

بررسی آثار تابش لیزر کم توان گالیوم - آلومینیوم - آرسناید (۸۳۰ نانومتر) بر خصوصیات کیفی و فراساختاری اپی تلیوم مجاری منی ساز

✉ معصومه فخرطه ^{M.Sc.}، مجتبی رضا زاده و لوجردی ^{Ph.D.}، تقی طریحی ^{Ph.D.}*

* گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: آذر ماه ۸۱، تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۸۱

چکیده

هدف: بررسی تغییرات کیفی اپی تلیوم مجاری منی ساز پس از تابش لیزر گالیوم - آلومینیوم - آرسناید ۸۳۰ نانومتر. **مواد و روشها:** رت های شصت روزه نژاد Sprague - Dawley به طور تصادفی در گروه های کنترل، تجربی ۱ و تجربی ۲ توزیع شدند. قطب تحتانی بیضه های چپ تراشیده شده، شسته و علامت گذاری شد و طی ۱۵ روز در معرض تابش لیزر قرار گرفت. مجموع دانسیته های انرژی در این گروه ها به ترتیب ۰، ۲۸/۰۵ (J/cm²) و ۴۶/۸۰ (J/cm²) بود. نمونه ها ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تابش برداشته شدند و پس از تثبیت در گلو تارالدئید ۲/۵ درصد و طی مراحل آماده سازی بافتی، با تهیه مقاطع نازک و فوق نازک برای بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی آماده شدند.

یافته ها: در گروه تابشی ۲۸/۰۵ (J/cm²) روند اسپرماتوژنز طبیعی و فراساختار کلیه سلولها مانند گروه کنترل بود، اما در گروه تابشی ۴۶/۸۰ (J/cm²) تغییرات کیفی وسیعی در اپی تلیوم به صورت ضخیم و نامنظم شدگی تیغه قاعده ای، واکتولیزیشن و بروز کلاسترهای لیزوزوم در سلولهای سرتولی، ریزش سلولهای جنسی نابالغ، اختلال در مراحل تکامل اسپرماتید و افزایش در اسپرماتیدهای دژنره و گامت های غیرطبیعی بروز کرد.

نتیجه گیری: تابش دوزهای پایین لیزر مسبب آثار تحریکی در روند اسپرماتوژنز و افزایش سلولهای جنسی با فراساختار طبیعی است، در حالی که دوزهای بالاتر از آستانه تحریک زیستی سبب بروز ضایعات مشخصی در تکامل اسپرماتوزوئید شده، یک عامل مخرب در اسپرماتوژنز محسوب می شود.

واژه های کلیدی: اپی تلیوم مجرای منی ساز، تابش لیزر، گالیوم - آلومینیوم - آرسناید (۸۳۰ نانومتر)، تغییرات کیفی، فراساختار

مقدمه

با وجود پیشرفتهای اخیر لیزر درمانی مطالعات انجام شده در خصوص تأثیر تابش لیزر بر سیستم تناسلی و به خصوص روند اسپرماتوژنز بسیار محدودند. از طرفی مطالعات بیشتر جنبه *in vitro* داشته و مطالعات *in vivo* کمی در دسترس است. مطالعات *in vitro* در زمینه تأثیر بیولوژیک لیزر کم توان، نشان می دهد که پس از تابش لیزر تحرک کلی اسپرم افزایش می یابد [۵، ۶ و ۷]. شواهدی نیز وجود دارد که نشان می دهد تابش لیزر در محیط کشت سبب تسریع انتقال کلسیم در سلولهای اسپرم شده، موجب تغییراتی در غلظت کلسیم

تابش لیزر سبب القای آثاری بر ساختمانهای بیولوژیک مختلف می شود [۱]. از جمله گزارشها و شواهد آزمایشگاهی در مورد آثار بیولوژیک و فیزیولوژیک اشعه لیزر شامل اثرهای Photobiomodulatory تابش لیزر روی تزاید سلولی و تحریک رشد سلولی در بافتهایی از قبیل پیوندی، تاندون و استخوان [۲ و ۳] و افزایش و تسریع در سنتز پروتئین، ATP، RNA و DNA [۴] است.

✉ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵ Email:Thah_TWU73@Yahoo.com

روزه نژاد Sprague-Dawley انتخاب و به طور تصادفی در گروههای شاهد، تجربی ۱ و تجربی ۲ توزیع شدند و در تمام طول دوره تحقیق تحت شرایط یکسان و استاندارد نور، تهویه، تغذیه و دما قرار گرفتند.

دستگاه مورد استفاده در این بررسی یک لیزر دیودی گالیوم - آلومینیوم - آرسناید مدل - Endolaser, 476, Enraf Nonius ساخت هلند و کالیبره شده توسط شرکت سپهران بود. خصوصیات کامل دستگاه در جدول زیر خلاصه شده است.

