

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

لعیا سادات خرسنده<sup>۱</sup>، محمود هاشمی تبار<sup>۲</sup>، محمود اوراضی زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترای بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

<sup>۲</sup> دانشیار، دکترای علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

<sup>۳</sup> 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 می‌دهند. در این مطالعه اثر دگزامتاژون، به عنوان یک ترکیب گلوکوکورتیکوئیدی پر مصرف، بر بیان پروتئین Bax در سلولهای زایای اسپرم و فرآیند اسپرماتوژنزیس در موش‌های آزمایشگاهی بررسی شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۳۵ موش بالغ نر بطور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. موش‌های گروه شاهد تنها نرمال سالین به مدت ۷ روز دریافت کردند. در گروه‌های آزمایش (T1-T4) دگزامتاژون به ترتیب با مقدار ۰، ۲، ۴، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بصورت تزریق داخل صفاقی و به مدت ۷ روز تجویز گردید. سپس موش‌ها قربانی شده و بیضه‌ها از نظر بافت‌شناسی و اینتوهیستوشیمی بررسی شدند.

**یافته‌ها:** گروه‌های دریافت کننده دگزامتاژون با دوزهای ۷ و ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلولهای سوماتیک و زایای بیضه و کاهش بلوغ اسپرماتوژن داشتند ( $P < 0.05$ ). مطالعات اینتوهیستوشیمی نشان داد که دگزامتاژون با دوزهای ۷ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش قابل ملاحظه بیان پروتئین Bax در تمام مراحل چرخه اسپرماتوژنز، بجز مرحله IX می‌شود ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد ترکیبات گلوکوکورتیکوئیدی مانند دگزامتاژون با تحت تاثیر قرار دادن پروتئین‌های پیش آپوپتوزی نظیر پروتئین Bax باعث ایجاد آپوپتوز و اختلال در روند اسپرماتوژن در موش‌های آزمایشگاهی می‌شوند.

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

### مقدمه

آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) یک فرایند سلولی است که به طور معمول در بیضه پستانداران دیده می‌شود (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 سلولهای زایای اسپرم می‌شوند. این عوامل شامل تابش اشعه X (۲)، مواد سمی و بعضی از داروها می‌باشند (۳،۴). افزایش آپوپتوز در سلولهای زایا حالت تعادل بین تکثیر و مرگ سلولهای زایا را از بین می‌برد و منجر به اختلال در روند اسپرماتوژن می‌گردد (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

## بیان پروتئین Bax در آپوپتوز ناشی از دگزاماتازون

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 دگزاماتازون 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) مقاطعی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. از هر بیضه ۸ اسلاید انتخاب و به طریق هماتوکسیلین- اثوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ در مقطع عرضی ۲۰ لوله سمینیفروس 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 بیضوی شکل یا در مقطع طولی بودند مورد شمارش قرار نمی‌گرفتند. جهت شمارش سلولی از میکروسکوپ نوری المپوس با بزرگنمائی ۴۰۰ و هم‌چنین مشخصات مورفولوژیک سلولی استفاده شد (۱۲).

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

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

برش‌های ۵ میکرومتری ابتدا پارافین گیری 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-(Santa Cruz 7480) 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 کوتزروگه به آنزیم پراکسیداز (SC-2017, Santa Cruz) به نمونه‌ها اضافه شد. پس از شست و شو با بافر فسفات، نمونه‌ها در معرض سوبسترات دی‌آمینوبنزویدین (DAB) برای ۸ دقیقه قرار گرفتند. محل‌های

خانواده پروتئین‌های Bcl-2 نقش کلیدی در تنظیم فرآیند آپوپتوز بازی می‌کنند. پروتئین Bax یکی از اعضاء خانواده Bcl-2 می‌باشد که عنوان 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).

