

دکتر ته‌مین پیری^۱، دکتر غلامحسین فرجاه^۲، دکتر رجبعلی صدرخانلو^۳، دکتر عباس احمدی^۴، فاطمه اتابکی پاسدار^۵، جواد بهکامی^۶

تاریخ دریافت ۸۷/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۸۷/۰۴/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: فرآیند اسپرماتوزن در لوله‌های اسپرم‌ساز کاملاً وابسته به هورمون‌های گنادوتروپین هیپوفیزی است و ترشح هورمون‌های گنادوتروپین تحت کنترل هورمون‌های آزاد کننده هیپوتالاموس می‌باشد. استفاده از آنالوگ‌های GnRH می‌تواند محور هیپوفیزی - گنادی را مختل نماید. هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات آگونیست GnRH روی لوله‌های اسپرم‌ساز در موش‌های صحرایی نابالغ است.

مواد و روش کار: در این مطالعه بیست موش صحرایی بیست و پنج روزه به چهار گروه تقسیم شدند. گروه‌های آزمایش اول و دوم هر کدام به مدت پنج روز ۰/۸ mg/ml آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین دریافت نمودند و به ترتیب در روزهای ۳۰ و ۳۵ تشریح شدند و گروه‌های کنترل نیز بعد از دریافت ۰/۸ ml سرم فیزیولوژیک به مدت پنج روز مانند گروه‌های آزمایش تشریح شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که بین گروه آزمایش اول و گروه‌های کنترل اختلاف معنی داری از نظر قطر لوله‌ها و قطر لومن مشاهده نشده است اما از نظر ضخامت اپیتلیوم و تعداد لایه‌های سلولی لوله‌های اسپرم ساز اختلاف معنی داری مشاهده شد. در گروه آزمایش دوم قطر لوله‌ها و قطر لومن اختلاف معنی داری با دو گروه کنترل نشان نمی‌دهد. اما از نظر ضخامت اپیتلیوم و تعداد لایه‌های سلولی اختلاف بین این گروه و دو گروه کنترل معنی دار است ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان اظهار داشت که آگونیست GnRH (بوسریلین) باعث افزایش لایه‌های سلولی در لوله‌های اسپرم ساز به عبارت دیگر تاثیر مثبت در اسپرماتوزن دارد.

کلید واژه‌ها: اسپرماتوزن، آگونیست GnRH، بوسریلین، موش صحرایی نابالغ

مجله پزشکی ارومیه، سال نوزدهم، شماره دوم، ص ۱۹۸-۱۹۲، پاییز ۱۳۸۷

آدرس مکاتبه: ارومیه، نازلو، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن ۰۴۴۱-۲۷۷۰۹۶۹

E-mail: Tpeiravi@umsu.ac.ir

مقدمه

سیستم پورت وریدی به آندوهیپوفیز منتقل می‌گردد و در آنجا به رسپتورهای سلول‌های گنادوتروپ متصل و باعث رهایی هورمون LH یا ICSH (هورمون محرک سلول‌های بینابینی بیضه) می‌گردد و به دنبال ترشح ICSH و اتصال آن به رسپتورهای سلول‌های بینابینی تستوسترون ترشح می‌گردد. تستوسترون برای حفظ اسپرماتوزن طبیعی و باروری لازم است و در فقدان آن سلول‌های ژرمینال لوله‌ها دژنره می‌گردند (۲). برای اسپرماتوزن غلظت کافی هورمون تستوسترون نیاز است

لوله‌های اسپرم‌ساز را واحد عملکرد بیضه در نظر می‌گیرند (۱). عمل لوله‌های اسپرم ساز انجام اسپرماتوزن طی یک روند پیچیده است. اسپرماتوزن در بیضه به محرک‌های خارج بیضه‌ای نیاز دارد. گنادوتروپین‌ها (FSH, LH) مهم‌ترین هورمون‌هایی هستند که اسپرماتوزن را آغاز و حفظ می‌نمایند (۱). ترشح گنادوتروپین‌ها تحت کنترل هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) می‌باشد. GnRH که LHRH هم نامیده می‌شود پس از ترشح از سلول‌های عصبی هیپوتالاموس به برجستگی میانی هیپوفیز آزاد و توسط