جدول ۱. خصوصیات دستگاه لیزر مورد استفاده

نام دستگاه و طول موج پرتو	ایود نیمه هادی گالیوم-آلومینیوم-آرسناید ۸۳۰ نانومتر
ماکزیمم قدرت خروجی دستگاه	۳۰ میلی وات
قدرت مورد استفاده	۲۵٪ قدرت ماکزیمم
نوع پرتو مورد استفاده	پالس
فرکانس و دیوریشن پالس	۳۰۰ هرتز و ۱/۷ میلی سکند
قطر و سطح مقطع پرتو	۴ میلی متر و ۱۲۵۶/۰ سانتی متر مربع

قبل از شروع دوره درمان، پوست سمت خارج قطب تحتانی بیضه چپ رت ها تراشیده و شسته شد و محیط این ناحیه توسط جوهر هندی مشخص گردید. به علاوه در آغاز هر جلسه درمانی نیز برای کاهش انعکاس پرتوهای لیزر ناحیه درمان مجدداً تراشیده و با الکل ۷۰ درصد تمیز شد. رت ها به طریقه مناسب و بدون وارد شدن استرس توسط یک دست ثابت شدند و تحریک نقطه ای لیزر را از طریق پراب که عمود بر مرکز حقیقی موضع مشخص شده و تا حد ممکن نزدیک پوست قرار داشت، دریافت نمودند. تابش لیزر از سن ۶۱ روزگی رت ها آغاز و به مدت ۱۵ روز بین ساعت ۹/۵-۸/۵ صبح تکرار شد. در این تحقیق از ۲۵ درصد قدرت ماکزیمم دستگاه استفاده و دانسیته انرژی در هر جلسه درمانی برای گروههای شاهد و تجربی ۱ و ۲ به ترتیب ۰ و ۱/۸۷ و ۳/۱۲ ژول بر سانتی متر مربع تعیین شد. به این ترتیب زمان تابش برای گروههای تجربی ۱ و ۲ توسط دستگاه و به طور اتوماتیک روی ۶۷ و ۱۱۷ ثانیه تنظیم شد. در مورد گروه کنترل نیز برای تحمل استرس مشابه، دیود به صورت خاموش و به مدت ۹۲ ثانیه استفاده گردید.

سیتوپلاسمی می شود و تغییرات فوق در اسپرما توزوئیدها نقش تنظیمی در کنترل تحرک و واکنش اکروزومی دارد و پتانسیل باروری را در آنها می افزاید و در سلولهای دیگر سبب تشدید میتوز می شود [۸ و ۹]. از طرفی مطالعات *in vivo* نشان دهنده افزایش فعالیت استروئیدوژنیک سلولهای لیدیگ به دنبال تابش لیزر کم توان هلیوم - نئون به همراه لیزر مادون قرمز ۹۰۴ نانومتر است [۱۰]. مطالعاتی که توسط Bermudez در سالهای ۱۹۹۱ و ۱۹۹۳ در زمینه اثرهای فوری و تأخیری لیزر مادون قرمز ۹۰۴ نانومتر با دانسیته های ۲۸/۰۵ و ۴۶/۸۰ ژول بر سانتی متر مربع روی سیکل اپی تلیموم مجاری منی ساز صورت گرفته نیز بیانگر آن است که تابش لیزر تغییراتی را به صورت افزایش در محتوای DNA سلولهای جنسی ایجاد می کند که به سه فاکتور نوع سلول، فاز سیکل سلولی و دوز به کار رفته بستگی دارد [۱۱ و ۱۲].

ما نیز در گزارش قبلی خود با بررسی اپی تلیموم مجاری منی ساز پس از تابش لیزر کم توان گالیوم - آلومینیوم - آرسناید ۸۳۰ نانومتر در سطح LM نشان دادیم که تابش لیزر سبب القای تغییرات مورفولوژیک و مورفومتریک در اپی تلیموم می شود و این تغییرات ارتباط قطعی با دانسیته انرژی به کار رفته دارد، به طوری که با به کار بردن دانسیته کلی $28/05 \text{ J/cm}^2$ ، اثر تحریک زیستی لیزر به صورت افزایش در تعداد انواع سلولهای جنسی و با به کار بردن همین پرتوها با پارامترهای مشابه اما دانسیته کلی $(46/80 \text{ J/cm}^2)$ آثار تخریبی روی اپی تلیموم مجاری منی ساز مشاهده شد [۱۲].

