرم معادل رتینول، هایپرویتامینوزA بروز می کند (۶). با توجه به موارد مذکور و نیز اهمیت ویتامین A به عنوان یک ماده دخیل در تمایز سلولی، رشد و نمو طبیعی و غیرطبیعی جنین. بر آن شدیم که اثر ویتامین درمانی A را بر گناد نر و اسپرم زایی پستانداران بررسی کنیم (۷).

جذب روده ای به نمک های صفراوی و آنزیم های پانکراسی وابسته است. ویتامین توسط کبد ذخیره می شود، سطح ویتامین A ذخیره شده و شکل ذخیره ای آن به ترکیب اسیدهای چرب رژیم غذایی بستگی کاملی دارد (۸). اسیدهای با زنجیره بلند مانند پالمیتین، ذخیره را افزایش می دهند، ولی اسیدهای با زنجیره کوتاه، مانند اولئین و لینولئین ذخیره را کاهش می دهند (۹).

عوامل متعددی متابولیسم و نیازمندی به ویتامین A را تحت تاثیر قرار می دهد که عبارتند از: ۱) سن؛ طی رشد سریع، نیاز به این ویتامین بالاست و در مرحله اندام زایی جنین، این نیاز حیاتی است. ۲) حالات فیزیولوژیکی مانند حاملگی و شیردهی. ۳) طرح آنزیماتیک وراثت. ۴) حالات پاتولوژیک؛ هیپرتیروئیدیسم، تب ها، دیابت، بهبودی بعد از جراحی، سوء تغذیه پروتئینی و لیپیدی، ابتلا به انگل های روده ای، بیماری های گوارشی، تغییرات شدید حرارت، تشعشعات یون ساز، اعتیاد، آسیب های مکانیکی و الکتریکی، خون ریزی، استرس های روانی و تغییر در فلور میکروبی روده، نیازمندی را افزایش می دهد (۱۰). نیاز انسان برای اطفال زیر ۴ سال روزانه^{Iu} ۲۰۰۰ واحد (۱۱) و برای بالغین روزانه حدود ^{Iu} ۱۰۰۰۰ واحد ویتامین A برآورده شده است. نیازموش ^{Iu} ۱۰۰ ویتامین است.

کاروتن ها مهم ترین پیش سازهای ویتامین A هستند (۱۳،۱۲)، ولی باید توجه کرد که هیچ یک از مهره داران توانایی بیوسنتز کاروتنوئیدها را ندارند. حضوراشکال مختلف ویتامین A و پرووِیتامین های آن در بدن موجودات زنده از پروکاریوت ها تا پستانداران، نشان دهنده نقش مهم این ترکیبات در تنظیم فعالیت های حیاتی است. از جمله اعمال فیزیولوژیک این ویتامین به این موارد می توان اشاره کرد؛ ویتامین A به عنوان یک بخش اینتگرالی غشاءهای پلاسمایی و اندامک های درون سلولی حضور دارد (۱۰) و بر ویسکوزیته غشاء و انتقال متابولیت ها از آن و فعالیت آنزیم های غشایی مؤثراست. اثر ویتامین A بر ترکیب و متیلاسیون فسفولیپیدهای غشایی نیز باعث تنظیم عبور سیگنال های هورمونی از غشای پلاسمایی و غشای هسته ای می شود (۱۴ – ۱۶).

به علاوه ویتامین A در بیوسنتز کلسترول نقش مهمی دارد و در کمبود ویتامین تبدیل موالونیک اسید به کلسترول متوقف می شود. از طرفی نسبت کلسترول به فسفولیپیدهای غشایی باعث تغییر سیالیت غشایی می شود. افزایش این نسبت نیز ویسکوزیته غشایی را افزایش داده و احتمال پارگی غشاء را بالا می برد. از جمله نتایج این آسیب غشایی باید به آسیب سلول های اندوتلیوم عروقی و مشکل خون رسانی به بافت ها

Archive of SID

www.SID.ir

اشاره کرد. از طرف دیگر کلسترول پیش ساز هورمون های استروئیدی از جمله هورمون های جنسی است (۱۷) که برای رشد و فعالیت طبیعی بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز ضروری است (۱۹،۱۸). این ویتامین در سنتز کلاژن ها و سلامت بافت پیوندی و تیغه پایه ی پوششی نیز موثر است (۲۰). در حالت طبیعی و پاتولوژیکی، در تکثیر و تمایز سلولی نقش مهمی دارد. به عنوان مثال موجب تمایز سلول های نابالغ بدخیم توموری شده و از تزاید پاتولوژیک آنها جلوگیری می کند (۲۱). در تاثیر بر تمایز سلول های سیستم ایمنی، با فاکتور شبه گاما اینترفرون به طور هم کوش عمل می کند، تعداد منوسیت ها و فعالیت شیمیوتاکسی آن ها، تعداد ماکروفاژها و میلوئید ها را افزایش می دهد (۲۲) و نیز مانع تشکیل رادیکال های آزاد می شود (۲۳). با کاهش ائوزینوفیل ها از ضایعات خود ایمنی جلوگیری می کند. انتقال HIV از مادر به جنین کاهش می دهد (۲۴،۱۵). در تولید کلاژن و ترمیم زخم ها و رشد بافت همبند نقش دارد (۲۰). در تمایز اسپرماتوگونی تیپ A موثر است و همراه شدن FSH این اثر را تشدید می کند (۲۵،۱۹).

این ویتامین، موجب تشدید فعالیت سلول های لیدیگ می شود و نیمه عمر اسپرماتوسیت و بیان mRNA هیستون های اختصاصی بیضه را افزایش داده و درصد آپوپتوز سلول های زاینده را کاهش می دهد (۲۶). در کمبود ویتامین A لوله های اسپرم ساز به تحلیل رفته و فقط دارای اسپرماتوگونی تیپ A_1 و تعداد کمی اسپرماتوسیت های پرلپتوتنیک متوقف شده در G_2 هستند (۲۷).

