

بررسی بیان پروتئین Bax در آپوپتوز ناشی از دگزامتازون در سلولهای زایای اسپرم در موش آزمایشگاهی

لعیا سادات خرسندی^۱، محمود هاشمی تبار^۲، محمود اوراضی زاده^۳

^۱ دانشجوی دکترای بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
^۲ دانشیار، دکترای علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
^۳ استادیار، دکترای علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات نشان داده است که گلوکوکورتیکوئیدها هموستاز بیضه را با کاهش دادن سطح تستوسترون تحت تاثیر قرار می دهند. در این مطالعه اثر دگزامتازون، به عنوان یک ترکیب گلوکوکورتیکوئیدی پر مصرف، بر بیان پروتئین Bax در سلولهای زایای اسپرم و فرآیند اسپرماتوژنیز در موش های آزمایشگاهی بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۵ موش بالغ نر بطور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. موش های گروه شاهد تنها نرمال سالین به مدت ۷ روز دریافت کردند. در گروه های آزمایش (T1-T4) دگزامتازون به ترتیب با مقادیر ۲، ۴، ۷ و ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم بصورت تزریق داخل صفاقی و به مدت ۷ روز تجویز گردید. سپس موش ها قربانی شده و بیضه ها از نظر بافت شناسی و ایمنو هیستوشیمی بررسی شدند.

یافته ها: گروه های دریافت کننده دگزامتازون با دوزهای ۷ و ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم، کاهش قابل ملاحظه ای در تعداد سلولهای سوماتیک و زایای بیضه و کاهش بلوغ اسپرماتوژنز داشتند ($P < 0.05$). مطالعات ایمنو هیستوشیمی نشان داد که دگزامتازون با دوزهای ۷ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث افزایش قابل ملاحظه بیان پروتئین Bax در تمام مراحل چرخه اسپرماتوژنز، بجز مرحله IX می شود ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد ترکیبات گلوکوکورتیکوئیدی مانند دگزامتازون با تحت تاثیر قرار دادن پروتئین های پیش آپوپتوزی نظیر پروتئین Bax، باعث ایجاد آپوپتوز و اختلال در روند اسپرماتوژنز در موش های آزمایشگاهی می شوند.

واژگان کلیدی: پروتئین Bax، آپوپتوز، اسپرماتوژنز، موش آزمایشگاهی.

مقدمه

آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) یک فرایند سلولی است که به طور معمول در بیضه پستانداران دیده می شود (۱).

علاوه بر آپوپتوز فیزیولوژیک که در سراسر زندگی یک فرد ممکن است رخ دهد، عوامل دیگری نیز وجود دارند که باعث افزایش فرایند آپوپتوز در سلول های زایای اسپرم می شوند. این عوامل شامل تابش اشعه X (۲)، مواد سمی و بعضی از داروها می باشند (۳، ۴). افزایش آپوپتوز در سلول های زایا حالت تعادل بین تکثیر و مرگ سلول های زایا را از بین می برد و منجر به اختلال در روند اسپرماتوژنز می گردد (۵).

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، لعیا سادات خرسندی

(email: layasadat@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۴

خانواده پروتئین‌های Bcl-2 نقش کلیدی در تنظیم فرآیند آپوپتوز بازی می‌کنند. پروتئین Bax یکی از اعضای خانواده Bcl-2 می‌باشد که بعنوان القاء کننده آپوپتوز عمل می‌کند. پروتئین Bax در حالت عادی به میزان بسیار اندکی بصورت محلول در سیتوپلاسم وجود دارد، ولی هنگام تحریک آپوپتوز بیان آن افزایش می‌یابد و در غشاء خارجی میتوکندری بصورت الیگومر قرار می‌گیرد. در این حالت در غشاء خارجی میتوکندری کانالهایی را تشکیل می‌دهند که از خلال این کانال‌ها سیتوکروم-c از میتوکندری به درون سیتوپلاسم رها می‌شود. سیتوکروم-c به نوبه خود باعث تحریک آبشار کاسپازها می‌شود. کاسپازها آنزیم‌های پروتئولیتیک قوی هستند و فعال شدن آنها منتهی به مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌گردد (۷،۶).