در هر حال، با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی در زمینه تغییرات کیفی سلولهای جنسی و سلولهای سرتولی پس از تابش لیزر به خصوص در سطح EM ارائه نشده است، در پاسخ به این سؤال که "آیا سلولهای تولید شده در اپی تلیموم مجاری منی ساز گروههای کنترل و تابش لیزر از ویژگیهای فراساختاری طبیعی و یکسانی برخوردارند؟" خلاء مشخصی احساس می گردد. بنابراین در بررسی حاضر به بررسی دقیق تری در این زمینه به ویژه با روش TEM پرداخته شده است.

مواد و روشها

برای انجام تحقیق حاضر تعداد ۱۵ سررت نر شصت

نمونه‌برداری ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تابش صورت گرفت. به این منظور رت‌ها توسط دوز بالای اتر بیهوش شدند و با ایجاد برش روی اسکروتوم و فاسیاهای طناب اسپرماتیک ثبوت بافت بیضه چپ توسط متد Simply organ fixation و با پرفیوژن گلو تارالدئید از طریق شریان تستیکولار حاصل و پس از برداشتن بیضه، نمونه‌هایی به ابعاد یک میلی‌متر از موضع تابش دیده جدا شد. سپس مراحل ثبوت اولیه توسط گلو تارالدئید ۲/۵ درصد، ثبوت ثانویه با تترا اکسیداسمیوم ۱ درصد، آبیگری تدریجی، ارتشاع با رزین و قالب‌گیری قطعات بافتی انجام شد و پس از اصلاح قالبها عمل برش‌گیری توسط دستگاه اولترا میکروتوم صورت گرفته، برشهای نیمه نازک به ضخامت یک میکرون و برشهای فوق نازک به ضخامت ۳۵ تا ۵۰ نانومتر تهیه گردید. قابل ذکر است که برشها از نواحی از بلوک بافتی تهیه شد که در آنها مجاری منی‌ساز مراحل VII و VIII سیکل سلولی به چشم می‌خورد.

برشهای نیمه نازک توسط تولوئیدین بلو و برشهای فوق نازک توسط استات یورانیل و سیترات سرب رنگ‌آمیزی و آماده بررسیهای هستولوژیک شدند.

یافته‌ها

در مطالعات هستولوژیک مقاطع نیمه نازک توسط میکروسکوپ نوری، بیضه‌های گروه کنترل و گروه تابشی ($28/05 \text{ J/cm}^2$) ظاهر طبیعی داشته، شامل مجاری منی‌ساز و بافت بینابینی طبیعی بودند. اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز کاملاً یکدست، فاقد شکاف و عاری از هرگونه ریزش سلولی بوده، سلولهای جنسی و سرتولی را شامل می‌شد. در بررسی تصاویر مربوط به مراحل VII و VIII سیکل سلولی بیضه‌های این دو گروه در مقایسه با گروه تابشی ($46/80 \text{ J/cm}^2$) واکوئل چندانی در اپی‌تلیوم به چشم نمی‌خورد اما اجسام و گرانولهای متراکم که احتمالاً مربوط به اجسام باقیمانده فاگولیزوزومها در مراحل مختلف تجزیه بودند، به ویژه در گروه تابشی ($28/05 \text{ J/cm}^2$) به فراوانی قابل مشاهده بود (شکل ۱).

بر خلاف دو گروه ذکر شده، در بیضه‌های گروه تابش با دوز کلی ($46/80 \text{ J/cm}^2$)، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در اپی‌تلیوم

طبیعی و کمپلکسهای سیناپسی متعدد به وضوح قابل مشاهده بود، با این وجود سیتوپلاسم این سلولها نیز واکوئلها متعددی را نشان داد.

بیشترین تغییرات فراساختاری در پی تابش دوز $46/80 \text{ J/cm}^2$ متوجه سلولهای اسپرماتید در حال تکامل بود. به نحوی که در سیتوپلاسم این سلولها علاوه بر بروز واکوئلهای متعدد، میتوکندریهایی با اشکال کروی، متورم و فاقد کریستاهای طبیعی به چشم می خورد (شکل ۵). اختلال در مراحل اسپرمیوژنز و عدم بلوغ طبیعی اسپرماتیدها نیز از یافته های قابل توجه دیگر در میکروگرافهای این گروه بود و برخی از اسپرماتیدهای گرد نابالغ در مراحل مختلف تکامل خود به درون لومن مجاری منی ساز آزاد شده بودند (شکل ۶). عدم تراکم کافی و مناسب هسته، عدم تجمع مناسب میتوکندریها در نواحی تشکیل دم، ایجاد فاصله بین هسته و غشای داخلی اکروزوم و عدم تشکیل غلاف میتوکندریایی قطعه میانی دم از مواردی بود که در برخی از اسپرماتیدهای این گروه مشاهده شد. در دسته دیگری از اسپرماتیدها نیز هتروکروماتین شدید و چروکیدگی در هسته به چشم می خورد که بیانگر وجود تعداد فراوانی از اسپرماتیدهای دژنره در مجاری منی ساز این گروه بود.