ویتامین A، در شکل زایی جنین که بر اساس گرادیان غلظت رتینوئیک اسید در جوانه های اندامی و تراکم های مختلف و نوع گیرنده های آن می شود، مؤثر است (۱۵، ۲۸، ۲۹). همچنین با فعال کردن ژن لامینین و آنزیم تحلیل برنده ماتریکس، امکان مهاجرت سلول ها و دوباره سازمان یافتگی آنها را فراهم می کند. در متابولیسم پروتئین های کبدی و گلیکونئوژنز (۳۰)، از جمله متابولیسم پروتئین های ناقل پلاسمایی عناصری مانند مس، روی، آهن و ید که به طور عمده در کبد ذخیره می شوند، همچنین بر فعالیت گروهی از آنزیم های کبدی موثر است (۳۱، ۳۲). نقش ویتامین A در تولید هورمون ها و تاثیر آن بر ویژگی های غشاء سلول های هدف، از جمله افزایش نفوذپذیری غشا برای کلسیم، مهم است (۱۰). توانایی پاسخ قشر آدرنال به ACTH کاملاً به میزان ویتامین A مربوط است. این ویتامین با عملکرد هورمون رشد نیز در ارتباط است. برای وارد شدن گوگرد به استرهای گوگردی طبیعی مانند کندرواتین سولفات، هیالورونیک اسید قرنیه و استروئید سولفات ها و نیز برای سنتز فعال کننده آدنوزین ـ ۳ـ فسفات ـ ۵ـ فسفوسولفات و برای تولید TSH و انسولین، ویتامین A لازم است. البته برای تبدیل کاروتن به ویتامین A نیز حضور تیروکسین و انسولین ضروری است.

برای سنتز گلیکوکورتیکوئیدها در قشر آدرنال وجود این ویتامین ضروری است. برای تولید و رشد طبیعی بافت استخوانی هم لازم است (۳۳، ۳۴). نقش ویتامین A در بینایی و ترشح اشک، در سلامت مخاط بویایی و چشایی، ممانعت از متاپلازی و کراتینی شدن پوست و مخاط ها، قرنیه و ملتحمه چشمی، مثانه، میزراه و لگنچه کلیوی چشمگیر است (۳۶،۳۵).

با کمبود این ویتامین سلول های گابلت از بین می روند و سلول های اپی تلیالی افزایش می یابند (۳۷).

مواد و روش کار

حیوان: در این تحقیق از موش های نر سفید کوچک، نژاد استرالیایی تقریباً هم سن (۳±۶۰ روزه) و تقریباً هم وزن (۲/۱۱±۳۹/۲۵ گرم) استفاده شده که در شرایط محیطی کنترل شده نگهداری و با استفاده از پلت های آماده تغذیه شدند. موش ها به طور تصادفی در ۳ گروه ۱۶ تایی (۱ گروه تجربی و ۲ گروه شاهد) در قفس های جدا قرار گرفتند.

روش تحقیق: موش های نر بالغ به ۳ گروه تجربی و شاهد تقسیم شدند و طبق جدول (۱) ویتامین A، یا سرم فیزیولوژیک

Archive of SID

www.SID.ir

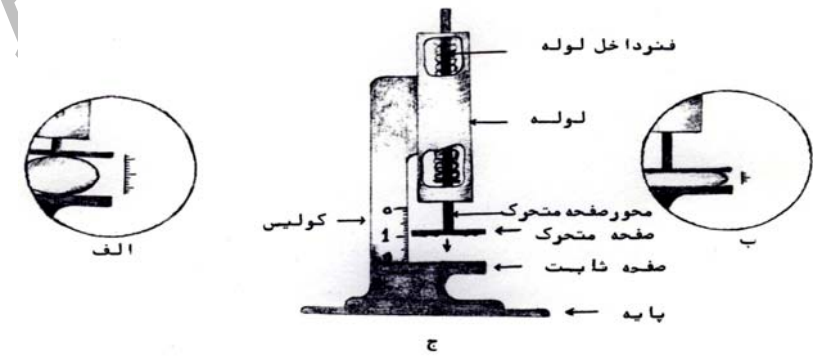
و یا پالمیتات به آن ها تزریق شد و سپس مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱: روش تیمار موش های گروه تجربی و شاهد.

گروه ها	تعداد موش	مشخصات تزریق روزانه			بررسی پایانی
		روش	مقدار ماده	مدت	
گروه تجربی E_v	۱۶	داخل عضلانی	۲۵۰۰۰ Iu واحد ویتامین A (۰/۵ میلی لیتر)	۷ روز	به فاصله۲، ٤ و۸ روز پس از آخرین تزریق، هر بار ٤ موش ذبح و بیضه ها را خارج کردیم. پس از اندازه گیری قطر کرچک،قطر بزرگ، وزن و قوام بافتی بیضه با ابزارهای دقیق،مراحل آماده سازی برای بررسی بافتی طی شد. هر بار از اپیدیدیم نیز برای مشاهده اسپرم ها استفاده شد. ٤موش نیز از روز هشتم به قفس موش های ماده انتقال یافتند.
گروه شاهد اول S_v	۱۶	داخل عضلانی	۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک	۷ روز	به عنوان شاهد مشابه به گروه تجربی عمل شد.
گروه شاهد دوم S_p	۱۶	داخل عضلانی	۰/۵میلی لیتر محلول اسید پالمیتیک	۷روز	به عنوان شاهد دیگر، مشابه گروه تجربی (E_V) عمل شد.