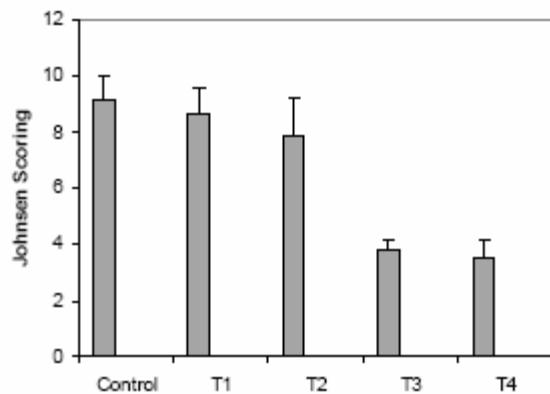
مطالعات نشان داده‌اند که گلوکوکورتیکوئیدها با اثر بر روی هیبوفیز قدامی و بیضه باعث مهار ترشح تستوسترون می‌شوند (۸). سطح تستوسترون خون توسط عمل استروئیدسازی سلول‌های لیدیگ بیضه تعیین می‌شود. سلول‌های لیدیگ گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدها را سنتز کرده، بنابراین اولین هدف عمل گلوکوکورتیکوئیدها بر بافت بیضه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

دريافت كننده ۷ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون، T4 گروه آزمائي دريافت كننده ۱۰ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون، در گروهی که ۴ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون (T2) دريافت كرده بودند، در بعضی از لوله های منی ساز، لایه های اپيتيلیوم کاهش يافته بود و بين سلول های زايا و اکوئول هایي که نشان دهنده مرگ سلولی بود مشاهده گردید (شکل ۱). در مشاهدات ميكروسكوبی، سلول های اسپرماتوسیت بيشترین میزان تخریب را نشان دادند و تعداد آنها نسبت به گروه شاهد کاهش قابل ملاحظه ای را نشان داد. تعداد سلول های اسپرماتوگونی و اسپرماtid تغيير چشمگیری 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 ليديگ کاهش معنی داری يافته بود (جدول ۱). بررسی وضعیت بلوغ اسپرماتوژن 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 دگزاماتازون بر روی بلوغ اسپرماتوژن در گروههای شاهد و آزمایش بر اساس روش درجه بندی جانسن.**

اعداد به صورت میانگین $\pm$  انحراف معیاریان شده اند.  $P<0.05$ .

در گروه تحت درمان با ۷ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون (T3) بعضی از لوله های سمنینیفر بكلی 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 اسپرماtid (شامل اسپرماtid گرد و اسپرماtid طویل) نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری را نشان داد که از نظر آماری معنی دار بود ( $P<0.05$ ). تعداد سلول های سرتولی نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری يافته بود که از نظر آماری معنی دار بود. در بافت بینابینی بيضه نيز تعداد سلول های

حاوي پروتئين Bax در اين مرحله به رنگ قهوه ای در می آيند. رنگ آميزي افتراقی با هماتوكسيليin هریس صورت گرفت و لامها با استفاده از چسب انتلان چسبانده شدند.

برای تفسير نتایج از روش استاندارد نيمه کمی H-score طبق فرمول زير استفاده شد:

$$\text{H-score} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i}{\sum_{i=1}^n R_i}$$

که در آن  $P_i$  معادل شدت رنگ (رنگ شديد=۳، رنگ متوسط=۲، رنگ ضعيف=۱)، عدم وجود رنگ=۰) و  $R_i$  معرف درصد هر شدت رنگ است. ميلى گرم بر كيلوگرم بر روی ۵ لام از هر حيوان رنگ آميزي ايمونوهيستوشيمی انجام شد و پس از تعیین مراحل چرخه اسپرماتوژن، برای هر مرحله ميانگين درصد و شدت رنگ جداگانه محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت (۱۶، ۱۷). برای تعیین مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژن از روش رايچ راسل استفاده شد. طبق اين روش، چرخه اسپرماتوژن در موش ۱۲ مرحله دارد و هر مرحله داراي خصوصيات منحصر به فردی است که بر اين اساس می توان مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژن را شناسائی کرد (۱۸-۲۰).

