

بررسی تأثیر مصرف اسید رتینوئیک در دوران بارداری بر اسپرم‌زایی و استروئیدزایی زاده‌های نر موش صحرایی

لیلی حسین پور M.Sc.*، عبدالحسین شیروی Ph.D.**، محمدتقی قربانیان Ph.D.***، سیدمرتضی گروجی Ph.D.****، ****

* گروه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ایران

*** گروه علوم تشریحی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

**** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

***** گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۸۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی اثر اسید رتینوئیک در دوران بارداری بر اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز در زاده‌های موش صحرایی نر

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ رأس موش صحرایی ماده نژاد Wistar باردار به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل، شم، آزمون ۱، آزمون ۲ و آزمون ۳ تقسیم شدند. گروه‌های آزمون در روزهای ۸/۵، ۱۰/۵، ۱۲/۵ و ۱۴/۵ بارداری به ترتیب ۱۰ mg/kg (آزمون ۱)، ۲۰ mg/kg (آزمون ۲) و ۳۰ mg/kg (آزمون ۳) اسید رتینوئیک درون صفاقی دریافت نمودند. سپس به حیوانات باردار اجازه استراحت و زایمان داده شد. در زمان بلوغ (۱۰ هفته‌گی)، پس از خون‌گیری، اندام‌های تناسلی دو طرف شامل بیضه، اپیدیدیم و وازودفران برای بررسی‌های مورفومتریک خارج شد. بیضه‌ها پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی، مورد بررسی‌های هیستولوژیک قرار گرفت. سرم خون حیوانات نیز برای سنجش سطح هورمون‌ها، به روش رادیوایمونواسی ارزیابی شد. محاسبات آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که دوز ۳۰ mg/kg اسید رتینوئیک موجب کاهش معنی‌دار میزان هورمون‌های LH، FSH، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، تعداد اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول‌های لایدیگ شد. همچنین اسید رتینوئیک در دوزهای به کار رفته موجب کاهش معنی‌دار وزن مجرای اپیدیدیم، دفران و تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم شد.

نتیجه‌گیری: مصرف اسید رتینوئیک در دوران بارداری روی اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز فرزندان دارای آثار تخریبی بوده و باعث کاهش آن می‌شود.

کلید واژه‌ها: اسید رتینوئیک، LH، FSH، تستوسترون، اسپرماتوژنز، بیضه موش صحرایی

مقدمه

است. اپیتلیوم پوشاننده لوله منی‌ساز را اپیتلیوم زاینده می‌گویند که روی غشای پایه ضخیمی قرار گرفته است.

هر بیضه دارای لوله‌های پرپیچ و خم به نام لوله‌های منی‌ساز است. این لوله‌ها برای تولید اسپرم اختصاص یافته

آدرس مکاتبه: دامغان، میدان سعدی، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی

Email: hosseinpour.62@gmail.com

سلول‌های ستیغ عصبی را هم در محیط *in vitro* و هم *in vivo* مهار می‌کند. همچنین الگوهای مهاجرتی سلول‌های ستیغ عصبی را برهم زده و در نهایت آن‌ها را به اهداف اشتباهی می‌رساند [۱۵-۱۶]. لامنو کاروالهو (Lamano Carvalho) و همکاران گزارش کردند که تیمار زیاد از حد ویتامین A در موش‌های بالغ باعث کاهش وزن بیضه، آسیب‌های کانونی در اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش نسبت بین حجم بافت بینابینی و حجم هسته‌ای سلول‌های لایدیگ می‌شود. همچنین هایپرویتامینوز باعث تغییر در ریتم اسپرماتوزن و همچنین کاهش سطح LH هیپوفیزی می‌شود [۱۷].

استفاده از میزان زیاد ویتامین A یا کمبود آن در دوران بارداری بر روند تکوین جنین اختلال ایجاد می‌نماید. پژوهش‌ها نشان می‌دهد خطر نقایص مادرزادی در نوزادان مادرانی که طی بارداری در معرض رتینوئیدها قرار گرفته‌اند، ۲۵ برابر افزایش می‌یابد [۱۸-۱۹]. این در حالی است که استفاده از رتینوئیدها یا مشتقات رتینوئید در پزشکی برای درمان و در ترکیبات سازنده لوازم آرایشی و بهداشتی، سالیانه گسترش می‌یابد. پژوهش‌های گذشته به اثر اسید رتینوئیک بر اسپرماتوزن [۲۰-۲۱] و تأثیر آن بر مهاجرت سلولی [۱۶] اشاره کرده که اکثر این پژوهش‌ها حیوانات را در دوران قبل از بلوغ تحت تأثیر اسید رتینوئیک قرار داده‌اند. در مطالعه حاضر به جای تیمار در دوران قبل از بلوغ، حیوانات در دوران جنینی تحت تأثیر اسید رتینوئیک قرار داده شد و تأثیر آن بر میزان تولید سلول‌های جنسی و هورمون‌های جنسی، در دوران بلوغ در موش‌های نر صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر و ماده بالغ نژاد Wistar در محدوده سنی ۸-۷ هفته و با محدوده وزنی 20.0 ± 1.0 گرم که از انیستیتو سرم و واکسن سازی رازی کرج