مطالعات نشان داده‌اند که گلوکوکورتیکوئیدها با اثر بر روی هیپوفیز قدامی و بیضه باعث مهار ترشح تستوسترون می‌شوند (۸). سطح تستوسترون خون توسط عمل استروئیدسازی سلول‌های لیدیک بیضه تعیین می‌شود. سلول‌های لیدیک گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدها را سنتز کرده، بنابراین اولین هدف عمل گلوکوکورتیکوئیدها بر بافت بیضه می‌باشند (۹). گلوکوکورتیکوئیدها طیف درمانی وسیعی در بیماری‌های التهابی، عفونی، خود ایمنی، نارسائی غده فوق کلیه، دردهای مفاصل و سرطان‌های رده لنفوئید دارند (۱۰). گزارشات ارسالی دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور بیانگر تجویز بیش از حد آمپول دگزامتازون و نشان دهنده روند افزایشی تجویز این دارو در سال‌های اخیر می‌باشد. طی ۵ سال گذشته بر اساس گزارش برخی از دانشگاه‌ها، آمپول دگزامتازون رتبه اول را در تجویز داروها دارا می‌باشد (۱۱).

با توجه به تجویز بی‌رویه گلوکوکورتیکوئیدها در سالهای اخیر و با در نظر گرفتن اثر آنها بر روی هموستاز بیضه و کاهش سطح تستوسترون، در این مطالعه اثر دگزامتازون بر روی بیان پروتئین Bax در سلول‌های رده اسپرم‌ساز و فرآیند اسپرماتوژنز بررسی شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۳۵ موش سوری بالغ نر (۶ تا ۸ هفته) با نژاد Albino NMRI استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰-۷۵ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به چهار

گروه آزمایش (T1-T4) و یک گروه شاهد تقسیم شدند. تعداد موش‌ها در هر گروه ۷ سر بود. حیوانات در گروه‌های آزمایش به ترتیب تحت درمان با دوزهای ۲، ۴، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دگزامتازون به صورت داخل صفاقی و به مدت ۷ روز قرار گرفتند. یک روز پس از آخرین تزریق، حیوانات با کلروفرم بیهوش و پس از پرفیوژن قلبی، بیضه آنها از حفره شکمی خارج شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در فرمالین در دمای اتاق غوطه‌ور شدند و پس از انجام مراحل پاساژ بافتی با استفاده از میکروتوم دوار (Micro Tec, Germany) مقطعی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. از هر بیضه ۸ اسلاید انتخاب و به طریق هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، سرتولی و لیدیک در مقطع عرضی ۲۰ لوله سمینفروس در هر اسلاید مورد شمارش قرار گرفتند. حتی الامکان سعی شد تا از لوله‌هایی با مقطع عرضی گرد و تقریباً یک اندازه استفاده شود و لوله‌هایی که بیضی شکل یا در مقطع طولی بودند مورد شمارش قرار نمی‌گرفتند. جهت شمارش سلولی از میکروسکوپ نوری امپوس با بزرگنمایی ۴۰۰ و همچنین مشخصات مورفولوژیک سلولی استفاده شد (۱۲).

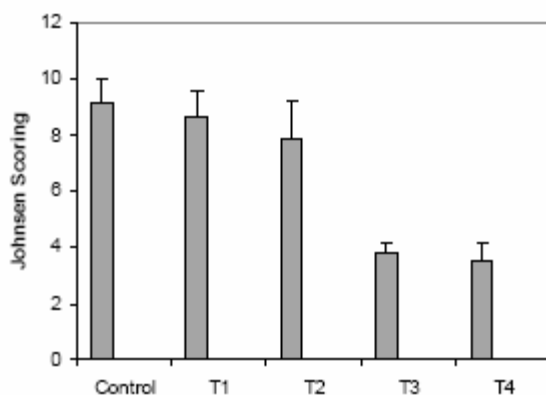
برای بررسی وضعیت بلوغ اسپرماتوژنز در داخل لوله‌ها، از روش درجه‌بندی جانسن (Johansen scoring) استفاده شد. بدین منظور از مقطع عرضی ۱۵۰ لوله سمینفروس در هر حیوان استفاده گردید و به هر لوله بر اساس جدول نمرات، امتیاز ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت (۱۵-۱۳).

برای بررسی بیان پروتئین Bax از روش ایمنوهیستوشیمی استفاده شد. مراحل انجام رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی طبق سفارش شرکت سازنده کیت آنتی بادی اولیه و ثانویه (Santa Cruz) به شرح زیر بود:

برش‌های ۵ میکرومتری ابتدا پارافین‌گیری و آب‌دهی و سپس با محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن انکوبه شدند. بازیابی آنتی‌ژن با قرار دادن نمونه‌ها در بافر سیترات (pH = ۶) در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه منوکلونال Bax (SC-7480, Santa Cruz) با غلظت ۱/۱۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ شب انکوبه شدند. بعد از شست و شو با بافر فسفات، آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به آنزیم پراکسیداز (SC-2017, Santa Cruz) به نمونه‌ها اضافه شد. پس از شست‌وشو با بافر فسفات، نمونه‌ها در معرض سوبسترای دی‌آمینوبنزدین (DAB) برای ۸ دقیقه قرار گرفتند. محل‌های