^۱ استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه

^۳ استاد بافت و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۴ رزیدنت علوم تشریح، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۵ www.SID.ir، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه

^۶ کارشناس زیست شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه

Archive of SID

شد. از هر ده مقطع به صورت تصادفی انتخاب و به روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی و توسط میکروسکپ نوری مطالعه شدند (۹). سپس قطر لوله‌ها، ضخامت اپی تلیوم، تعداد لایه‌های سلولی و لومن لوله‌های اسپرم ساز با استفاده عدسی چشمی مدرج (Eyepiece) میکروسکپ نوری اندازه گیری شدند. در هر مقطع ده لوله اسپرم ساز گرد یا نسبتاً گرد در محیط و مرکز مقاطع به صورت تصادفی انتخاب و از نظر قطر، ضخامت اپی تلیوم و تعداد لایه‌های سلولی و لومن بررسی شدند. در اندازه گیری قطر لوله‌ها دو قطر بزرگ و کوچک عمود بر هم اندازه گیری و میانگین آنها بر حسب میکرون ثبت شد. برای به دست آوردن ضخامت اپی تلیوم ابتدا در دو نقطه لوله اپی تلیوم اندازه گیری و میانگین آنها در نظر گرفته شد. جهت دقت بیشتر اقطار بزرگ و کوچک لومن هم اندازه گیری، تا از طریق کسر قطر لومن از قطر لوله ضخامت اپی تلیوم دو طرف به دست آید. برای شمارش تعداد لایه‌های سلولی تعداد هسته‌های سلولی در دو قسمت لوله شمارش و میانگین آنها ثبت شد (۱۰ و ۱۱). داده‌ها با استفاده از نرم افزار spss و روش آماری Independent Samples-Test و Kruskal Wallis Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار تلقی شد.

نتایج

در بررسی هیستولوژیک مقاطع گروه کنترل اول که سرم فیزیولوژیک دریافت نموده بودند و در ۳۰ روزگی تشریح شدند در لوله‌های اسپرم ساز فقط سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی دیده شد (شکل ۱). و در بین لوله‌های اسپرم ساز سلول‌های بینابینی مشاهده نگردید. اما موش‌های گروه کنترل دوم که در ۳۵ روزگی از آنها نمونه تهیه شد در لوله‌های اسپرم ساز آنها علاوه بر سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتید مشاهده گردید در این لوله‌ها اپی تلیوم ژمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بوده و حدود حفره مرکزی لوله‌های اسپرم ساز منظم بود (شکل ۲). یافته‌های مورفومتریک نشان داد که در دو گروه کنترل قطر لوله‌های اسپرم ساز اختلاف معنی داری ندارند اما اختلاف بین ضخامت اپی تلیوم و تعداد لایه‌های سلولی و قطر لومن در دو گروه معنی دار می‌باشد (جدول ۱). در گروه آزمایش اول که آگونیست GnRH به مدت پنج روز دریافت و بلافاصله بعد از اتمام دوره تزریق موش‌ها تشریح شدند در لوله‌های اسپرم ساز سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت‌های در حال تقسیم مشاهده شد و سلول‌های لیدیک در بین لوله‌های اسپرم ساز ظاهر نگردیده است (شکل ۳). بین این گروه و گروه‌های کنترل اختلاف معنی داری از نظر قطر لوله‌ها مشاهده نشده است اما از

و رسپتورهای آن روی سلول‌های بینابینی، سرتولی و سلول‌های اطراف توبولی دیده شده‌اند. مکانیسم هورمونی اسپرماتوژنز به طور کامل فهمیده نشده است. اما اسپرماتوژنز در زمان بلوغ بستگی به عملکرد هیپوتالاموس، هیپوفیز و سلول‌های بینابینی برای تولید تستوسترون در بیضه دارد. معمولاً سه هورمون بیضه به طور مستقیم و غیرمستقیم در اسپرماتوژنز نقش دارند: تستوسترون، استرادیول، اینهبین. هر سه توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌گردند.

بوسریلین یک آگونیست غیرپپتیدی GnRH است. که در کلینیک برای القاء بلوغ و اسپرماتوژنز در مردان با هیپوگنادوتروپیک و هیپوگنادیسم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). معمولاً وقتی دوز پایین و مدت زمان کوتاه، آگونیست GnRH بکار می‌رود، ترشح تستوسترون تحریک می‌گردد اما زمانی که دوز بالا و مدت زمان طولانی باشد اثرش معکوس خواهد شد (۴). هم‌چنین از این دارو در کلینیک جهت درمان سرطان پروستات و سینه استفاده می‌شود (۵). بعلاوه برای به تاخیر انداختن بلوغ در افراد با بلوغ زودرس بکار می‌رود (۶).

در این مطالعه سعی شده است نقش آگونیست GnRH بر روی اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی نابالغ بررسی شود. هدف ما از انتخاب موش صحرایی نابالغ ترشح بسیار کم هورمون GnRH است که در نتیجه با تزریق GnRH در نابالغین هرگونه اتفاقی که در بیضه رخ دهد را می‌توان ناشی از این تزریق دانست (۷).

مواد و روش کار

در این مطالعه از بیست سر موش صحرایی نر نابالغ نژاد ویستار ۲۵ روزه استفاده شد. موش‌های صحرایی در شرایط استاندارد با دسترسی کافی به آب و غذا، دمای مناسب ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. موش‌ها به چهار گروه شامل دو گروه آزمایش ($n=5$) و دو گروه کنترل ($n=5$) تقسیم شدند. به موش‌های صحرایی گروه آزمایش به میزان 0.1 mg/ml آگونیست GnRH (Buserelin) 1 mg/ml (Aventis Pharma. Deutschland GmbH) و گروه کنترل 0.1 میلی لیتر سرم فیزیولوژیک 0.9% (Clearflex, Switzerlandflex) به مدت پنج روز و به صورت زیرجلدی تزریق شد (۸). بلافاصله و پنج روز پس از تزریق موش‌های صحرایی گروه‌های آزمایش و کنترل ابتدا با اتر بیهوش و بیضه آنها خارج شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین 10% در دمای اتاق فیکس شدند. پس از مراحل تهیه بافت (آبگیری، شفاف سازی قالب گیری در پارافین) با استفاده از میکروتوم دوار (Leitz, Germany) از آنها مقاطع ۶ میکرونی تهیه

Archive of SID

است ($p < 0/05$). همچنین گروه آزمایش اول با گروه آزمایش دوم از نظر قطر لوله‌های اسپرم ساز، ضخامت اپی تلیوم، تعداد لایه‌های سلولی و قطر لومن اختلاف معنی داری نشان داد. بعلاوه در داخل لومن لوله‌های اسپرم ساز تعداد زیادی سلول با هسته واکوتله دیده شد و از بین پانزده موش مورد مطالعه در دو مورد موش ۳۵ روزه داخل لومن حدود ۰/۰۹ لوله‌های اسپرم‌ساز دیو سلول‌های با هسته‌های متعدد وجود داشته که در این نوع لوله‌ها ساختار بافتی کلاً تغییر یافته است (شکل ۵ و ۶).