اپیتلیوم زاینده از سلول‌های زایا و سلول‌های پشتیبان یا سرتولی است [۱]. اسپرم زایی روند پیچیده‌ای است که اساس باروری مردان و حیوانات نر بوده و با تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شروع شده و در نهایت اسپرم‌های فرد نر تولید می‌شود [۲-۳]. اسپرماتوزن در خلال زندگی فعال جنسی بر اثر تحریک هورمون‌های گنادوتروپیک هیپوفیز قدامی در تمام لوله‌های منی‌ساز انجام می‌شود. اسپرماتوزن اندکی قبل از بلوغ شروع می‌شود و تا پایان عمر ادامه می‌یابد ولی در پیری به شدت کم می‌شود [۴].

هر دو هورمون FSH و LH در هیپوفیز قدامی از سلول‌های گنادوتروپ ترشح می‌شود [۵]. FSH برای تنظیم اسپرماتوزن، به گیرنده‌های مخصوص خود در سطح سلول‌های سرتولی لوله‌های اسپرم‌ساز متصل شده و موجب ترشح مواد مختلف مؤثر در اسپرماتوزن از آن‌ها می‌شود [۶]. تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ ترشح می‌شود. این سلول‌ها در بافت بینابینی بین لوله‌های اسپرم‌ساز جای گرفته‌اند. میزان سنتز و ترشح تستوسترون توسط میزان LH خون تنظیم می‌شود. میزان ترشح تستوسترون با میزان LH رابطه مستقیم دارد [۵].

مواد مختلفی با فعالیت مشابه و ترکیب شیمیایی بسیار نزدیک به هم با نام ویتامین A گروه‌بندی شده‌اند که بیشتر در بافت‌های حیوانی یافت می‌شود ولی مهم‌ترین و فعال‌ترین آن‌ها، نوعی از رتینول یعنی ترنس رتینوئیک اسید (retinoic acid ALL-trans (ATRA)، است [۷]. رتینوئیک اسید (RA) یک مورفوژن طبیعی است که از ویتامین A (رتینول) ساخته می‌شود [۸]. رتینوئیدها گروهی از آنالوگ‌های طبیعی و مصنوعی ویتامین A است که برای اسپرم‌زایی طبیعی [۹] و تکامل مهرداران لازم است [۱۰]. ضرورت وجود رتینوئیدها در دوران رویانی، برای اندام‌زایی دستگاه‌هایی نظیر سیستم عصبی مرکزی، شش‌ها، کلیه، روده، سیستم اداری-تناسلی و پانکراس ثابت شده است [۱، ۳، ۱۱-۱۴].

محققین نشان دادند که اسید رتینوئیک مهاجرت

تستوسترون به وسیله کیت Radim (رم، ایتالیا) و با استفاده از دستگاه گاما کانتر به روش رادیوایمونواسی (RIA: Radioimmunoassay) انجام شد. در روش RIA برای اندازه گیری غلظت لیگاند موجود در نمونه از واکنش ligand-binder استفاده می شود.

ارزیابی میزان اسپرم اپیدیدیم

در زمان بلوغ (۷۵ روز پس از تولد) اندام های تناسلی دو طرف، شامل بیضه، اپیدیدیم و وازودفران حیوانات در تمام گروه های آزمایش، شم و کنترل خارج شد. برای بررسی اثر تحریکی یا مهارتی اسپید رتینوییک بر میزان اسپرماتوزن، تعداد اسپرم های موجود در دم اپیدیدیم شمارش شد که قبل از آن ابتدا اپیدیدیم و وازودفران، هر یک توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد. بعد دم اپیدیدیم از بخش های دیگر جدا شد. از آنجایی که این ناحیه دارای غلاف ضخیمی است، برای آزاد شدن هرچه بیشتر اسپرم ها، با استفاده از قیچی، چند برش به این ناحیه زده و قطعه قطعه شد. بافت را داخل شیشه ساعت محتوی ۱ میلی لیتر سالین قرار داده و ۵ دقیقه زمان داده شد تا اسپرم ها خارج شوند. در مرحله بعد با استفاده از پیت ملائزور (که به نسبت ۱:۲۰۰ توسط سرم فیزیولوژی رقیق شد)، لام نئوبار و میکروسکوپ نوری، سلول های موجود در دم اپیدیدیم با بزرگنمایی ۴۰۰ مطالعه و شمارش شدند.