دریافت کننده ۷ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون؛ T4 گروه آزمایشی دریافت کننده ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون

در گروهی که ۴ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون (T2) دریافت کرده بودند، در بعضی از لوله های منی ساز، لایه های اپیتلیوم کاهش یافته بود و بین سلول های زایا واکوئول هایی که نشان دهنده مرگ سلولی بود مشاهده گردید (شکل ۱). در مشاهدات میکروسکوپی، سلول های اسپرماتوسیت بیشترین میزان تخریب را نشان دادند و تعداد آنها نسبت به گروه شاهد کاهش قابل ملاحظه ای را نشان داد. تعداد سلول های اسپرماتوگونی و اسپرماتید تغییر چشم گیری را در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد. سلول های سرتولی به ظاهر سالم بودند و تعداد آنها کاهش معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد (NS). برخلاف سلول های سرتولی، تعداد سلول های لیدیک کاهش معنی داری یافته بود (جدول ۱). بررسی وضعیت بلوغ اسپرماتوژنز در داخل لوله ها بر اساس درجه بندی جانسون (نمودار ۱) کاهش معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد (NS).



نمودار ۱- اثر دگزامتازون بر روی بلوغ اسپرماتوژنز در گروه های

شاهد و آزمایش بر اساس روش درجه بندی جانسون.

اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده اند. $P < 0.05$ *

در گروه تحت درمان با ۷ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون (T3) بعضی از لوله های سمینفر بکلی تخریب شده بودند و حتی فاقد سلول های سرتولی بودند. تعداد زیادی واکوئول بزرگ در لوله های تخریب شده مشاهده شد. تعداد سلول های اسپرماتوسیت (شامل اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه) و اسپرماتید (شامل اسپرماتید گرد و اسپرماتید طویل) نسبت به گروه شاهد کاهش چشم گیری را نشان داد که از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). تعداد سلول های سرتولی نسبت به گروه شاهد کاهش چشم گیری یافته بود که از نظر آماری معنی دار بود. در بافت بینابینی بیضه نیز تعداد سلول های

حاوی پروتئین Bax در این مرحله به رنگ قهوه ای در می آیند. رنگ آمیزی افتراقی با همتاکسیلین هریس صورت گرفت و لام ها با استفاده از چسب انتلان چسبانده شدند.

برای تفسیر نتایج از روش استاندارد نیمه کمی H-score طبق فرمول زیر استفاده شد:

$H\text{-score} = \sum_{i=1}^n P_i(i+1)$ که در آن i معادل شدت رنگ (رنگ شدید=۳، رنگ متوسط=۲، رنگ ضعیف=۱، عدم وجود رنگ=۰)

و P_i معرف درصد هر شدت رنگ است. میلی گرم بر کیلوگرم بر روی ۵ لام از هر حیوان رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی انجام شد و پس از تعیین مراحل چرخه اسپرماتوژنز، برای هر مرحله میانگین درصد و شدت رنگ جداگانه محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت (۱۶، ۱۷). برای تعیین مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژنز از روش رایج راسل استفاده شد. طبق این روش، چرخه اسپرماتوژنز در موش ۱۲ مرحله دارد و هر مرحله دارای خصوصیات منحصر به فردی است که بر این اساس می توان مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژنز را شناسائی کرد (۲۰-۱۸).

داده های بدست آمده با آزمون های t و ANOVA تحلیل شدند. $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

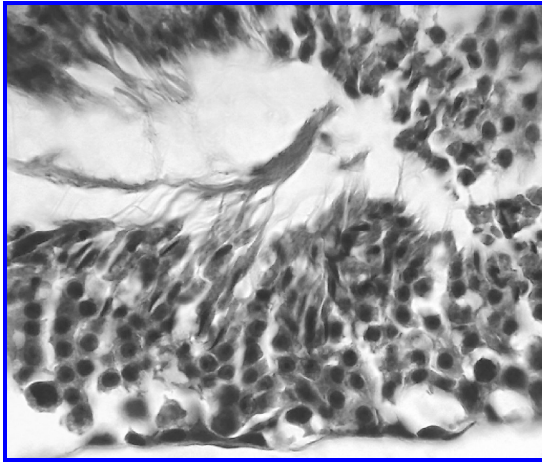
در بررسی وضعیت اسپرماتوژنز با میکروسکوپ نوری، در گروه تحت درمان با ۲ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون (T1) تغییرات هیستولوژیکی قابل توجهی مشاهده نشد. اگرچه تعداد سلول های زایا نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود، اما از نظر آماری معنی دار نبود (NS).

جدول ۱- اثر دگزامتازون بر تعداد سلول های زایا و سوماتیک بیضه (سلول سرتولی و لیدیک) در مقطع عرضی بافت بیضه موش بالغ.