نظر قطر لومن و ضخامت اپیتلیوم و تعداد لایه‌های سلولی لوله‌های اسپرم ساز اختلاف معنی داری مشاهده شد (جدول ۲). در گروه آزمایش دوم که موش‌ها پنج روز بعد از اتمام دوره تزریق تشریح شدند سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتید نیز در لوله‌های اسپرم ساز مشاهده گردید و در بین لوله‌های اسپرم ساز سلول‌های لیدیک قابل بررسی بودند (شکل ۴). در این گروه قطر لوله‌ها اختلاف معنی داری با دو گروه کنترل نشان نمی‌دهد. اما از نظر قطر لومن و ضخامت اپیتلیوم و تعداد لایه‌های سلولی اختلاف بین این گروه و دو گروه کنترل معنی‌دار

جدول شماره (۱): مقایسه دو گروه آزمایش با همدیگر از نظر قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و قطر لومن، ضخامت

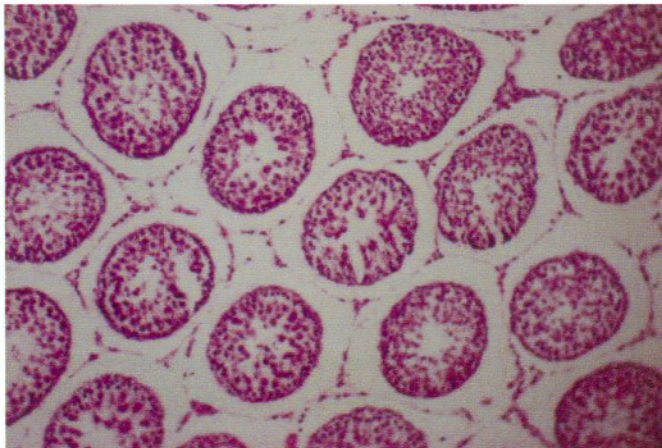
اپی تلیوم و تعداد لایه‌های سلولی از نظر میانگین و Pv, Independent Samples – test.

Pv	آزمایش دوم	آزمایش اول	گروه‌های مورد مطالعه
			شاخص‌های مورد مطالعه
۰/۰۱	۱۵۵/۴۳±۷۷۷	۱۴۳/۴۱±۵/۶۸	قطر لوله
۰/۰۱	۳۹/۰۵±۳/۳۱	۲۵/۴۸±۰/۴۴	قطر لومن
۰/۰۰	۳/۷۲±۰/۳۹	۳/۰۹±۰/۱۴	ضخامت اپی تلیوم
۰/۰۱	۷۲/۵۱±۳/۹۹	۸۵/۲۰±۷/۸۶	تعداد لایه‌های سلولی

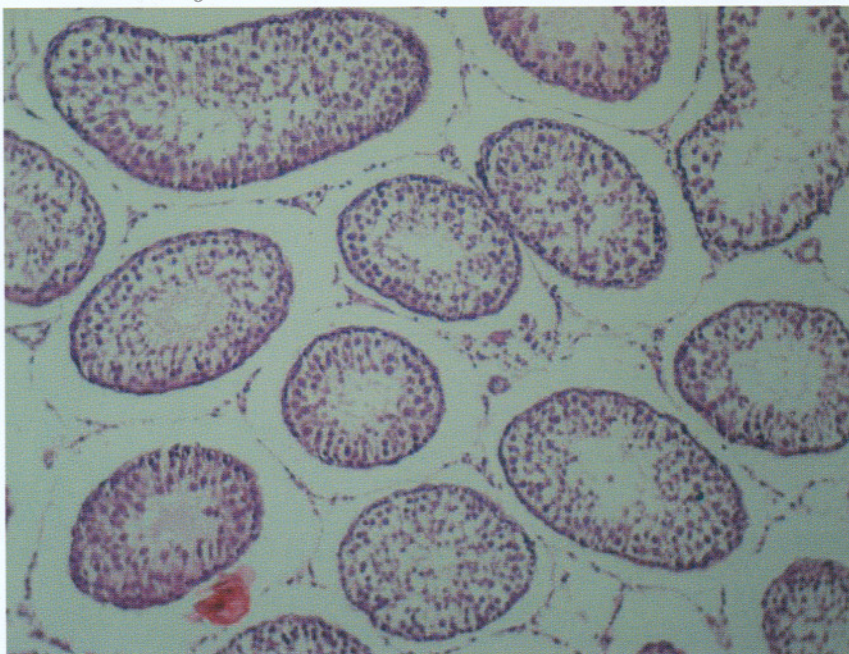
جدول شماره (۲): مقایسه میانگین، Kruskal wallis و Pv قطر لوله‌های اسپرم ساز، ضخامت