بررسی های مورفومتریکی بیضه

برای انجام بررسی های مورفومتریکی بیضه حیوانات خارج و به منظور جلوگیری از اتولیز بافتی درون تثبیت کننده فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. سپس مراحل آماده سازی انجام گرفت و سرانجام نمونه های بافتی در پارافین قالب گیری شده و پس از مقطع گیری با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شد و بعد توسط میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. به منظور شمارش سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت

خریداری شد، استفاده شد. حیوانات در شرایط دمایی ۲۵-۲۳ درجه سانتی گراد و تحت شرایط نوری استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد و آب و غذا به صورت یکسان نگهداری شدند.

گروه های آزمایش

۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ باردار در ۵ گروه ده تایی به صورت تصادفی تقسیم بندی شد و در روزهای ۸/۵، ۱۰/۵، ۱۲/۵ و ۱۴/۵ بارداری، ساعت ۱۲ تا ۱۳ به صورت درون صفاقی به شرح زیر مورد تزریق قرار گرفتند:

گروه کنترل: میزان ۰/۰۸ میلی لیتر سرم فیزیولوژی

گروه sham: میزان ۰/۰۸ میلی لیتر dimethyl sulfoxide (sigma)

گروه تجربی اول: میزان ۰/۰۸ میلی لیتر از محلول استوک رتینوییک اسید (sigma) حل شده در DMSO (دوز ۱۰ mg/kg)

گروه تجربی دوم: میزان ۰/۰۸ میلی لیتر از محلول استوک رتینوییک اسید (sigma) حل شده در DMSO (دوز ۲۰ mg/kg)

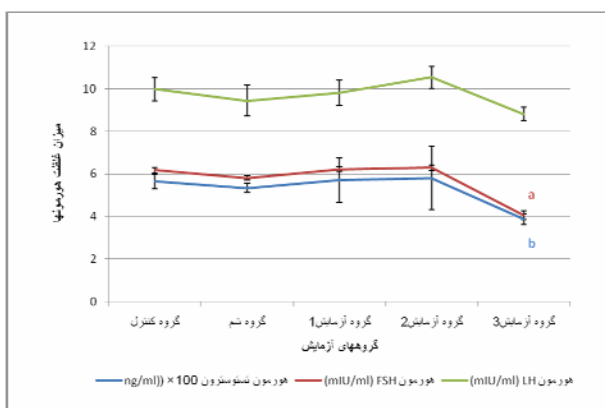
گروه تجربی سوم: میزان ۰/۰۸ میلی لیتر از محلول استوک رتینوییک اسید (sigma) حل شده در DMSO (دوز ۳۰ mg/kg)

سنجش میزان هورمون های LH، FSH و

تستوسترون

برای اندازه گیری میزان هورمون های LH، FSH و تستوسترون، از متولدین نر ۷۵ روز پس از تولد (در زمان بلوغ)، در ساعت مشخص و یکسانی از روز خون گیری به عمل آمد. حیوانات با تزریق داروی کتامین (۳۰ mg/kg) و زایلازین (۵/۲ mg/kg) (آلفاسان، هلند) براساس وزن حیوان به صورت درون صفاقی بی هوش شده و مستقیماً از قلب آن ها تقریباً ۵ میلی لیتر خون کشیده شد. نمونه های خون به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شده و سرم آن تفکیک و تا زمان سنجش هورمون در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. اندازه گیری سطح هورمون های LH، FSH و

گروه‌های آزمایشی و sham با گروه کنترل نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان این هورمون وجود ندارد. مقایسه میزان هورمون تستوسترون (ng/ml) بین گروه‌های آزمایش ۱ ($570 \pm 105/39$)، آزمایش ۲ ($580/75 \pm 149/96$) و آزمایش ۳ ($387/4 \pm 25/53$) با گروه‌های sham ($534 \pm 25/23$) و کنترل ($564/17 \pm 35/23$) نشان داد که سطح تستوسترون در گروه آزمایش سوم در مقایسه با گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری داشته است (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه میزان هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در گروه‌های آزمایش، sham و گروه کنترل. نتایج به صورت Mean±SEM بیان شده است (n=8).
 a: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل در همان هورمون وجود دارد ($p \leq 0/05$).
 b: اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و شم در همان هورمون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

بررسی میزان اسپرم اپیدیدیم

همان‌گونه که در جدول شماره ۱ دیده می‌شود، مقایسه وزن اپیدیدیم بین گروه‌های آزمایش و گروه کنترل نشان داد که دریافت اسید رتینوئیک از طریق مادر در دوران جنینی سبب کاهش معنی‌داری در وزن اپیدیدیم بر حسب گرم در گروه‌های آزمایش ۱ ($0/79 \pm 0/25$)، آزمایش ۲ ($0/83 \pm 0/25$) و آزمایش ۳ ($0/87 \pm 0/05$) نسبت به گروه کنترل ($1/12 \pm 0/03$) و شم ($1/04 \pm 0/04$) در سطح $p \leq 0/05$ شده است.