برای تزریق ویتامین A، از ویال های ۱ mL رتینول پالمیتات تولید شرکت مرک آلمان استفاده شدکه در شرایط استریل توسط سرنگ یک بار مصرف ۱ mL با سوزن ۲۵، روزانه ۰/۵ mL تزریق شد. این حجم از ماده دارای ۲۵۰۰۰ Iu ویتامین A (رتینول) می باشد. تزریق هر روز در زمان های مشابه انجام می شد. در طول مدت بررسی، مشاهدات ظاهری و رفتاری موش ها را یادداشت کرده و پس از ذبح و تشریح، احشای شکمی نیز بررسی می شدند. البته در این تجربه سطح سرمی ویتامین طی دوره تزریق، بررسی نشد. برای بررسی جفت گیری، ۴ موش نر از گروه تجربی (E_V)، از روز هشتم به قفس موش های ماده بالغ هم سن، منتقل شدند (هر قفس ۱ نر و ۳ ماده) و به مدت ۱۰ روز در فواصل ۱±۷ ساعته از نظر تشکیل پلاک واژینال معاینه شدند.

برای بررسی اسپرم ها، هربار اپیدیدیم جانور را خارج و در ۰/۵ mL سرم فیزیولوژیک با قیچی قطعه قطعه کرده و پس از جمع آوری بافت های اضافی، توسط میکروسکوپ نوری مشاهده مستقیم انجام شد. همچنین از محیط اسپرمی گسترش تهیه شد که برخی با فوشین و بعضی با آکریدین نارنجی رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری معمولی یا UV بررسی شدند. برای اندازه گیری قوام بافتی بیضه از دستگاه قوام سنج دست ساخت شخصی شکل ۱ استفاده شد. قطر بیضه ها به کمک کولیس ورنیه و وزن آن ها با ترازوی حساس اندازه گیری شدند. قوام بیضه بر اساس درصد کاهش قطر کوچک آن در مقابل فشار ثابت دستگاه، اندازه گیری شد.



شکل ۱: دستگاه اندازه گیری قوام بافتی بیضه (ج)، حالت اول بیضه را روی صفحه ثابت دستگاه نشان می دهد و صفحه متحرک در تماس با بیضه نگهداری شده که قطر بیضه را نشان می دهد (الف)، حالت دوم پس از رها کردن صفحه متحرک، میزان جابجایی، نشان دهنده مقاومت بافتی بیضه است (ب).

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

مشاهدات در طول تحقیق نشان داد که در گروه تجربی حساسیت به تغییر ناگهانی نور در محیط افزایش یافته بود و دو مورد کوری کامل نیز مشاهده شد. در دو مورد، کاهش شدید وزن و لاغری مفرط همراه با تحلیل رفتگی شدید روده، معده و کبد دیده شد و در یک مورد نیز تحلیل رفتگی کامل یک بیضه و بزرگ شدن مختصر بیضه دیگر مشاهده شد. کاهش استحکام غشای آلبوژینه و قوام بافتی کلی بیضه در تمام موش های گروه تجربی دیده شد. زبر و خشن شدن موها، در یک مورد ضخیم و کراتینی شدن پوست و در دو مورد خونریزی شدید داخلی مشاهده شد.

در گروه تجربی، پلاک های وسیع چربی در صفاق و اطراف طحال، معده، روده ها،کیسه بیضه و کبد دیده شد. در ۵۰٪ موش های گروه تجربی ناهنجاری های کبدی از جمله تشکیل گرانول های لیپیدی منتشر و یا منفرد غشادار با قطر ۷/۸ × ۵/۸ میلی متر و گاه با وزن ۰/۱۹ گرم مشاهده شد. در ۶ مورد انسداد مثانه و اتساع آن دیده شد. هیچ یک از تغییرات فوق در گروه های شاهد مشاهده نشد.

در موش های ماده ای که با موش های نر گروه تجربی هم قفس شده بودند، پلاک واژینال مشاهده نشد؛ که نشان دهنده تغییر رفتار جنسی این موش های نر است. در حالی که بود که در گروه های شاهد جفت گیری انجام می شد. نتایج حاصل از مشاهده اسپرم های اپیدیدیم نیز، بدین قرار است: در حالی که در گروه های شاهد اسپرم ها با تعداد طبیعی و فعال دیده می شدند، در گروه تجربی (E_V)، ۲ روز پس از آخرین تزریق، اسپرم زنده بندرت دیده شد و اولیگو اسپرمی به خوبی مشهود بود. از جمله ناهنجاری هایی که در سلول های اسپرمی مشاهده می شد موارد زیر قابل توجه بود: ۱) سیتوپلاسم اضافی در نقاط مختلف قطعه میانی و قسمت ابتدایی قطعه دمی. ۲) پیچ خوردگی متعدد در قسمت های مختلف قطعه میانی و دمی. ۳) دو بخشی شدن تاژه در طول قطعه میانی. ۴) غیر طبیعی بودن آکروزوم.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات وزن بیضه در جدول ۲ نشان داده شده است. درگروه تجربی، کاهش وزن بیضه کاملاً آشکار بود ($p \leq ۰/۰۰۲$). تغییرات حجم بیضه (جدول۳) نیز با تغییرات وزن بیضه هماهنگی داشت. محاسبه حجم بیضه در تمام موارد بر اساس چرخش آن، حول محور قطر کوچک بیضه انجام شده است. نتایج حاصل از بررسی قوام بافتی بیضه نیز در جدول ۴ آورده شده است که نشان دهنده کاهش معنی دار آن در گروه تجربی است ($p \leq ۰/۰۰۱$).

جدول ۲: اثرات تزریق داخل عضلانی ویتامین A بر تغییرات وزن (mg) بیضه موش در زمان های مختلف.

گروه و تفسیر	زمان ها بر حسب روزهای پس از آخرین تزریق		
	۲	٤	۸
شاهد ۱ (S_V)	۷۵ ± ۳	۱۰۱ ± ۱	۱۰۶ ±٤
تجربی (E_V)	۵۰ ± ۳	۷۲ ± ۳	۷۵ ±۲
تفسیر	$p \leq ۰/۰۰۲$	$p \leq ۰/۰۰۱$	$p \leq ۰/۰۰۱$
شاهد ۲ (دریافت کننده اسید پالمیتیک) (S_P)	۸۰ ± ٤	۱۰۶ ± ۳	۱۰۸ ±۲
تفسیر	N.S.	N.S	N.S

(X±SEM).Wilcox on test
N.S: Not Significant

جدول ۳: اثرات تزریق داخل عضلانی ویتامین A بر تغییرات حجم (mm^3) بیضه موش در زمان های مختلف.