اپی تلیوم، تعداد لایه‌های سلولی و قطر لومن در گروه‌های آزمایش و کنترل

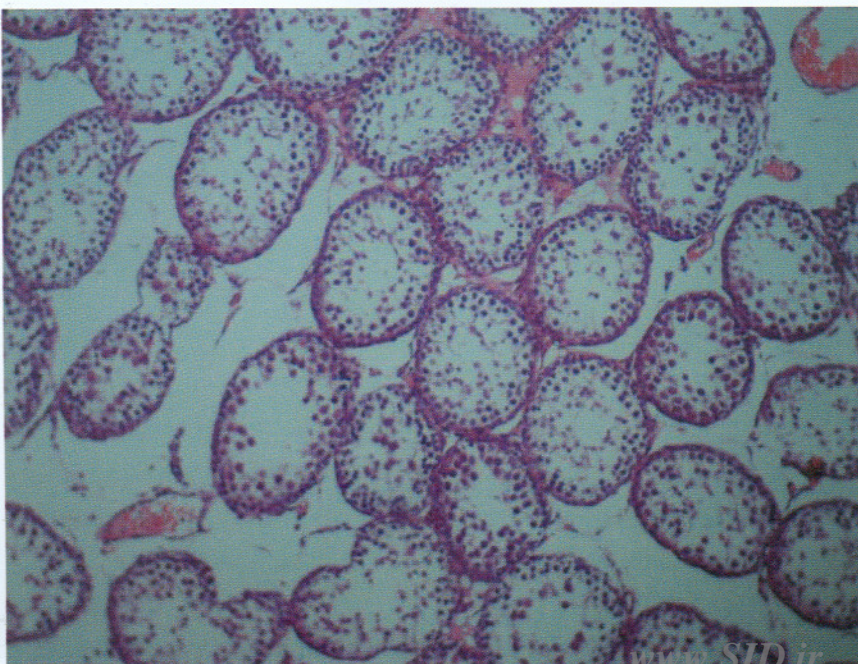
Pv	K-W	گروه کنترل دوم	گروه کنترل اول	گروه آزمایش دوم	گروه آزمایش اول	گروه‌های مورد مطالعه
						شاخص مطالعه Mean± SD
۰/۱۴	۵/۵۴	۱۴۷/۸۵±۲۲/۷۰	۱۳۷/۸۷±۰/۷۴	۱۵۵/۴۳±۶/۷۷	۱۴۳/۴۱±۵/۶۸	قطر لوله
۰/۰۰۷	۱۲/۲۶	۳۲/۳۵±۴/۶۴	۲۸/۰۲±۱/۲۶	۳۹/۰۵±۳/۳۱	۲۵/۴۸±۰/۴۴	ضخامت اپی تلیوم
۰/۰۱۴	۸/۲۴	۳/۵۶±۰/۴۰	۳/۲۶±۰/۰۵	۳/۷۲±۰/۳۹	۳/۰۹±۰/۱۴	تعداد لایه‌های سلولی
۰/۱۴۱	۵/۴۷	۷۶/۹۵±۱۲/۱۰	۷۷/۸۲±۳/۸۱	۷۲/۵۱±۳/۹۹	۸۵/۲۰±۷/۸۶	قطر لومن