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

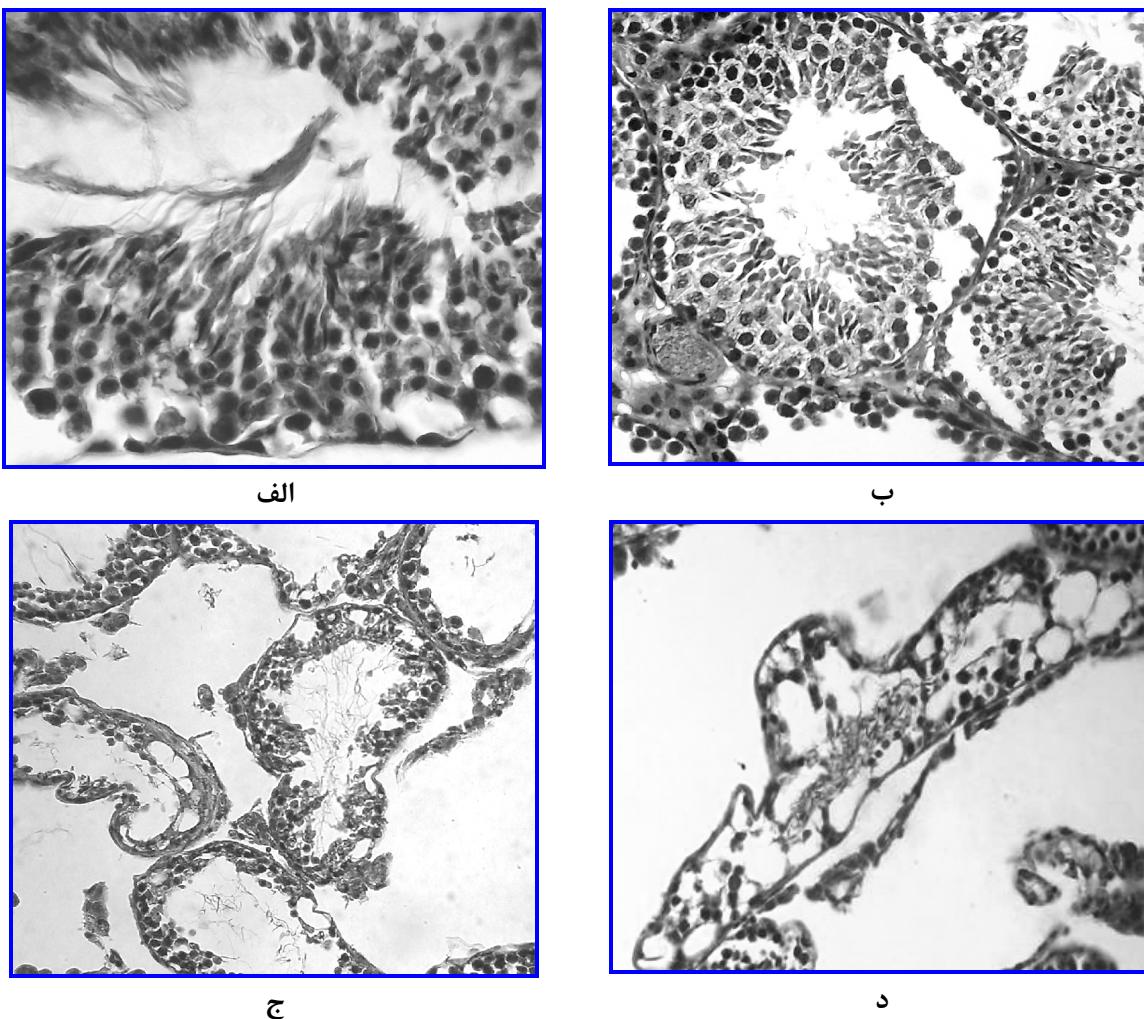
## يافته ها

در بررسی وضعیت اسپرماتوژن با ميكروскоп نوري، در گروه تحت درمان با ۲ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون (T1) تغييرات هيستولوژيکی قابل توجهی مشاهده نشد. اگرچه تعداد سلول های زايا نسبت به گروه شاهد کاهش يافته بود، اما از نظر آماری معنی دار نبود (NS).