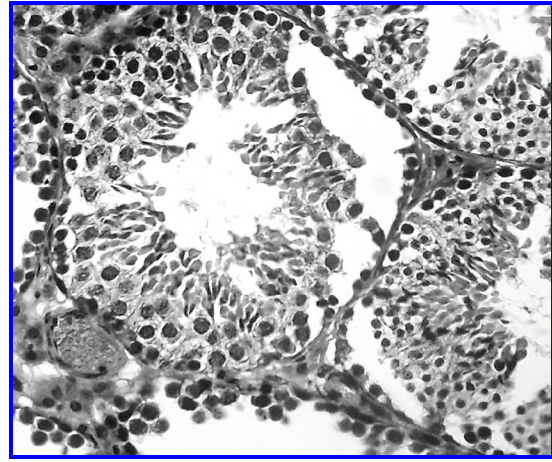
شاهد	T1	T2	T3	T4
اسپرماتوگونی	۴۶/۷±۸/۷	۴۷/۳±۱۲/۳	۴۵/۸±۱۴/۵	۴۶/۱±۲/۳
اسپرماتوسیت	۸۶/۲±۱۸/۵	۸۲/۲±۱۹/۸	۶۶/۲±۱۴/۳*	۴۴/۳±۱۲/۳*
اسپرماتید گرد	۲۶۵/۲±۵۸	۲۵۶/۶±۶۰/۵	۸۶/۲±۱۸/۵	۱۲۵±۴۶*
اسپرماتوزو	۱۴۱/۲±۲۳	۱۳۴/۲±۳۱	۱۲۰/۲±۴۱	۳۴±۱۱*
سلول سرتولی	۱۰/۸±۲/۳	۱۰/۱±۲/۳	۸/۹±۲/۳	۶/۳±۲/۳*
سلول لیدیک	۱۳/۸±۳/۳	۱۲/۶±۲/۶	۱۰/۵±۲/۳*	۴/۵±۱/۳*

* $P < 0.05$ ؛ $P < 0.01$

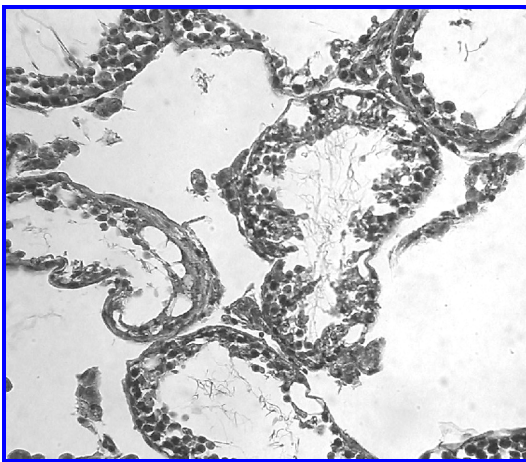
T1: گروه آزمایشی دریافت کننده ۲ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون؛ T2: گروه آزمایشی دریافت کننده ۴ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون؛ T3: گروه آزمایشی



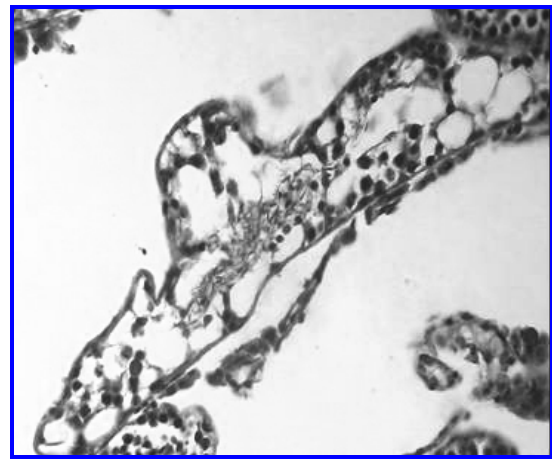
الف



ب



ج



د

شکل ۱- مقطع بافت بیضه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در گروههای آزمایش.

الف- گروه آزمایش T1: نمای بافت شناسی بیضه طبیعی به نظر می رسد (1000X).

ب- گروه آزمایش T2: کاهش تعداد سلولهای زایا نسبت به گروه قبل کاملاً مشهود است (400X).

ج- گروه آزمایش T3: آسیب لوله ها و بافت همبندی بین آنها قابل توجه است (250X).

د- گروه آزمایش T4: تخریب شدید لوله ها و بافت بینابینی مشاهده می شود. به تجمع سلولهای تمایز نیافته در قسمت مرکزی لوله توجه نمایید (1000X).