اولیه، اسپرماتید، بینابینی (لایدیگ) و قطر لوله‌های منی‌ساز، از هر گروه ۴۰ مقطع عرضی بیضه مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. در هر گروه، از میان لوله‌های اسپرم‌ساز، ۱۰ مقطع عرضی لوله که از نظر شکل ظاهری و قطر مشابه بودند انتخاب و سلول‌های مورد نظر در تمامی گروه‌ها شمارش شدند. همچنین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز با عدسی شیئی ۴۰× میکروسکوپ و به کمک میکرومتر چشمی اندازه‌گیری شد. از آنجایی که لوله‌های اسپرم‌ساز با توجه به مرحله‌ای که در آن قرار دارند ممکن است دارای جمعیت سلولی متفاوتی باشند، تمامی مقاطع از لوله‌های اسپرم‌ساز مرحله ۷ انتخاب شد. در این مرحله اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، اسپرم، سلول‌های سرتولی و لایدیگ است.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده به صورت میانگین و انحراف معیار (Mean±SEM) بررسی شد. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تجربی و کنترل با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام گرفت. سطح معنی‌داری نتایج $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سنجش هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون

همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ دیده می‌شود، میزان هورمون FSH (mIU/ml) بین گروه‌های آزمایش ۱ ($0/52 \pm 0/11$)، آزمایش ۲ ($0/49 \pm 0/14$) و آزمایش ۳ ($0/19 \pm 0/20$) و sham ($0/47 \pm 0/11$) با گروه کنترل ($0/54 \pm 0/14$) بررسی شد. این یافته‌ها نشان داد که در دوز ۳۰ میزان کاهش معنی‌داری با سایر گروه دارد ($p \leq 0/05$). بررسی سطح معنی‌داری مربوط به هورمون LH (mIU/ml) بین

بررسی‌های مورفومتریک بیضه

نتایج به دست آمده نشان داد که قطر لوله‌های اسپرم‌ساز بر حسب میکرومتر در گروه آزمایش سوم ($250/98 \pm 2/23$) نسبت به گروه کنترل ($300 \pm 3/37$) و شم ($295/80 \pm 2/76$) کاهش معنی‌داری در سطح $P < 0/05$ پیدا کرده است (جدول شماره ۲). هم‌چنین اختلاف دوز 30 mg/kg با گروه آزمایش ۱ ($295/80 \pm 2/76$) و آزمایش ۲ ($291/63 \pm 2/66$) در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار است.

مقایسه تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی موجود در سراسر مقطع عرضی لوله‌های مورد نظر بین گروه‌های تجربی، شم و کنترل، اختلاف معنی‌داری را در هیچ‌کدام از گروه‌ها نشان نمی‌دهد (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، سلول‌های لایدیگ و قطر لوله‌های سمی نفروس در بین گروه‌های آزمایش، sham و گروه کنترل

گروه‌ها	تعداد سلولهای لایدیگ	تعداد اسپرماتیدها	تعداد اسپرماتوسیت‌ها	تعداد قطر لوله سمی نفروس
کنترل	$14/93 \pm 0/82$	$58/98 \pm 1/29$	$16/0 \pm 0/42$	$13/78 \pm 0/35$
شم	$15/40 \pm 1/07$	$60/90 \pm 0/93$	$15/94 \pm 0/42$	$14/97 \pm 0/43$
گروه آزمایش ۱	$14/40 \pm 0/82$	$61/98 \pm 1/05$	$16/48 \pm 0/49$	$14/08 \pm 0/44$
گروه آزمایش ۲	$13/53 \pm 1/05$	$50/87 \pm 1/27$ h,c	$15/46 \pm 0/49$	$11/50 \pm 0/33$
گروه آزمایش ۳	$10/83 \pm 0/86$ h,c	$41/05 \pm 0/86$ h,c	$12/25 \pm 0/29$ h,c	$11/50 \pm 1/83$ h,c

نتایج به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است. ($n=8$)

a: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل در همان ستون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

b: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه sham در همان ستون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

c: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه آزمایش ۱ در همان ستون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

هم‌چنین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه آزمایش ۳ ($12/25 \pm 0/29$) نسبت به گروه کنترل ($16/0 \pm 0/42$) کاهش

هم‌چنین مقایسه وزن مجاری دفران بر حسب گرم بین گروه‌های آزمایش، sham و کنترل نشان داد که وزن دفران در گروه‌های آزمایش ۱ ($0/18 \pm 0/005$)، آزمایش ۲ ($0/17 \pm 0/006$) و آزمایش ۳ ($0/19 \pm 0/005$) نسبت به گروه کنترل ($0/32 \pm 0/07$) و شم ($0/31 \pm 0/06$) دارای کاهش معنی‌داری در سطح $P < 0/05$ است (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میزان وزن اپیدیدیم، وزن دفران و تعداد اسپرم‌های شمارش شده از دم اپیدیدیم در بین گروه‌های آزمایش، sham و گروه کنترل