گروه و تفسیر	زمان ها بر حسب روزهای پس از آخرین تزریق		
	۲	٤	۸
شاهد ۱ (S_V)	۸٤/۷ ± ۳/۷	۱۲۰/۱ ± ۵/۸	۱۲۳/۳ ±۲
تجربی (E_V)	۷۳/۰۵ ± ٤/۸	۷۸/۲۵ ± ۵/۷	۸۰/۱ ±۳
تفسیر	$p \leq ۰/۰۳۲$	$p \leq ۰/۰۰۱$	$p \leq ۰/۰۰۱$
شاهد ۲ (دریافت کننده اسید پالمیتیک) (S_P)	۸۵/۱ ± ٤	۱۲۰/۵ ± ۳/۵	۱۲٤/۰۱ ±۲
تفسیر	N.S.	N.S	N.S

(X±SEM).Wilcox on test
N.S: Not Significant

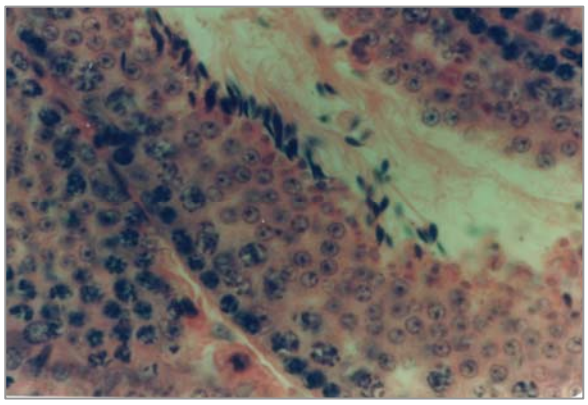
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ٤: اثرات تزریق داخل عضلانی ویتامین A بر تغییرات قوام بافتی بیضه موش در زمان های مختلف، بر اساس درصد کاهش قطر کوچک بیضه در مقابل فشار ثابت دستگاه.

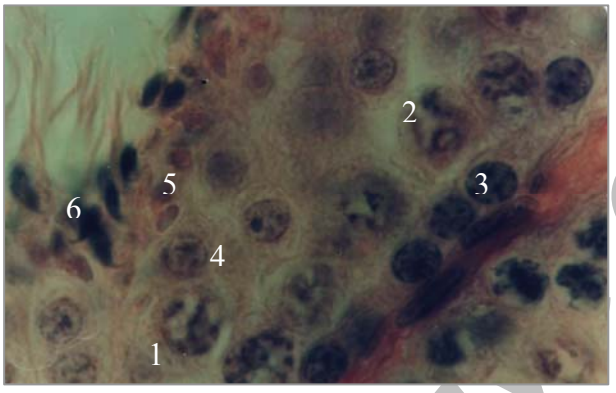
گروه و تفسیر	زمان ها بر حسب روزهای پس از آخرین تزریق		
	۲	٤	۸
شاهد۱ (S_v)	۵۳/۵ ± ۵/٦	۵۹/۳ ± ۱	۵۸/۷ ±۱
تجربی (E_v)	۹۰ ±۲/۱	۷۹/۵ ± ۲/۲	۸۲/۵ ±۲/٤
تفسیر	$p \leq ۰/۰۰۱$	$p \leq ۰/۰۰۱$	$p \leq ۰/۰۰۱$
شاهد۲ (S_P)	۵۵/۱ ± ۵/۲	٦۰/٤ ± ۳	٦۱/۳ ±۲
تفسیر	N.S.	N.S	N.S

(X±SEM).Wilcoxon test - % Reduce in small dimeter of testis, N.S: Not Significant

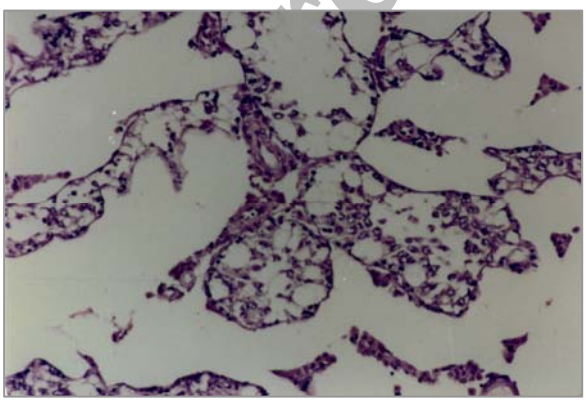
یافته های حاصل از مطالعه مقاطع بافتی بیضه نیز با یافته های دیگر هماهنگی نشان داد. در گروه تجربی، روزهای ۲، ۴ و ۸ پس از آخرین تزریق، آسیب بافتی بیضه بسیار شدید بود (شکلهای ۴ – ۸) که نشان دهنده توقف کامل روند اسپرم زایی بود. اگزوداسیون شدید چربی، واکوئله شدن هسته و سیتوپلاسم، بهم ریختگی و ناهماهنگی طرح هتروکروماتینی هسته ها و بسیار هیپوکرومیک شدن برخی از آن ها و بالاخره ضخیم شدگی اندوتلیوم مویرگ ها و آسیب دیدگی آن ها که احتمالاً می توانسته به ضایعات ایسکمیک منجر شده باشد، قابل مشاهده بود. این آسیب ها در گروه های شاهد (S_p, S_v) مشاهده نشد (اشکال ۹،۳،۲).



شکل ۲: بافت بیضه گروه های شاهد که به طور مشابهی در همه این گروه ها دیده شد. بافت همبند سالم، مجرای لوله ها و نظم و ترتیب سلول های اسپرماتوژن قابل توجه است (بزرگ نمائی، ۱۰۰×).