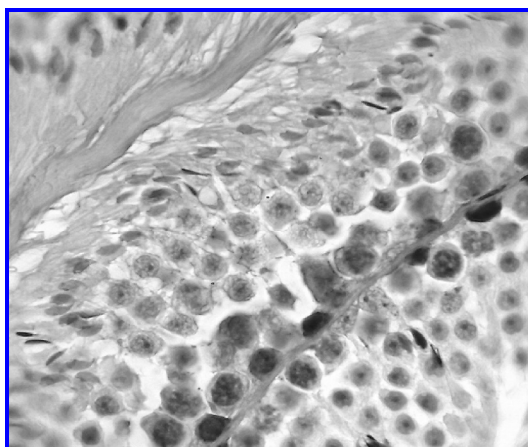
قبل از توضیح نتایج بیان پروتئین Bax به روش ایمنوهیستوشیمی لازم به ذکر است که شدت رنگ ایجاد شده با بیان پروتئین Bax نسبت مستقیم دارد، بنابراین هرچه شدت رنگ بیشتر باشد، سطح بیان پروتئین Bax نیز بالاتر است

در گروه شاهد، بیان پروتئین Bax بطور پراکنده در مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژنز و عمدتاً در سلولهای اسپرماتوگونی مشاهده شد. اسپرماتوگونیها با شدت ۳ یا ۲ درجه رنگ شده بودند و شدت رنگ در سایر سلولهای زایا ضعیف بود (شکل ۲ الف).

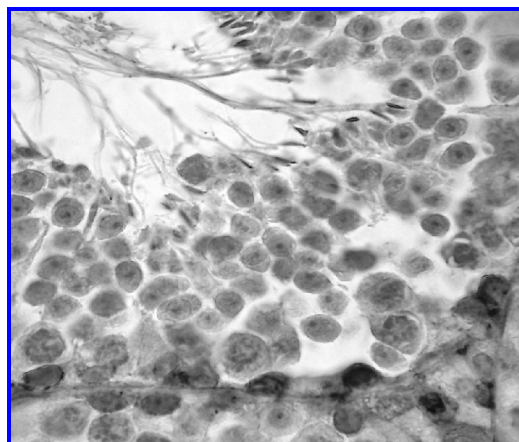
در گروه آزمایش اول (T1) الگوی بیان پروتئین Bax مشابه گروه شاهد بود، با این تفاوت که بعضی از سلولهای

لیدیک به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته بود (جدول ۱). بررسی وضعیت بلوغ اسپرماتوژنز در داخل لوله‌ها بر اساس جدول جانسون کاهش قابل ملاحظه‌ای را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (نمودار ۱).

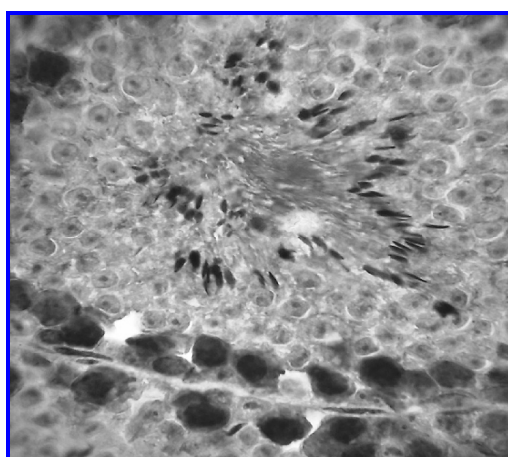
در گروهی که ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دگزامتازون (T4) دریافت کرده بودند، نمای بافت‌شناسی بیضه مشابه گروه T3 بود و تخریب شدید لوله‌های سمنیفر مشاهده شد. کاهش تعداد سلولهای زایا و سوماتیک بیضه نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود، اما نسبت به گروهی که ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند (T3) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (NS). بلوغ اسپرماتوژنز نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (نمودار ۱).



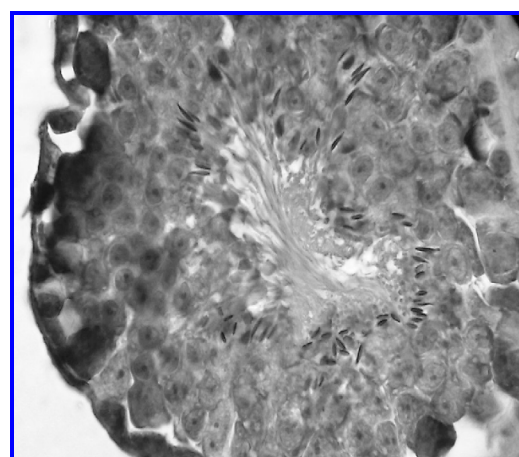
الف



ب



ج



د

شکل ۲- رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین Bax در گروههای آزمایش.

الف- گروه آزمایش T1: تنها بعضی از اسپرماتوگونیاها تعداد بسیار معدودی از اسپرماتوسیتها واکنش مثبت نشان داده اند.