**جدول ۱- اثر دگزاماتازون بر تعداد سلول های زايا و سوماتيك بيضه (سلول سرتولی و ليديگ) در مقطع عرضی بافت بيضه موش بالغ.**

	T4	T3	T2	T1	شاهد
اسپرماتوگونی	۴۶/۱ $\pm$ ۲/۳	۴۵/۷ $\pm$ ۹/۵	۴۵/۸ $\pm$ ۱۴/۵	۴۷/۳ $\pm$ ۱۲/۳	۴۶/۷ $\pm$ ۸/۷
اسپرماتوسیت	۴۰/۶ $\pm$ ۳۹/۷ <sup>†</sup>	۴۴/۳ $\pm$ ۱۲/۴ <sup>†</sup>	۶۶/۲ $\pm$ ۱۴/۳ <sup>*</sup>	۸۲/۲ $\pm$ ۱۹/۸	۸۶/۲ $\pm$ ۱۸/۸
اسپرماtid	۱۱۹/۵ $\pm$ ۴۳/۵ <sup>†</sup>	۱۲۵ $\pm$ ۴۶ <sup>†</sup>	۲۶۵/۲ $\pm$ ۵۸	۸۶/۲ $\pm$ ۱۸/۵	۲۵۶/۶ $\pm$ ۶/۵
سلول	۳۱/۸ $\pm$ ۹/۳ <sup>†</sup>	۳۴ $\pm$ ۱۱ <sup>†</sup>	۱۲۰/۲ $\pm$ ۴۱	۱۳۴/۲ $\pm$ ۳۱	۱۴۱/۲ $\pm$ ۲۲
سرتولی	۶/۳ $\pm$ ۲/۳ <sup>*</sup>	۶/۹ $\pm$ ۱/۲*	۸/۹ $\pm$ ۲/۳	۱۰/۱ $\pm$ ۲/۳	۱۰/۸ $\pm$ ۲/۲
سلول ليديگ	۱۳/۸ $\pm$ ۲/۳	۱۲/۶ $\pm$ ۲/۶	۱۰/۵ $\pm$ ۲/۳ <sup>†</sup>	۴/۸ $\pm$ ۰/۸ <sup>†</sup>	۴/۵ $\pm$ ۱/۳ <sup>†</sup>

$P<0.05$ ;  $P<0.01$ .  
T1: گروه آزمایشي دريافت كننده ۲ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون؛ T2 گروه آزمایشي دريافت كننده ۴ ميلى گرم بر كيلوگرم دگزاماتازون؛ T3 گروه آزمایشي



شکل ۱- مقطع بافت بیضه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین 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 بینایی مشاهده می شود. به تجمع سلولهای تمایز نیافته در قسمت مرکزی لوله توجه نمایید (1000X).

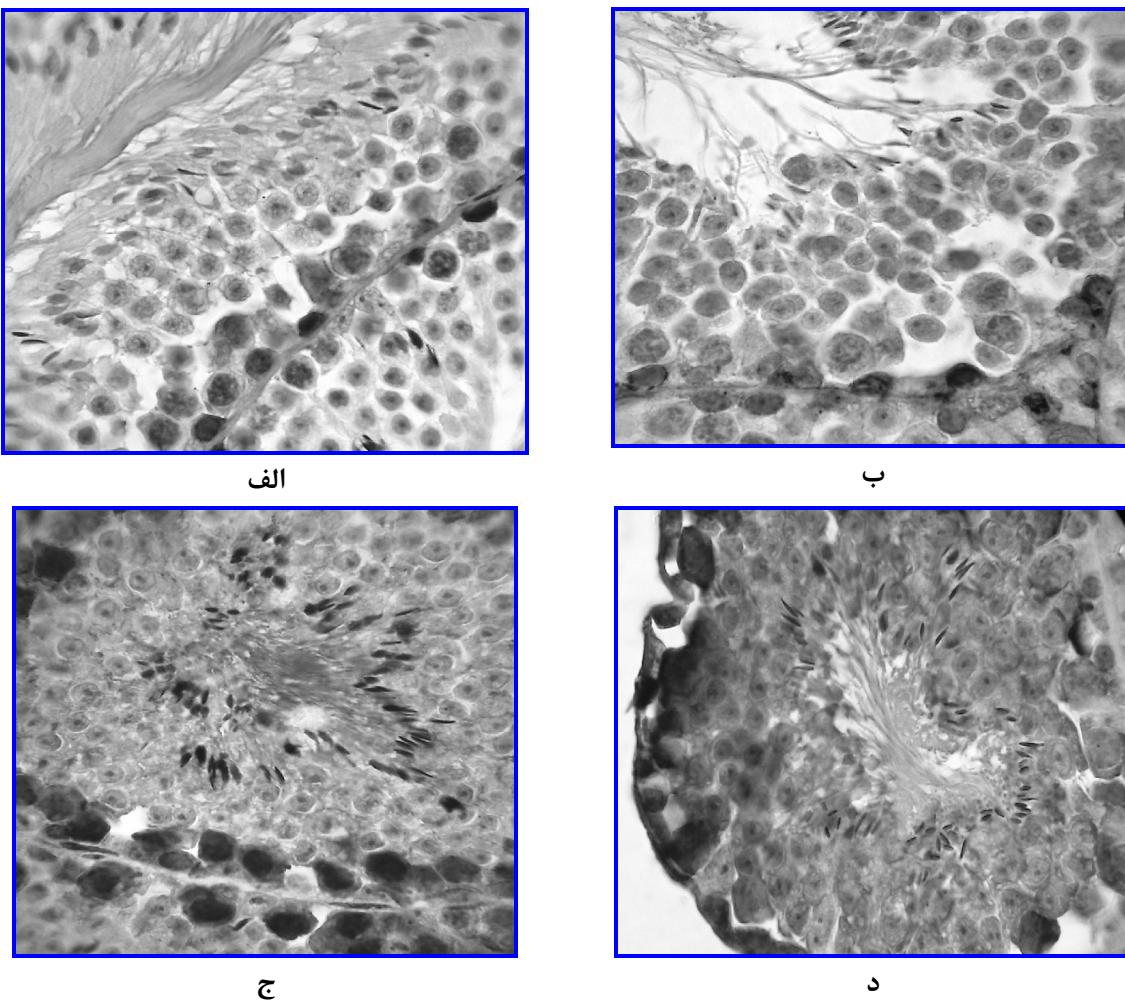
قبل از توضیح نتایج بیان پروتئین Bax به روش ایمنوهیستوشیمی لازم به ذکر است که شدت رنگ ایجاد شده با بیان پروتئین Bax نسبت مستقیم دارد، بنابراین هرچه شدت رنگ بیشتر باشد، سطح بیان پروتئین Bax نیز بالاتر است