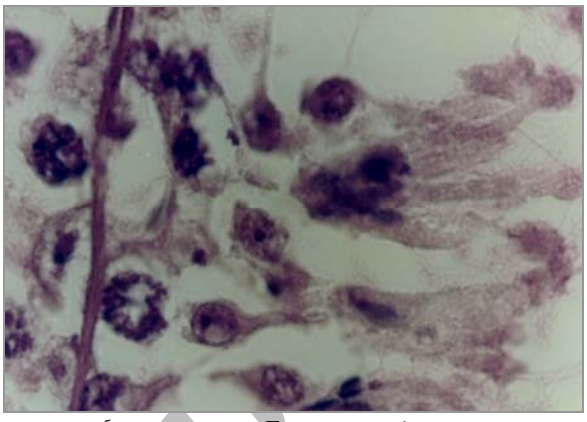


شکل ۳: بافت بیضه از گروه های شاهد که به طور مشا بهی در همه این گروه ها دیده شد (بزرگ نمائی، ۱۰۰×).
۱- سلول های سرتولی، ۲- اسپرماتوسیت اول، ۳- اسپرماتوگونی، ٤- اسپرماتوسیت دوم، ۵- اسپرماتید، ٦- اسپرم

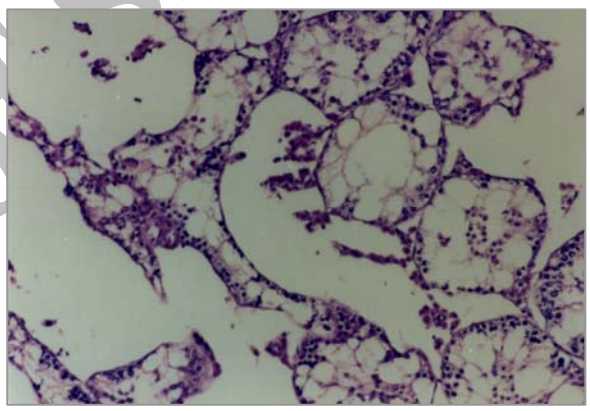


شکل ٤: بافت بیضه گروه تجربی Ev ،۲ روز پس از آخرین تزریق ویتامین A. تحلیل رفتگی شدید لوله ها و بافت همبندی بین آن ها قابل توجه است. تجمعات چربی در لوله ها و ضخیم شدگی جداره مویرگ ها نیز دیده می شود (بزرگ نمائی، ۱۰۰×)

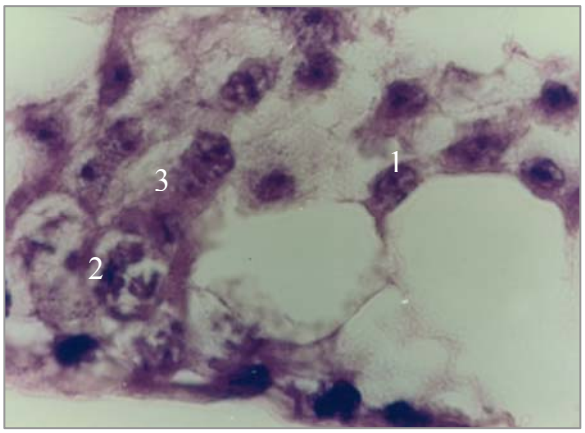
Archive of SID
www.SID.ir



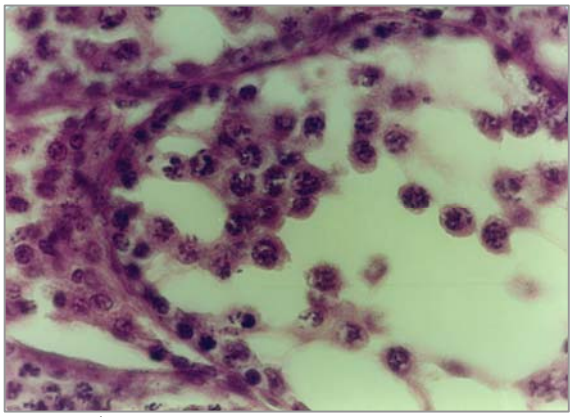
شکل ۵: بافت بیضه گروه تجربی Ev ، ۲ روز پس از آخرین تزریق ویتامین A. تخریب غشای پایه و حالت واکوئله هسته ها مشاهده می شود. ۱- اسپرماتوگونی ۲- سلول ژرم ۳- هسته سرتولی ٤- اسپرم (بزرگ نمائی، ۱۰۰×)



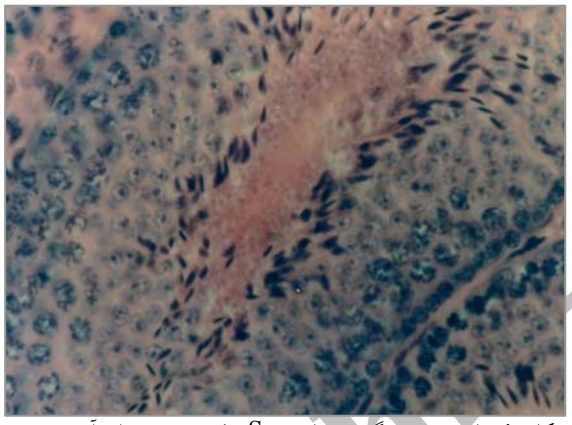
شکل ٦: بافت بیضه گروه تجربی Ev، ٤ روز پس از آخرین تزریق ویتامینA. اپی تلیوم نکروتیک قابل توجه است (بزرگ نمائی، ۱۰۰×)



شکل ۷: بافت بیضه گروه تجربی Ev، ٤ روز پس از آخرین تزریق ویتامین A، آسیب ها شدید است. ۱- هسته سرتولی ۲ - اسپرماتوگونی ۳ - اسپرماتوسیت



شکل ۸: بافت بیضه گروه تجربی Ev ، ۸ روز پس از آخرین تزریق ویتامین A. آسیب ها شدید است (بزرگ نمائی،٤۰۰×).



شکل ۹: بافت بیضه گروه شاهد Sp ،٤ روز پس از آخرین تزریق پالمیتات ونظم طبیعی اپی تلیوم زاینده که مشابه سایر گروه های شاهد است (بزرگ نمائی،٤۰۰×).