گروه‌ها	وزن کانال دفران (gr)	وزن اپیدیدیم (gr)	تعداد اسپرم‌ها ($\times 10^6$)
کنترل	$0/32 \pm 0/07$	$1/12 \pm 0/03$	$10/2 \pm 1/89$
شم	$0/31 \pm 0/06$	$1/04 \pm 0/04$	$183 \pm 10/2$
گروه آزمایش ۱	$0/18 \pm 0/005$ a,b	$0/79 \pm 0/025$ a,b	$2/75 \pm 1/37$ a,b
گروه آزمایش ۲	$0/17 \pm 0/006$ a,b	$0/83 \pm 0/025$ a,b	$98/5 \pm 3/03$ a,b,c
گروه آزمایش ۳	$0/19 \pm 0/005$ a	$0/87 \pm 0/05$ b	$10/6 \pm 1/36$ a,b,c

نتایج به صورت $SD \pm Mean$ بیان شده است. ($n=8$)

a: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه کنترل در همان ستون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

b: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه sham در همان ستون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

c: اختلاف معنی‌دار بین تمام گروه‌ها با گروه آزمایش ۱ در همان ستون وجود دارد ($p \leq 0/05$).

نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌های ذخیره شده در ناحیه دم اپیدیدیم نشان داد که تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های آزمایش ۱ ($137 \times 10^6 \pm 2/75 \times 10^6$)، آزمایش ۲ ($98/5 \times 10^6 \pm 3/03 \times 10^6$) و آزمایش ۳ ($10/6 \times 10^6 \pm 1/36 \times 10^6$) نسبت به گروه کنترل ($183 \times 10^6 \pm 10/2 \times 10^6$) و شم ($183 \times 10^6 \pm 10/2 \times 10^6$) کاهش معنی‌داری پیدا کرده است (جدول شماره ۱).

Livera و همکاران پس از بررسی مراحل حساسیت بیضه به رتینوئیدها در دوران جنینی موش‌های صحرایی، در نهایت گزارش کردند که رتینوئیدها دارای نقش مهاری یا بازدارنده روی فعالیت استروئیدوژنیک در طول تمایز سلول‌های لایدیگ جنینی است [۲۴] در پژوهشی که توسط آزوبل (Azoubel) و همکاران انجام شد، تزریق ویتامین A با دوز بالا به موش‌های صحرایی روند اسپرماتوزن و سطح هورمون LH هیپوفیزی را کاهش داد [۲۵]. در بررسی‌های قبلی نیز مشخص شد که رتینوئیدها ترشح پایه تستوسترون در سلول‌های لایدیگ جنینی موش‌های صحرایی را در طول تمایز این سلول‌ها کاهش می‌دهد [۲۳]. این مطالعات نتایج آنالیز هورمونی پژوهش حاضر را که نشان‌دهنده کاهش سطح تستوسترون و FSH در اثر مصرف اسید رتینوئیک است تایید می‌نماید.

از طرفی در مطالعه حاضر با وجود معنی‌دار نبودن داده‌های مربوط به مقایسه سطح هورمون LH در بین گروه‌های آزمایش، sham و کنترل، افزایش سطح این هورمون در گروه آزمایش ۳ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد زیرا میزان ترشح تستوسترون با میزان LH رابطه مستقیم دارد و تستوسترون مترشحه از بیضه‌ها در پاسخ به LH، خود اثر فیدبک منفی بر ترشح LH از هیپوفیز قدامی دارد [۵]. بنابراین احتمالاً با کاهش تستوسترون در اثر تیمار با دوز ۳۰ mg/kg اسید رتینوئیک، مهار فیدبکی تستوسترون از روی سلول‌های هیپوفیز قدامی برداشته شده و سطح LH مترشحه به جریان خون افزایش خواهد یافت. از سوی دیگر شاید این کاهش در میزان هورمون تستوسترون دلیل دیگری برای کاهش تعداد اسپرم‌های بالغ در دم اپیدیدیم باشد. مطالعات عبدالمحسن و سادک (Abdul-Mohsen & Sadek) نیز در این زمینه نشان داد که تیمار اسید رتینوئیک 13-Cis با مهار اسپرماتوزن و دژنره کردن میتوکندری‌های سلول‌های سرتولی می‌تواند باعث کاهش در سطح تستوسترون شود [۲۱]. همچنین رتینوئیدها

معنی‌دار دارد. اما تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه آزمایش ۱ (۱۶/۴۸±۰/۴۹) و گروه آزمایش ۲ (۱۵/۴۶±۰/۴۹) معنی‌دار نبوده است.

مقایسه تعداد سلول‌های اسپرماتید، در سطح $P < 0.05$ کاهش معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایش دوم (۵۰/۸۷±۱/۲۷) و سوم (۴۱/۰۵±۰/۸۶) نسبت به گروه کنترل (۵۸/۹۸±۱/۲۹) و ششم (۶۰/۹۰±۰/۹۳) نشان می‌دهد. اما تعداد این سلول‌ها در گروه‌های تجربی اول (۶۱/۹۸±۱/۰۵) و ششم (۶۰/۹۰±۰/۹۳) نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبوده است.