در گروه شاهد، بیان پروتئین Bax بطور پراکنده در مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژنر و عمدتاً در سلولهای اسپرماتوگونی مشاهده شد. اسپرماتوگونی ها 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

لیدیگ به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش یافته بود (جدول ۱). بررسی وضعیت بلوغ اسپرماتوژنر در داخل لوله ها بر اساس جدول جانسون کاهش قابل ملاحظه ای را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (نمودار ۱).

در گروهی که ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دگزامتاژون (T4) دریافت کرده بودند، نمای بافت شناسی بیضه مشابه گروه T3 بود و تخریب شدید لوله های سمینیفر مشاهده شد. کاهش تعداد سلولهای زایا و سوماتیک بیضه نسبت به گروه شاهد معنی دار بود، اما نسبت به گروهی که ۷ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند (T3) تفاوت معنی داری مشاهده نشد (NS). بلوغ اسپرماتوژنر نیز کاهش قابل ملاحظه ای را نشان داد (نمودار ۱).



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

الف- گروه آزمایش T1 : تنها بعضی از اسپرماتوگونیها تعداد بسیار معددودی از اسپرماتوسیتها و اکنش 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 اسپرماتوژن و بزرگنمائی 1000X می باشند

در گروه آزمایشی سوم (T3)، پروتئین Bax در تمام مراحل مختلف چرخه اسپرماتوژن 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 اسپرماتوژن 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 عمدها در مراحل I-III چرخه اسپرماتوژن 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 اسپرماتوژن 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 اسپرماتوژن تفاوت معنی داری را با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲).

## بیان پروتئین Bax در آپوپتوz ناشی از دگزامتاژون

کاهش معنی داری داشت. شاید بتوان کاهش سلول های زایا لوله سمینیفروس در گروه های آزمایش را ناشی از دو مکانیسم کاهش تکثیر سلول های زایا و افزایش مرگ سلول های زایا دانست. البته مطالعه حاضر به طور اختصاصی تکثیر و ترازید سلول های زایا را مورد بررسی قرار نداد، ولی با مطالعه کمی به نظر رسید که ترازید سلول های 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 دگزامتاژون بر روی سلول های اجدادی استئوبلاست می باشد (۲۰).

مکانیسم احتمالی دیگر افزایش مرگ سلول های زایا است. همانطور که در مقدمه ذکر شد، مرگ سلولی به دو طریق نکروز و آپوپتوz صورت می گیرد. بررسی های بافت شناسی در مطالعه حاضر هیچگونه علامتی از التهاب و احتقان گلبول های قرمز را نشان نداد، بنابراین احتمال نکروز بسیار ضعیف است. از طرف دیگر افزایش بیان پروتئین پیش آپوپتوzی Bax در گروه های آزمایش، فرضیه ایجاد آپوپتوz ناشی از دگزامتاژون را در سلول های زایا تقویت می کند.