بحث و نتیجه گیری

ویتامین A به عنوان یک ماده ی ضروری برای مکانیسم های حیاتی بدن بسیاری از موجودات زنده، به خصوص پستانداران، بسیار مورد توجه بوده است. سال های متمادی در مورد اثرات کمبود این ویتامین در بدن مطالعات زیادی انجام شده؛ ولی در مورد اثرات مسمومیت با آن کم تر مطالعه شده است. با این حال هنوز مکانیسم دقیق عملکرد ویتامین در بافت های مختلف شناخته شده نیست؛ گرچه عملکرد دقیق آن در بینایی به کوشش Wald و Morton کاملا روشن شده است. در

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیق حاضر برای مطالعه ی اثر مسمومیت ویتامین A بر بافت بیضه و اسپرماتوژنز پستانداران، ویتامین A به شکل رتینول پالمیتات و به طریق تزریق داخل عضلانی تجویز شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. البته باید یادآور شد که یک مکانیسم حفاظتی برای جلوگیری از مسمومیت در بدن مطرح شده که سهم عمده ی آن به عهده ی کبد است (۷، ۳۸) ولی تجربیات نشان داده است (۳۵) که اگر دریافت ویتامین A دو هزار برابر حداقل مورد نیاز باشد فقط ۱۰٪ آن در کبد ذخیره می شود، در حالی که وقتی مقدار آن در رژیم غذایی در حد مناسب است، ۹۰٪ آن ابتدا در کبد ذخیره می شود. لذا همچنان که تجربه ی حاضر نیز نشان می دهد این سیستم در مسمومیت حاد کارایی چندانی ندارد. در گروه تجربی، آسیب کبدی در ۵۰٪ موارد دیده شد. البته ذخیره سازی بیش تر کبدی گرچه ممکن است آسیب به این اندام را افزایش دهد ولی احتمالاً موجب کاهش آسیب به بافت های دیگر می شود، زیرا این ذخیره سازی می تواند سطح ویتامین را در سرم تعدیل کند.

ویتامین A برای ساختمان های تولید مثلی و از جمله بیضه یک ماده ی ضروری است (۳۹) و مطالعات متعددی اثر کمبود ویتامین A را بربیضه نشان داده اند (۱۰، ۲۵، ۲۷، ۴۰- ۴۳). لیکن درمطالعه حاضر، تغییرات ایجاد شده در بیضه از جنبه های مختلف، نشان می دهند که هایپرویتامینوز A نیز باعث وارد شدن آسیب های جدی به بیضه و روند اسپرماتوژنز می شود. مراجعه به جدول ۲ نشان می دهدکه وزن بیضه در گروه تجربی کاهش یافته است ($p \leq ۰/۰۰۲$). تغییرات در حجم بیضه نیز این یافته را تایید می کند (جدول۳)، زیرا حجم بیضه در گروه تجربی E_V کاهش نشان می دهد ($p \leq ۰/۰۳$).

بررسی قوام بافتی بیضه (جدول ۴) نیز نشان می دهد که در گروه های تجربی، قوام و استحکام بافتی بیضه کاهش یافته است ($p \leq ۰/۰۰۱$). مشاهدات بافت شناسی بیضه گروه های تجربی (اشکال ۴ تا ۸) در مقایسه با گروه های شاهد (اشکال ۲، ۳ و ۹) نیز این یافته ها را تایید می کند. در مقاطع بافتی، تضعیف پرده ی تونیکا آلبوژینه و بافت همبندی ترابکول های آلبوژینه و تونیکا واسکولوزا به خوبی مشهود است. باید توجه داشت که ویتامین A و به خصوص پیش ساز آن بتاکاروتن با همکاری گلیکوکورتیکوئیدها تولید کلاژن را تحریک می کند (۲۰) و بر اساس پیشنهاد Pierre Chambon گیرنده ی ویتامین A در فعال کردن ژن تولید کننده لامی نین و یک ژن مولد آنزیم تحلیل برنده ماتریکس به احتمال زیاد دخالت دارد (۲۹). لذا تحلیل بافتی و کاهش قوام و استحکام بافتی بیضه ممکن است به علت اختلال در تولید کلاژن و یا فعالیت خارج از محدوده فیزیولوژیک آنزیم تحلیل برنده ماتریکس باشد. به علاوه ممکن است آسیب عروقی، تغییرات نکروتیک و اتولیزی را به دنبال داشته است.

آسیب های وارده به بیضه شبیه آسیب های ناشی از کمبود این ویتامین است. البته دراین تجربه حتی سلول های سرتولی و اسپرماتوگونی ها و سلول های لیدیک نیز که در مقابل کمبود ویتامین مقاومترند، به تحلیل رفته اند. بررسی های قبلی نیز تغییرات این سلول ها را در سطح میکروسکوپ الکترونی نشان داده است (۴۴). ویتامین A به عنوان کوآنزیم موجب فعال شدن آنزیم استروئیدوژنیک (آنزیم تجزیه کننده زنجیره ی جانبی کلسترول و ۳- بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز) بیضه و تخمدان شده، تولید تستوسترون را تحریک می کند (۱۸، ۱۹، ۴۳). در این تجربه نیز احتمالاً تحریک خارج از محدوده فیزیولوژیک بر این نقاط فیزیولوژیک باعث شکست سلول های لیدیک برای ترشح طبیعی تستوسترون شده است. اختلال در تولید این هورمون نیز می تواند دلیل دیگر تخریب اپی تلیوم زاینده ی بیضه باشد.