در مقایسه تعداد سلول‌های لایدیگ، فقط گروه آزمایش سوم (۱۰/۷۳±۰/۸۶) نسبت به گروه کنترل (۱۴/۹۳±۰/۸۲) و سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری را در سطح $P < 0.05$ نشان داد.

بحث

در این پژوهش اثر دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اسید رتینوئیک در دوران بارداری بر اسپرماتوزن و استروئیدوژن زاده‌های نر موش صحرایی بررسی شد. نتایج بررسی‌های این تحقیق نشان می‌دهد مصرف اسید رتینوئیک در دوران بارداری با دوز ۳۰ mg/kg بر اسپرماتوزن و استروئیدوژن فرزندان اثر تخریبی داشته و باعث کاهش معنی‌دار آن‌ها می‌شود.

اسید رتینوئیک برای تمایز طبیعی مجاری تناسلی پروستات و سمینال وزبکول دستگاه تناسلی بالغ ضروری است. این ترکیب تولید تستوسترون را افزایش داده و برای تشکیل سد خونی-بیضه‌ای، موجب بقای اتصالات محکم بین سلول‌های سرتولی می‌شود. با افزایش تمایز اسپرماتوگونی‌ها و تنظیم چسبندگی سلول‌های ژرم و آزادسازی اسپرم‌های بالغ نقش ضروری در اسپرماتوزن ایفا می‌کند [۲۲]. لیورا (Livera) و همکاران نشان دادند که رتینوئیدها ترشح پایه تستوسترون در سلول‌های لایدیگ جنینی رت‌ها را در طول تمایز این سلول‌ها کاهش می‌دهد [۲۳]. همچنین طی پژوهش دیگری،

دوران بلوغ صورت گرفته است، با وجود آنکه در برخی موارد نتایج متضادی دارند، اما اکثر قریب به اتفاق پژوهشگران در نهایت اعلام داشتند که تیمار زیاد از حد ویتامین A در موش‌های بالغ باعث کاهش وزن بیضه، آسیب‌های کانونی در اپیتلیوم لوله منی‌ساز و نیز تغییر در ریتم اسپرماتوژنز می‌شود [۲۱، ۲۵]. همچنین مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که تیمار با دوز بالای ویتامین A در موش‌های بالغ باعث کاهش جرم بیضه، آسیب‌های کانونی در اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش رابطه بین حجم بافت بینابینی و حجم هسته‌ای سلول‌های لایدیگ می‌شود [۱۷]. مارینو (Marino) و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش کردند که اسیدرتینویک باعث قطع شدن طناب‌های منی‌ساز در بیضه رویان موش صحرائی می‌شود [۲۹]. از طرفی بولگون (Boulogne) و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ گزارش نمودند که اسیدرتینویک، تکثیر گونوسیت‌های رویانی و نوزادی را با اثر بر عملکرد آپوتوز و میتوز از طریق فعال نمودن رسپتور $RAR\alpha$ کاهش می‌دهد [۳۰]. به گونه‌ای که حذف $RAR\alpha$ منجر به افزایش تعداد سلول‌های زاینده (germ cell) در رویان و نوزاد موش می‌شود که این خود نشان‌گر درگیری رسپتور $RAR\alpha$ در کنترل گامتوژنز جنین است و دلالت بر این امر دارد که رتینوئیدها بر شروع اسپرماتوژنز تأثیر فیزیولوژیک منفی دارد [۳۰].

نتایج بررسی حاضر نشان داد که تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه آزمایشی مورد تزریق با دوز 30 mg/kg ، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشته، همچنین مقایسه تعداد سلول‌های اسپرماتید، در سطح $p \leq 0/05$ کاهش معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایش دوم و سوم نسبت به گروه کنترل و شم نشان داد و از همه جالب‌تر تعداد سلول‌های اسپرم بالغ موجود در دم اپیدیدم است که کاهش قابل توجهی نسبت به گروه کنترل داشته‌اند. میسرو (Misro) و همکاران نشان دادند که افزایش ویتامین A حتی برای دوره زمانی کوتاه برای تکوین انواع سلول‌ها خطرناک بوده و از

در طول تمایز سلول‌های لایدیگ جنینی روی فعالیت استروئیدورژنیک آن‌ها نیز اثر مهاری یا بازدارندگی دارد [۲۴]. در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار سطح هورمون FSH در گروه آزمایش ۳ نسبت به گروه کنترل با استناد به مطالعه لیورا (Livera) و همکاران مطابقت داشته و با این مکانیسم قابل توجه است زیرا احتمالاً تیمار اسیدرتینویک روی مادران باردار در روزهای تعیین شده منجر به مهار اثر تحریکی FSH بر تولید cAMP در سلول‌های سرتولی شده و در نتیجه سنتز mRNA و سنتز پروتئین توسط سلول‌های سرتولی دچار اختلال شده و می‌تواند دلیلی بر اثبات کاهش تعداد اسپرم‌های شمارش شده از دم اپیدیدم نیز باشد.