علاوه بر این Yazawa و همکارانش متوجه شدند که دگزامتاژون به مقدار ۷ میلی گرم بر کیلو گرم باعث افزایش آپوپتوz در سلول های زایا به میزان ۱۰ برابر بیشتر از گروه کنترل در موضعی صحرائی می شود (۲۱).

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

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

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

**جدول ۲** - اثر دگزامتاژون بر میانگین درصد و شدت بیان پروتئین Bax بر اساس معیار H-score در سلول های زایای اسپرمه موش بالغ.

چرخه اسپرما توژن	شاهد	T4	T3	T2	T1
I-III		$15 \pm 3/8^*$	$14/7 \pm 3/2^*$	$5/1 \pm 2/1^+$	$1/2 \pm 0/6$
IV-VI		$11/2 \pm 2/9^*$	$10/7 \pm 2/8^*$	$4/6 \pm 1/3^+$	$1/1 \pm 0/4$
VII-VIII		$8/1 \pm 2/3^*$	$7/8 \pm 2/3^*$	$3/6 \pm 1^+$	$0/9 \pm 0/2$
IX		$1/1 \pm 0/8$	$1/1 \pm 1/3$	$1/1 \pm 0/9$	$1/1 \pm 0/5$
X-XII		$6/1 \pm 1/8^*$	$5/9 \pm 1/4^*$	$2/5 \pm 1/3^+$	$0/8 \pm 0/3$

\*:  $P < 0.05$ ; T1: گروه آزمایشی دریافت کننده ۲ میلی گرم بر کیلو گرم دگزامتاژون؛ T2: گروه آزمایشی دریافت کننده ۴ میلی گرم بر کیلو گرم دگزامتاژون؛ T3: گروه آزمایشی دریافت کننده ۷ میلی گرم بر کیلو گرم دگزامتاژون؛ T4: گروه آزمایشی دریافت کننده ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم دگزامتاژون.

در گروه آزمایشی چهارم (T4)، الگوی بیان پروتئین Bax مشابه گروه T3 بود. در مراحل I-VI سلول های اسپرما توگونی و اسپرما توسیت شدت رنگ ۳ درجه و سایر سلول ها شدت رنگ ۲ یا ۳ درجه داشتند (شکل ۲ د). در مراحل VII-VIII سلول های اسپرما توگونی شدت رنگ ۳ درجه، اسپرما توسیت ها ۳ درجه و سایر سلول ها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. در مرحله IX چرخه اسپرما توژن شدت رنگ در اسپرما توگونی ها ۳ درجه، اسپرما توسیت ها ۱ درجه و اسپرما تویدها بطور ضعیف رنگ شده بودند. در مراحل X-XII سلول های اسپرما توگونی شدت رنگ ۳ درجه، اسپرما توسیت ها ۱ یا ۲ درجه و سایر سلول ها شدت رنگ ۱ یا ۲ درجه داشتند. در این گروه نیز H-score 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 سلول های زایا در مراحل مختلف چرخه اسپرما توژن (جز مرحله IX) بود (جدول ۲).

## بحث

بررسی نتایج حاصل از مطالعه بافت شناسی بیانگر آسیب شدید بافت بیضه در گروه های دریافت کننده ۷ و ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم دگزامتاژون می باشد. تعداد سلول های زایا بجز اسپرما توگونی کاهش قابل ملاحظه ای نسبت به گروه شاهد نشان داد. در تایید یافته های کمی، بلوغ اسپرما توژن نیز

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 دگرامتاژون فعال می‌شوند، که البته احتیاج به بررسی‌های گستردۀ‌تری دارد.

نتایج این تحقیق و پژوهش‌های سایر محققین (۲۱-۲۶) نشان می‌دهد که دگرامتاژون 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 اسپرماتوژن 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

نویسندها 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. 2<sup>nd</sup> ed. London: Springer press; 1994. P.105-48

در این مطالعه ارزیابی هیستولوژیکی و بیان پروتئین Bax نشان داد که دگرامتاژون قادر 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 دگرامتاژون از طریق کاهش تستوسترون باعث اختلال در روند اسپرماتوژن 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 دگرامتاژون توانسته باشد از طریق اثر بر سلول‌های سوماتیک باعث کاهش سلول‌های زایای بیضه شود.

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 receptor 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;15:197-205.
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-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002;9:6-19.