حضورگیرنده های هسته ای ویتامین A و تنوع گیرنده های آن در غشاء وسیتووزل سلول ها (۱۵، ۲۹) نشان دهنده نقش تمایزی و تزایدی این ویتامین بر سلول های اسپرماتوژنیک است. رتینول همچنین ترشح فاکتور رشد EGF را از سلول های سرتولی تحریک می کند (۴۵) و EGF نیز اثر آنزیم فسفاتاز قلیایی را بر تمایز سلول ها تحت تاثیر قرار می دهد (۴۶) و نیز باعث کاهش گیرنده های HCG در

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرماتوگونی A_1 و مهار پروفازی آن می شود. به علاوه ویتامین A سلول های سرتولی را برای ترشح فاکتور وازواکتیو تحریک می کند که باعث افزایش مایع بینابینی بیضه و فعال شدن اسپرماتوژنز می شود (۴۲). ویتامین A بر فعالیت پاراکرینی اینهیبین (inhibin) و اکتیوین (activin) در بیضه موثر است (۳۹). به این ترتیب سلول های سرتولی و اسپرماتوگونی ها احتمالاً به طور مستقیم نیز نقطه اثر هایپرویتامینوز را تشکیل می دهند. در گروه تجربی، احتمالاً این تاثیرات متقابل موجب اگزوداسیون شدید چربی در لوله های اسپرم ساز و تضعیف تیغه پایه و جدا شدن اپی تلیوم ژرمینال زاینده از آن شده است. در اغلب لوله های اسپرم ساز تعداد اندکی اسپرماتوگونی مشاهده می شود و اسپرماتوسیت ها در مراحل مختلف تحلیل هستند. بررسی اپیدیدیم گروه های تجربی در مقایسه با گروه های شاهد، نشان دهنده تعداد زیادی اسپرم ناهنجار و اولیگواسپرمی در گروه های تجربی است.

مقایسه ی عوارض ناشی از کمبود ویتامین A و عوارض حاصل از مسمومیت با آن در این تجربه، این فکر را در ذهن شکل می دهد که به احتمال زیاد نقطه های اثر مسمومیت اغلب همان نقطه های فیزیولوژیکی هستند که در خارج از محدوده‌ی طبیعی عمل کرده اند. سهم قابل توجهی از علل آسیب های فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی و بافتی نیز، احتمالاً در ارتباط با آسیب به غشاءهای سلولی است. البته شناخت دقیق ساز و کارهای آسیب زایی هایپرویتامینوز A مطالعات بیشتری را می طلبد.

این دلایل بر اختلال در اسپرماتوژنز طبیعی و اختلال تولیدمثلی موش نر(لااقل در طول مدت مورد بررسی) دلالت می کند. همچنین از بین رفتن رفتار تولید مثلی جانور نر و تشکیل نشدن پلاک واژینال در ماده ها نیز این یافته را تایید می کند. البته برخی مطالعات حکایت از آن دارند که اختلال در اسپرم زایی، حدود ۱۲ هفته پس از توقف درمان رو به بهبودی می رود (۴۴). از آن جا که موش ویژگی های فیزیولوژیکی مشابهی را با انسان نشان می دهد و عوارض گزارش شده از کمبود ویتامین A در موش و انسان مشابه است، یافته های این تجربه نیز از نظر پزشکی قابل توجه است. پیشنهاد می شود درمان با دوزهای بالای ویتامین A در جنس مذکر با احتیاط انجام شود و یا تا مدتی پس از پایان دوره درمان، اختلال در اسپرم زایی مورد توجه قرار گیرد.

Archive of SID

References

۱. اصلیان، علی. درمان بیماری داریه به وسیله دُز بالای ویتامین A، نهمین کنگره فیزیولوژی فارماکولوژی ایران، مقاله شماره۲۱۵، ۱۳۶۸.

1. Sebrell WH, Rpbert J, Harris S. Vitamins. Academic press Inc. New York: 1967.
2. Straumford JV. 1943 Vitamin A, its effect on acne. Northwest Med. 42: 212-255.
3. Argonz J, Abinzano C. Premanstrual tension treated with vitamin A. J Clin Endocrinol 1950; 10:1579-89.
4. Hartmann D, Brors O, Bock J, Blomhoff R, Bausch J, Wiegand UW-Hartmann-S. xposure to retinyl esters, retinol, and retinoic acids in non-pregnant women following increasing single and repeated oral doses of vitamin A. Ann Nutr Metab Nutr Metab. 2005; 49(3):155-64.
5. Feskanich D, Colditz GA, Willett WC, Singh V. Vitamin A intake and hip fracture among postmenopausal women. JAMA. 2 2002; 287(1):47-5.

۷. مظفری جوین ، احمد. نقش ویتامین A در رشد و نمو جنین، ناظر کاظم پریور، نشر جهانکده، ۱۳۸۰.

8. Ribaya-Mercado JD, Solon FS, Fermin LS, Perfecto CS, Solon JA, Dolnikowski GG. Dietary vitamin A intakes of Filipino elders with adequate or low liver vitamin A concentrations as assessed by the deuterated-retinol-dilution method: implications for dietary requirements.Am J Clin Nutr. Apr; 2004; 79(4):633-41.
9. Furr H, Andrew C, Cliffoid J. The effect of dietary fatty acid composition on liver Vitamin-A ester composition in the rat. 1989; Am Inst of nutr.
10. Jennings IW. Vitamins in endocrine metabolism. University of Cambridge; 1970.

www.SID.ir

11. Arab AE, Khalil F, Hussein L. Vitamin A deficiency among preschool children in a rural area of Egypt: the results of dietary assessment and biochemical assay. Int J Food Sci Nutr. 2002; 53(6): 465-74.

۱۲. شهبازی ، پروین . ناصر، ملک نیا . بیوشیمی عمومی ، جلد۲، انتشارات دانشگاه تهران ،چاپ هفتم، ۱۳۶۴.

13. West CE, Eilander A, Lieshout MV. Consequences of Revised Estimates of Carotenoid Bioefficacy for Dietary Control of Vitamin A Deficiency in Developing Countries. J Nutr 2002; 132:2920S-2926S.

14. Srivastava R. Interaction of ethanol, cholestrol and Vitamin A. on phospholipids methylation in hepatic microsomes of rats.' Int J Nutr Res 60, 1990; 236, 239.