ب- گروه آزمایش T2: واکنش ایمنی مثبت در انواع مختلف سلولهای زایا مشاهده می شود.

ج- گروه آزمایش T3: واکنش ایمنی مثبت در انواع مختلف سلولهای زایا با شدت بیشتری نسبت به گروه قبل مشاهده می شود.

د- گروه آزمایش T4: سلولهای زایا شدت رنگ بیشتری نسبت به گروه قبل نشان داده اند. تصاویر در مرحله I-III چرخه اسپرماتوژنز و بزرگنمایی 1000X می باشند

در گروه آزمایشی سوم (T3)، پروتئین Bax در تمام مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژنز بیان شده بود. مراحل I-III و IV-VI بیشترین حساسیت را نشان دادند (شکل ۲ ج). سلولهای اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت شدت رنگ ۳ درجه و سایر سلولها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. در مراحل VII-VIII سلولهای اسپرماتوگونی شدت رنگ ۳ درجه، اسپرماتوسیتها ۲ درجه و سایر سلولها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. الگوی بیان Bax در مرحله IX چرخه اسپرماتوژنز مشابه گروه شاهد بود. در مراحل X-XII سلولهای اسپرماتوگونی شدت رنگ ۳ درجه، اسپرماتوسیتها ۱ یا ۲ درجه و سایر سلولها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. در این گروه نیز سلولهای سرتولی رنگ نشده بودند.

اسپرماتوسیت با شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه رنگ شده بودند (شکل ۲ الف).

در گروه آزمایش دوم (T2)، پروتئین Bax عمدتاً در مراحل I-III چرخه اسپرماتوژنز بیان شده بود. در این مرحله اسپرماتوگونیها شدت رنگ ۳ درجه و سایر سلولهای زایا شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. سلولهای سرتولی رنگ نگرفته بودند. در مراحل IV-VI چرخه اسپرماتوژنز سلولهای اسپرماتوگونی با شدت ۲ یا ۳ درجه و سایر سلولهای زایا شدت رنگ ۱ درجه داشتند. الگوی بیان پروتئین Bax در سایر مراحل مشابه گروه شاهد بود (شکل ۲ ب). مقایسه میانگین H-score در مراحل I-III و IV-VI چرخه اسپرماتوژنز تفاوت معنی داری را با گروه شاهد نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۲).

مقایسه میانگین H-score با گروه شاهد افزایش شدت و درصد قابل ملاحظه بیان پروتئین Bax در تمام مراحل چرخه اسپرماتوژنز به غیر از مرحله IX را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۲).

جدول ۲ - اثر دگزامتازون بر میانگین درصد و شدت بیان پروتئین Bax بر اساس معیار H-score در سلولهای زایای اسپرم موش بالغ.

چرخه اسپرماتوژنز	شاهد	T1	T2	T3	T4
I-III	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.6	$5.1 \pm 2.1^+$	$14.7 \pm 3.2^*$	$15.3 \pm 3.8^*$
IV-VI	0.7 ± 0.3	1.1 ± 0.4	$4.6 \pm 1.3^+$	$10.7 \pm 2.8^*$	$11.2 \pm 2.9^*$
VII-VIII	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	$3.6 \pm 1^+$	$7.8 \pm 2.3^*$	$8.1 \pm 2.3^*$
IX	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.9	1.1 ± 1.3	1.1 ± 0.8
X-XII	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.3	$2.5 \pm 1.3^+$	$5.9 \pm 1.4^*$	$6.1 \pm 1.8^*$

$P < 0.05^+$; $P < 0.05^*$

T1: گروه آزمایشی دریافت کننده ۲ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون؛ T2: گروه آزمایشی دریافت کننده ۴ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون؛ T3: گروه آزمایشی دریافت کننده ۷ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون؛ T4: گروه آزمایشی دریافت کننده ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون.

در گروه آزمایشی چهارم (T4)، الگوی بیان پروتئین Bax مشابه گروه T3 بود. در مراحل I-VI سلولهای اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت شدت رنگ ۳ درجه و سایر سلولها شدت رنگ ۲ یا ۳ درجه داشتند (شکل ۲ د). در مراحل VII-VIII سلولهای اسپرماتوگونی شدت رنگ ۳ درجه، اسپرماتوسیتها ۳ درجه و سایر سلولها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. در مرحله IX چرخه اسپرماتوژنز شدت رنگ در اسپرماتوگونیها ۳ درجه، اسپرماتوسیتها ۱ درجه و اسپرماتیدها بطور ضعیف رنگ شده بودند. در مراحل X-XII سلولهای اسپرماتوگونی شدت رنگ ۳ درجه، اسپرماتوسیتها ۱ یا ۲ درجه و سایر سلولها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. در این گروه نیز سلولهای سرتولی رنگ نشده بودند. مقایسه میانگین H-score بین گروه شاهد و T4 نشان دهنده افزایش شدت و درصد معنی دار بیان پروتئین Bax در سلولهای زایا در مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژنز (بجز مرحله IX) بود (جدول ۲).