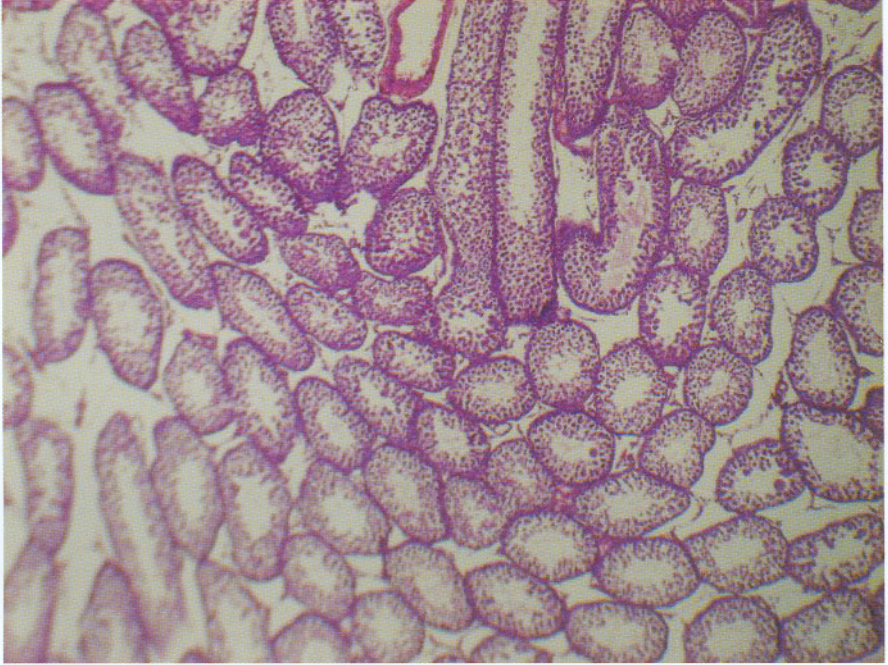
Archive of SID



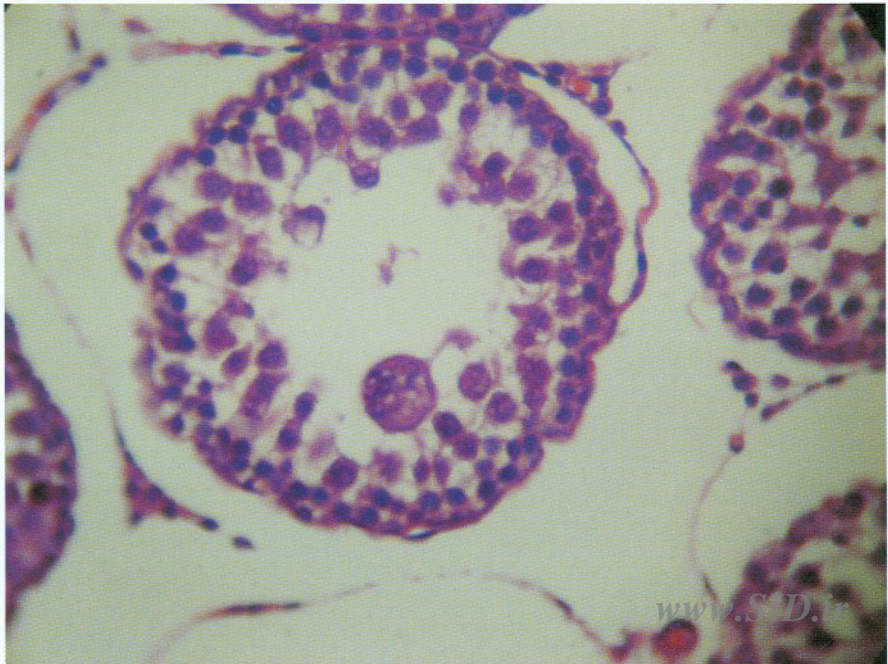
شکل شماره (۲): لوله‌های اسپرم ساز گروه کنترل دوم را با سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتید نشان می‌دهد.