بیسواس (Biswas) و همکاران در سال ۱۹۶۵ گزارش کردند که در هر دو حالت افزایش و کاهش، تیمار حیوان با اسیدرتینویک برای استروئیدورژنز مضر بوده و باعث اختلال در این روند می‌شود [۲۶]. به نظر می‌رسد که اسیدرتینویک قادر به افزایش هر دو فرایند میتوز و آپوتوز در سلول‌های زاینده است، و این که کدام غالب بوده و بر دیگری برتری دارد به مرحله تکامل و شرایط آزمایش بستگی دارد [۲۷]. سیندر (Snyder) و همکاران نیز با بررسی اثر RA بر موش‌های بالغ نشان دادند که RA منجر به آپوتوز اسپرماتوگونی‌ها می‌شود، این درحالیست که تیمار در دوره نوزادی باعث رخداد اسپرماتوژنز همزمان و هماهنگ (Synchronous Spermatogenesis) خواهد شد [۲۸]. بررسی‌های مورفومتریک صورت گرفته در این تحقیق تاییدی بر نتایج حاصل از مطالعه هیستولوژیک آن است.

دریافت اسیدرتینویک از طریق مادر در دوران جنینی سبب کاهش معنی‌داری در وزن اپیدیدم گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل شد. همچنین وزن دفران در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p \leq 0/05$). احتمالاً این کاهش وزن مربوط به کاهش تعداد اسپرم‌های بالغ در مجاری اپیدیدم و دفران است. مطالعاتی که تاکنون بر تأثیر اسیدرتینویک بر اسپرماتوژنز در

اعلام داشتند که هایپرویتامینوز A باعث کاهش حجم بافت بینابینی بیضه‌ای شده و سیتوپلاسم سلول‌های لایدیگ نیز دژنره می‌شود [۲۶].

در مجموع از یافته‌های این پژوهش این گونه می‌توان نتیجه گرفت که اسید رتینوئیک در دوزهای کمتر از ۳۰ mg/kg مانع از تشکیل بیضه و دستگاه تولید مثلی نر نمی‌شود. ولی با دوز بیش از ۲۰ mg/kg با کاهش تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی و میوز موجب اختلال در روند سلول‌های لایدیگ باعث کاهش ترشح تستوسترون شده و به دنبال آن میزان اسپرم‌های تولیدی کاسته می‌شود. احتمالاً اسید رتینوئیک از طریق کاهش هورمون FSH بر روی نقش حمایتی و تنظیمی سلول سرتولی اثر گذاشته و بنابراین اسپرماتوژنز با اختلال مواجه خواهد شد. حضور اسید رتینوئیک برای تکوین طبیعی دستگاه تولید مثلی نر ضروری است ولی می‌تواند در مقادیر بالا موجب اختلال در عملکرد این دستگاه شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات ارزنده جناب آقای دکتر محمد مهدی اجتهادی و پرسنل محترم آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر اجتهادی (مشهد) برای همکاری‌شان در امر سنجش هورمون، قدردانی و تشکر ویژه می‌شود. همچنین از مسئول تجهیزات آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان جناب آقای مهندس غلامرضا اسلامیان صمیمانه قدردانی می‌شود.

References

1. Nagatomo K, Ishibashi T, Satou Y, Satoh N, Fujiwara S. Retinoic acid affects gene expression and morphogenesis without upregulating the retinoic acid receptor in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Dev* 2003; 120: 363-72.
2. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 2005; 113:

پیشروی فرایند اسپرماتوژنیک پس از مرحله اسپرماتید گرد جلوگیری می‌کند [۳۱].

افزایش و کاهش اسید رتینوئیک بر روند اسپرماتوژنز دارای آثار تخریبی است. افزایش ویتامین A موجب آسیب بیضه و اختلال و توقف اسپرماتوژنز می‌شود. همچنین کمبود ویتامین A پس از کاهش تولید تستوسترون موجب آتروفی اندام‌های جنسی ضمیمه خواهد شد. رتینوئیدها بر ساخت و رسوب ماتریکس خارج سلولی توسط سلول‌های پری توبولار مثل تولید و ترشح لامینین و فیبرونکتین اثر می‌گذارد. هایپرویتامینوز A حجم بافت بینابینی بیضه‌ای و توده سمینال وزیکول را کاهش و سیتوپلاسم سلول‌های لایدیگ را تخریب می‌کند [۳۲].

در این تحقیق نیز اسید رتینوئیک موجب کاهش معنی‌دار سلول‌های لایدیگ در گروه سوم شده است. تأثیر اسید رتینوئیک بر ساخت و ترشح ماده زمینه خارج سلولی و رشته‌های همبندی نیز در مشاهدات میکروسکوپی بیضه دیده شده است. Boulogne و همکاران (۱۹۹۹) بیان کردند که رتینوئیدها بر تمام انواع سلول‌های بیضه‌ای در طول دوره تکوین جنینی و پس از تولد اثر می‌گذارد، اما به‌طور اختصاصی روی گونوسیت‌ها و سلول‌های لایدیگ مؤثر است [۳۰]. طی مطالعه حاضر نیز کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه آزمایش سوم (تیمار با ۳۰ mg/kg اسید رتینوئیک) مشاهده شد. یافته‌های حاصل از پژوهش Biswas و Deb در سال ۱۹۶۵ نیز بیانگر مطالب فوق است. این محققین

727-42.