بحث

بررسی نتایج حاصل از مطالعه بافت شناسی بیانگر آسیب شدید بافت بیضه در گروههای دریافت کننده ۷ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتازون می باشد. تعداد سلولهای زایا بجز اسپرماتوگونی کاهش قابل ملاحظه ای نسبت به گروه شاهد نشان داد. در تایید یافتههای کمی، بلوغ اسپرماتوژنز نیز

کاهش معنی داری داشت. شاید بتوان کاهش سلولهای زایای لوله سمینیفروس در گروههای آزمایش را ناشی از دو مکانیسم کاهش تکثیر سلولهای زایا و افزایش مرگ سلولهای زایا دانست. البته مطالعه حاضر به طور اختصاصی تکثیر و تزاید سلولهای زایا را مورد بررسی قرار نداد، ولی با مطالعه کمی به نظر می رسد که تزاید سلولها کاهش یافته باشد که مطالعات دقیق تر و اختصاصی تر در این زمینه مورد نیاز می باشد. نتایج مطالعات Hamdy و همکارانش نشان دهنده اثر ضد میتوزی دگزامتازون بر روی سلولهای اجدادی استئوبلاست می باشد (۲۰).

مکانیسم احتمالی دیگر افزایش مرگ سلولهای زایا است. همانطور که در مقدمه ذکر شد، مرگ سلولی به دو طریق نکروز و آپوپتوز صورت می گیرد. بررسیهای بافت شناسی در مطالعه حاضر هیچگونه علائمی از التهاب و احتقان گلبولهای قرمز را نشان نداد، بنابراین احتمال نکروز بسیار ضعیف است. از طرف دیگر افزایش بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax در گروههای آزمایش، فرضیه ایجاد آپوپتوز ناشی از دگزامتازون را در سلولهای زایا تقویت می کند.

علاوه بر این Yazawa و همکارانش متوجه شدند که دگزامتازون به مقدار ۷ میلی گرم بر کیلوگرم باعث افزایش آپوپتوز در سلولهای زایا به میزان ۱۰ برابر بیشتر از گروه کنترل در موشهای صحرایی می شود (۲۱).

Gao و همکارانش در تحقیقات خود نشان دادند، افزایش در غلظت گلوکوکورتیکوئیدهای سرم ناشی از استرس منجر به مهار فعالیت آنزیمهای سازنده تستوسترون و کاهش تعداد سلولهای لیدیک می شود و در نتیجه ترشح تستوسترون کاهش می یابد (۲۲). Brenie و همکارانش نشان دادند دگزامتازون و سایر آگونیستهای صناعی گلوکوکورتیکوئیدی اثر مهاری بر تولید تستوسترون از سلولهای لیدیک بیضه در محیط کشت دارند (۲۳).

یافتههای مذکور با نتایج مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد. در مطالعه کنونی نیز کاهش سلولهای لیدیک مشاهده شد. بدیهی است که زمانی که بیضه نتواند اسپرماتوژنیز را از طریق تولید تستوسترون حمایت کند، یک مسیر پیام رسان خاصی فعال می شود که نهایتاً منجر به آپوپتوز خواهد شد. در این مطالعه مشخص شد که تجویز گلوکوکورتیکوئیدهای برونزاد (دگزامتازون) الگوی بیان پروتئین Bax را در سلولهای زایای بیضه تغییر می دهد. نتایج این تحقیق اولین گزارش را در مورد هر گونه ارتباط بین گلوکوکورتیکوئیدها و ژنهای درگیر در آپوپتوز سلولهای زایای بیضه را ارائه می دهد.

در این مطالعه ارزیابی هیستولوژیکی و بیان پروتئین Bax نشان داد که دگزامتازون فاقد اثرات واضح روی اسپرماتوگونی است و بیشترین اثرات آن بر روی اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها است. مشخص شده که سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در موارد محرومیت از آندروژن بیشترین میزان آپوپتوز را نشان می‌دهند (۲۴). در مطالعه حاضر نیز در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه بیشترین میزان آپوپتوز مشاهده شد و در بررسی بافت شناسی در اکثر برش‌های بافت بیضه سلول‌های اسپرماتوسیت از بین رفته بودند و جای خالی آنها کاملاً مشهود بود. به نظر می‌رسد دگزامتازون از طریق کاهش تستوسترون باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز و افزایش مرگ سلول‌های زایا می‌شود.