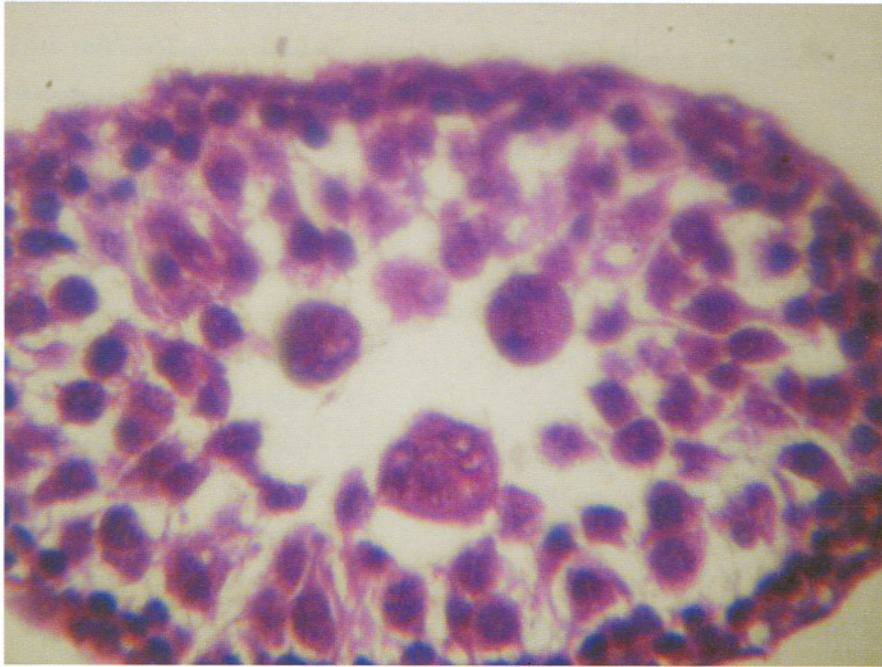
شکل شماره (۳): لوله‌های اسپرم‌ساز گروه آزمایش اول با سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی اسپرماتوسیت در حال تقسیم را نشان می‌دهد.



شکل شماره (۴): لوله‌های اسپرم‌ساز گروه آزمایش دوم را با سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتید نشان می‌دهد.



شکل شماره (۵): در داخل لومن لوله‌های اسپرم‌ساز تعداد زیادی سلول با هسته واکنله دیده شد.



شکل شماره (۶): در داخل لومن لوله‌های اسپرم ساز دیو سلول‌های با هسته‌های متعدد مشاهده شد.

بحث

آگونیست GnRH (بوسریلین) دارویی است که در پانزده سال اخیر کلینیک بیشتر جهت درمان سرطان پروستات و به تاخیر انداختن بلوغ در مردان و در زنان بیشتر برای مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیز جهت القای تخمک‌گذاری به‌کار می‌رود (۴-۶). اما در گذشته از آن برای القای بلوغ و اسپرماتوژنز در مردان با هیپوگنادوتروپیک و هیپوگنادیسم استفاده می‌کردند (۳). آگونیست GnRH در ابتدا باعث آغاز ترشح گنادوتروپین‌ها و به دنبال آن ترشح تستوسترون از سلول‌های بینابینی می‌گردد. سپس از طریق کاهش رسپتورها باعث کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها می‌شود. یعنی اول به‌عنوان محرک اسپرماتوژنز سپس مهار کننده عمل می‌نماید (۱۲). برای اسپرماتوژنز غلظت کافی هورمون تستوسترون نیاز است و رسپتورهای آن روی سلول‌های بینابینی، سرتولی و سلول‌های اطراف توبولی دیده شده‌اند اما در سلول‌های ژرمینال دیده نشده‌اند. در مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات آگونیست GnRH بر روی اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی نابالغ علاوه بر مطالعه کیفی، از روش کمی (یعنی از روش اندازه‌گیری ارتفاع سلول‌ها، قطر لومن، قطر لوله، ضخامت اپیتلیوم) نیز استفاده شده است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ۰/۱ mg/ml آگونیست GnRH در