15. Véronique Azaïs-Braesco, Gérard Pascal. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. American Journal of Clinical Nutrition. 2000; 71 (5): 1325-1333.

16. Zanardi S, Serrano D, Argusti A, Barile M, Puntoni M, Decensi A,Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention.Endocrine-Related Cancer, 2006; 13(1): 51-68.

۱۷. عریان، شهربانو. میرزاحسینی ، شاهرخ. مظفری جوین، احمد. تولید مثل از دیدگاه های پزشکی وبیولوژی، جهاد دانشگاهی، تهران، ۱۳۷۳.

18. Sadek IA, M H Abdul-Mohsen. Long-term administration of vitamin A and the process of spermatogenesis. East Medit Health J1999; 5: 123-129.

19. Bartlett JM, Weinbauer GF, Nieschlag E. Stability of spermatogenic synchronization achieved by depletion and restoration of vitamin A in rats. Biol Repord 1990; 42(4): 603-12.

20. Wahid A, Gerdee LE. Influenc of beta carotene consumption prior to surgery upon the healing of rat skin Wounads. Nutri Rep Inter 1989; 40: No.2.

21. Garolla A, Ferlin A, Vinanzi C, Roverato A, Sotti G, Artibani W, Foresta C. Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. Endocrine-Related Cancer 2005; 12 (3): 645-655.

22. Mehta K. Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes by intracellular delivery of retinoids. J leuk Boil 1987; 41: 341.

23. Rock E. Winklhofer Roob BM, Ribalta J, Scotter M, Vasson MP, Brtko J. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT).Nutr Metab Cardiovasc Dis 2001; 11 (4 Suppl): 70-3.

24. Eduardo Villamor, Roger Mbise, Donna Spiegelman, Ellen Hertzmark, Maulidi Fataki, Karen E Peterson, Godwin Ndossi, Wafaie W Fawzi, Vitamin A Supplements Ameliorate the Adverse Effect of HIV-1, Malaria, and Diarrheal Infections on Child Growth., PEDIATRICS January, 2002; 109 (1): 6.

25. Vanpelt AM Rooij DG. Role of Vitamin A in differentiation of spermatogonia. J Biol Chem. 1990; 157: 693.

26. Vigier M, Weiss M. Perrard MH. Godet M, Durand P. The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat an in vitro study. J Mol Endocrin 2004; 33: 729-742.

27. Morales CR, Griswold MD. Retinol induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. Endicrinol 1987; 121: 342-434.

28. Maija H Zile. Vitamin A requirement for early cardiovascular morphogenesis specification in the vertebrate embryo. Experiment Biol and Medicine, 2004; 229: 598-606.

29. Hoffman M. The embryo takes its vitamins, fundamental rote of vitamin A in giving shape to the developing mammalian embryo. Science 1990 Oct; (1): 250.

30. John A, Sivakumar B. Effect of vitamin A on nitrogen balance and hepatic urea cycle enzymes and intermediatest in rats.Am Inst of Nutr. 1989.

31. Shannon L Kelleher, Bo Lönnerdal. Zinc Transporters in the Rat Mammary Gland Respond to Marginal Zinc and Vitamin A Intakes during Lactation. J Nutr. 2002; 132: 3280-3285.

32. Sklan D. Halevy O, Donoghue S. The effect of different dietary levels of Vitamin A on metabolism of copper, Iron and zinc in the chick.Int J Vit Nutr Res. 1987; 57: 11-18.

33. Penniston K, Tanumihardjo SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. Am J Clin Nutr Feb; 2006, 83(2): 191-201.

34. Chagin A, Chrysis M, Takigawa E, Ritzen M, Sävendahl L. Locally produced estrogen promotes fetal rat metatarsal bone growth; an effect mediated through increased chondrocyte proliferation and decreased apoptosis. J Endocrinol 2006; 188: 193-203.

35. Fishbein M. The vitamins.American medical association Chicago, 1939.

۳۶. پرفسور استنلی رابینز وهمکاران. پایه آسیب شناسی بیماری ها، ترجمه بهمن رفیعی چالشتری، نشرچهر،۱۹۸۷.

37. Samba C, Galan P. vitamin A deficiency in presckool age children. Inte J Vit Nurt Res. 1990; 60 (3): 915, 223.

38. Leo MA, Ilkin C. Homeostatic control of hepatic Vitamin A. Am Inst of Nutr. 1989.

Archive of SID

www.SID.ir

39. Klaij IA, Van Pelt AM, Timmerman MA, Blok LJ, de Rooij DG, de Jong FH, Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M, Durand P. Expression of inhibin subunit mRNAs and inhibin levels in the testes of rats with stage-synchronized spermatogenesis. J Endocrin 1994; 141(1): 131-141.
40. Ismail N, Morales C, Clermont y. Role of spermatogonia in the stage synchronization of the seminiferous epithelium in Vitamin A deficient rats. AmJ Anat 1990; 188: 57-63.
41. Huang HB, Hembree W. Sprematogenic response to Vitamin A in Vitamin A deficient rats. Biol Repor, 1979; 21: 891-904.
42. Sharpe RM, Bartlett J, Allenby G. Evidence for the control of testicular interstitial fluid volume in the rat by specific germ cell types. J Endocrinol 1990; 128: 359-67.
43. Chaudhary LR, Sstucco DM. An invitro cell model system to study the action of retinoids on leydig cell steroidogenesis. Biochem Inte Communication J 1990; 21 (6): 1033-1042.
44. Sadek IA, Abdul-Mohsen MH. Long term administration of vitamin A and the process of spermatogenesis. East Medit Health J 1999 .5 (1): 123-29.
45. Haneji S, koide S, Nishimune Y. 1991 Differential effect of epidermal growth factor on the differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testis in vitro. J Endocrino 1991; 128,383-388
46. Goascogene CL, Hirai S. Baulieu E. 1987 Induction of germinal vesicle breakdown in xenopus laevis oocytes, synergistic action of progesterone and insulin. J Endocrinol 1987; 101: 7-12.

Archive of SID

www.SID.ir