علاوه بر این، در بررسی بافت شناسی تعداد سلول‌های سوماتیک بیضه (سلول سرتولی و لیدیگ) نیز در گروه‌های آزمایش کاهش یافته بود. با توجه به اینکه ارتباط تنگاتنگ و قوی بین سلول‌های سوماتیک و سلول‌های زایای در حال تکامل وجود دارد، به نظر می‌رسد که دگزامتازون توانسته باشد از طریق اثر بر سلول‌های سوماتیک باعث کاهش سلول‌های زایای بیضه شود.

در مطالعه حاضر علیرغم کاهش تعداد سلول‌های سرتولی، بیان پروتئین Bax مشاهده نشد. این یافته نشان می‌دهد که احتمالاً سایر مسیرهای آپوپتوزی نیز بدنبال تجویز دگزامتازون فعال می‌شوند، که البته احتیاج به بررسی‌های گسترده‌تری دارد.

نتایج این تحقیق و پژوهش‌های سایر محققین (۲۶-۲۱) نشان می‌دهد که دگزامتازون احتمالاً به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم بر روی سلول‌های اسپرم ساز اثر می‌کند. در روش مستقیم از طریق تاثیر بر روی سلول‌های زایا و مهار فعالیت فیزیولوژیک آنها باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز می‌شود. در روش غیرمستقیم از طریق تخریب سلول‌های لیدیگ و کاهش سطح تستوسترون، سلول‌های زایا را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از طرف دیگر کاهش سلول‌های سرتولی می‌تواند باعث تضعیف نقش حمایتی آنها بر روی سلول‌های زایا شود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Kierszenbaum AL. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Reprod Dev* 2001;58:1-3.
2. Henriksen K, Kulmala J, Toppari J, Mehrotra K, Parvinen M. Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *J Androl* 1996;17:394-402.
3. Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both sertoli cell vimentine filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;137:42-50.
4. Allard E, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2, 5-hexandione-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;145:149-56.
5. Makoto K, Naoki I, Seiji T, Takumi S. Balanced of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl* 2003;24:185-91.
6. Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev* 2002;2:647-56.
7. Vera Y, Rodriguez S, Castanares M, Lue Y, Atienza V, Wang C, et al. Functional role of Caspases in heat-induced testicular germ cell apoptosis. *Biol Reprod* 2005;72:516-22.
8. Macky L, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signalling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435-59.
9. Gametchu B, Watson CS. Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cell line. *Cell Biochem* 2003;87:133-46.
10. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 2006;147:258-68.
11. Soleimani F, Kheirolah G, Tehrani A. Dexamethasone. *National Committee of Rational Use of Drug* 2005; 1:3-4.
12. Hess RA. Spermatogenic overview, encyclopedia of reproduction. *Cell Tissue Res* 1999;4:534-45.
13. Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testis. *Hormones* 1970;1:2-25.
14. Holstein AF, Schulze W, Breucker H. Histopathology of human testicular and epididymal tissue. In: Hargreave TB, editor. *Male infertility: histopathology of human testicular and epididymal tissue*. 2nd ed. London: Springer press; 1994. P.105-48.

15. Glander HG, Horn LC, Dorschner W, Paasch U, Kratzsch J. Probability to retrieve testicular spermatozoa in azoospermic patients. *Asian J Androl* 2002;2:199-205
16. Ariel R, Hila R, Edward Y, Jing X, Robin H, Jean S, et al. Reservatol, a natural aryl hydrocarbon receptore antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzopyrene. *Reprod Toxicol* 2001;15:479-86.
17. Judit P, Elena B, Jose L, Xavier D, David L, Montserrat R, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Modern pathol* 2005;18:719-27.
18. Russell LD, Ettlin RA, Sinha AP, Clegg ED, eds. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, IL: Cache River Press; 1990. P.87-96.
19. Weinbauer GF, Aslam H, Krishnamurthy H, Brinkworth MH, Einspanier A, Hodges JH. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high rates of spermatogenic efficacy. *Biol Reprod* 2001;64:120-26.
20. Hamdy NA. Pathophysiology of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Pharmacol* 1997;12:11-17
21. Yawaza H, Sasagawa I, Nakada T. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous Glucocorticoid in rats. *Human Reprod* 2000;156:197-205.
22. Gao HB, Tong MH, Hu HY, You HY, Guo QS, Ge RS, et al. Mechanism of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2003;199:153-63.
23. Bernier M, Gibb W, Collu R, Ducharme JR. Effect of glucocorticoids on testosterone production by porcine Leydig cells in primary culture. *Pharmacol* 1999;62:1166-69.
24. Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin- releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995;136:2770-75.
25. Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, et al. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res* 2005;322:147-53.
26. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticoid-inuced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002;9: 6-19.