موش‌های صحرایی نابالغ (۳۰ روزه) تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی اسپرماتوژنز نداشته و لوله‌های اسپرم ساز بدون تغییر معنی‌داری چه از نظر قطر لوله‌ها، ضخامت اپی تلیوم، قطر لومن لوله‌ها و تعداد لایه‌های سلولی با گروه کنترل دیده شدند. از طرف دیگر در موش‌های صحرایی ۳۵ روزه که ۵ روز بعد از اتمام دوره تزریق مورد مطالعه واقع شده‌اند. از آنجایی‌که زمانی برای روند اسپرماتوژنز در نظر گرفته شده بود، اسپرماتوژنز شروع شده علاوه بر اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتید هم در لوله‌های اسپرم‌ساز دیده شد این اثر احتمالاً ناشی از عملکرد آگونیست GnRH می‌باشد. بعلاوه در بین لوله‌های اسپرم ساز سلول‌های بینابینی دیده می‌شد که می‌توانند تستوسترون لازم برای شروع اسپرماتوژنز را ترشح نمایند. در حالی‌که در موش‌های ۳۰ روزه بین لوله‌ها سلول‌های بینابینی دیده نمی‌شد. وجود دیو سلول‌ها و سلول‌های با هسته واکوتله در داخل لوله‌های اسپرم ساز نشان می‌دهد که آگونیست GnRH بر روی اسپرماتوژنز تاثیر داشته اما چون سیکل طبیعی نبوده و یا دچار اختلال گردید باعث واکوتلیزاسیون هسته و تقسیم بدون تقسیم سیتوپلاسم گردیده است.

Archive of SID References:

1. Yan Cheng C, Murk DD. Cell junction "dynamics in the testis: sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 825-74.
2. McKinnell CRM. Sharpe testosterone and spermatogenesis: evidence that androgens regulate cellular secretory mechanisms in stage VI-VIII seminiferous tubules from adult rats. *J Androl* 1995; 16(6): 499-509.
3. Gordon BC, Andrew R, Haffman S, Swerd O, Richard J, Snten D, et al. Therapeutic applications of luteinizing-hormone-releasing hormone and its analogs. *Ann Intern Med* 1985; 102(5):643-57.
4. Botte MC, Chamagne AM, Carre MC, Counis R, Kottler ML. Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* 1998; 159(1):179-89.
5. Ward JA, Robinson J, Furr BJ, Shalet SM, Morris ID. Protection of spermatogenesis in rats from the cytotoxic procabazine by the depot formulation of zoladex, a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Cancer Res* 1990; 50(3):568-74.
6. Gevers EF, Wit JM, Robinson IC. Effects of long-term Gonadotropin-releasing hormone analog treatment on growth, growth hormone (GH) secretion, GH receptors, and GH-binding protein in the rat. *Pediatr Res* 1998; 43(1): 111-20.
7. Scott FG. *Text of developmental biology*. 3th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1991. P.713-5.
8. Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J. Spermatogenesis without Gonadotropins: Maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. *J Endocrinol* 1999; 140(9): 3938-46.
9. Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I, Shuttlesworth GA, Reissmann T, Meistrich ML. Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulates and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *J Endocrinol* 2000; 141(5):1735-45.
10. France LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis Catus*). *Biol Reprod* 2003; 68:1554-61.
11. Costa DS, Paula TA, Matta SL. The intertubular compartment morphology in capybaras (*hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Anim Reprod Sci* 2006; 91(1-2): 173-9.
12. Meistrich LM, Wilson G, Shuttleswrth G, Huhtaniemi I, Reissmann T. GnRH agonists and antagonists stimulates recovery of fertility in irradiated LBNF1 rats. *J Androl* 2001; 22(5):809-17.