3. Erasmus C, Penny C, Kramer B. Retinoic acid increases the length and volume density of ducts in the rat embryonic pancreas. *Dev Growth Differ* 2003; 45: 199-207.
4. Ogawa T. Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. *J Mol Med* 2001; 79: 368-74.

5. **Guyton A, Hall J.** Pocket companion to textbook of medical physiology. Saunders 2001.
6. **Norman AW, Litwack GL.** Hormones. In, Norman AW, Litwack G (eds.), vol. San Diego Academic press; 1997 343-54.
7. **Murtaugh LC, Melton DA.** Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 71-89.
8. **Gilbert SF, Singer SR.** Early Embryonic Development. In: *Developmental biology* Singer SR (ed.) vol. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2006.
9. **Chung SS, Wolgemuth DJ.** Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105: 189-202.
10. **Chen Y, Hollemann T, Pieler T.** Organizer activities mediated by retinoic acid signaling. In: *The vertebrate organizer*, Grunz H (ed.) vol. Berlin Heidelberg Springer-Verlag; 2004 173-86.
11. **Kumar M, Melton D.** Pancreas specification: a budding question. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 401-7.
12. **Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, et al.** All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes* 2003; 52: 76-84.
13. **McCaffery PJ, Adams J, Maden M, Rosa-Molinar E.** Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci.* 72-457: 18; 2003
14. **Broglia F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Volante M, Destefanis S, et al.** Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 2003; 22: 19-24.
15. **Li J, Molkentin JD, Colbert MC.** Retinoic acid inhibits cardiac neural crest migration by blocking c-Jun N-terminal kinase activation. *Dev Biol* 2001; 232: 351-61.
16. **Salvarezza SB, Rovasio RA.** Exogenous retinoic acid decreases in vivo and in vitro proliferative activity during the early migratory stage of neural crest cells. *Cell Prolif* 1997; 30: 71-80.
17. **Lamano Carvalho T, Lopes R, Azoubel R, Ferreira A.** Morphometric study of the reversibility of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A. *Int J Vitam Nutr Res* 1978; 48: 316-24.
18. **Honein MA, Paulozzi LJ, Erickson JD.** Continued occurrence of Accutane-exposed pregnancies. *Teratology* 2001; 64: 142-7.
19. **Robertson JA, Martinez LP, Gallegos S, Leen-Mitchell MJ, Garcia V, Neuman J, Carey JC.** Accutane cases: a teratogen information service's approach. *Teratology* 2002; 66: 1-2.
20. **Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM.** Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 2000; 80: 1021-54.
21. **Sadek IA, Abdul-Mohsen MH.** Long-term administration of vitamin A and the process of spermatogenesis. *East Mediterr Health J* 1999; 5: 123-9.
22. **Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, et al.** Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology.* 110-96: 147; 2006
23. **Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P, Habert R.** Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod* 2000; 62: 1303-14.
24. **Livera G, Pairault C, Lambrot R, Lelievre-Pegorier M, Saez JM, Habert R, et al.** Retinoid-sensitive steps in steroidogenesis in fetal and neonatal rat testes: in vitro and in vivo studies. *Biol Reprod* 2004; 70: 1814-21.
25. **Lamano Carvalho TL, Lopes RA, Azoubel R, Ferreira AL.** Morphometric study of the reversibility of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A. *Int J Vitam Nutr Res* 1978; 48: 316-24.
26. **Biswas NM, Deb C.** Testicular degeneration in rats

- during hypervitaminosis A. *Endokrinologie* 19; 9-64: 49; 65
27. **Li H, Kim KH.** Retinoic acid inhibits rat XY gonad development by blocking mesonephric cell migration and decreasing the number of gonocytes. *Biol Reprod* 2004; 70: 687-93.
28. **Snyder EM, Davis JC, Zhou Q, Evanoff R, Griswold MD.** Exposure to Retinoic Acid in the Neonatal but Not Adult Mouse Results in Synchronous Spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 2011; 84(5):886-93.
29. **Marinos E, Kulukussa M, Zotos A, Kittas C.** Retinoic acid affects basement membrane formation of the seminiferous cords in 14-day male rat gonads in vitro. *Differentiation* 1995; 59: 87-94.
30. **Boulogne B, Levacher C, Durand P, Habert R.** Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol Reprod* 1999; 61: 1548-57.
31. **Misro MM, Jena S, Paul PK.** Effect of vitamin A excess on germ cell development in prepubertal rat testis. *Indian J Exp Biol* 1997; 35: 576-80.
32. **Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R.** Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 2002; 124: 173-80.