در کنار موارد ذکر شده، در اپی تلیوم مجاری منی ساز این گروه اسپرماتیدهای غیرطبیعی واجد اشکال دو سر یا سرهای متصل به هم و دم های غیرطبیعی نیز مشاهده شد و به نظر می رسد که بیشترین درصد غیرطبیعی بودن در اسپرمهای این گروه در ناحیه دم و به خصوص قطعه میانی رخ داده است چرا که میتوکندریهای این ناحیه نه تنها از ظاهر طبیعی مارپیچی همانند گروه های قبل برخوردار نبودند و متورم و فاقد کریستا به نظر می رسیدند، بلکه تجمع آنها در برخی از مقاطع قطعه میانی دم نامناسب و پراکنده بود.

بحث

براساس نتایج پژوهش حاضر فراساختار سلولهای جنسی و سرتولی در اپی تلیوم مجاری منی ساز دو گروه کنترل و تابش لیزر با دوز کلی $28/05 \text{ J/cm}^2$ کاملاً مشابه یکدیگر و پدیده

اسپرماتوگونی ها در بخش قاعده ای اپی تلیوم بر روی تیغه قاعده ای قرار گرفته بودند و سلولهای اسپرماتید نیز به طور طبیعی و با آرایش خاصی در اپی تلیوم مشاهده شدند. بلوغ اسپرماتیدها در مجاری منی ساز این گروه از روند طبیعی برخوردار بود، به طوری که اسپرماتیدهای مجاری مختلف مراحل متنوع فاز گلژی، فاز کلاهکی، فاز اکروزومی و تشکیل کلاهک اکروزومی را نشان می دادند. علاوه بر این در اسپرماتیدهای مختلف تشکیل منشست توبول، طویل شدگی اسپرماتید، مراحل تشکیل دم و تجمع میتوکندریها جهت تشکیل غلاف میتوکندریایی قطعه میانی دم اسپرم به چشم می خورد و قابل ذکر است که میتوکندریهای سلولهای جنسی این گروه ها، حاوی کریستاهای طبیعی بودند. در بخش سطحی اپی تلیوم مجاری منی ساز دو گروه فوق سراسپرماتیدهای بالغ به صورت فرورفته در رسس های سیتوپلاسم سلولهای سرتولی و در سیتوپلاسم این نواحی تجمع لیزوزومها، گرانولهای رنگ پذیر و شبکه اندوپلاسمی صاف مشاهده شد (شکل ۳).

بر خلاف دو گروه ذکر شده که در یک جمع بندی کلی از ماهیت فراساختاری طبیعی در اپی تلیوم مجاری منی ساز برخوردار بودند، در مجاری منی ساز گروه تابشی $46/80 \text{ J/cm}^2$ تغییرات چشمگیری حادث گشت (شکل های ۴، ۵ و ۶). در این گروه تیغه قاعده ای نسبتاً ضخیم، نامنظم و غیر یکنواخت بود. سلولهای اسپرماتوگونی تغییر فراساختاری قابل توجهی را نشان ندادند اما در سلولهای دیگر اپی تلیوم، تغییرات اساسی مشاهده شد.

مهمترین تغییرات قابل ذکر در سلولهای سرتولی این گروه وقوع واکوئل های بزرگ و متعدد، انکلوژیونهای چربی و لیزوزومها به خصوص لیزوزومهای ثانویه فراوان در سیتوپلاسم بود، به طوری که در برخی از مناطق کلاسترهایی از لیزوزوم مشاهده شد. میتوکندریهای سلولهای سرتولی این گروه مثل دو گروه قبل حاوی کریستاهای طبیعی بودند. سیتوپلاسم سلولهای سرتولی بین سلولهای جنسی مشاهده شد و رسس های بخش رأسی آنها اسپرماتیدهای طویل بالغ را در بر می گرفت.

در اسپرماتوسیت های اولیه این گروه هسته های با ظاهر

ناشی از الیگواسپرمی و آزو اسپرمی بهره برد. به علاوه با توجه به گزارش‌هایی که در زمینه افزایش تحرک اسپرم پس از تابش لیزر کم‌توان در محیط کشت در دست است [۵ و ۶ و ۷]، بررسی تأثیر تابش دوزهای پایین لیزر کم‌توان، به صورت *in vivo* در مواردی نظیر استنواسپرمی نیز جالب توجه است. از طرفی با توجه به تغییرات تخریبی القا شده در اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز به دنبال تابش لیزر با دوز کلی $46/80 \text{ J/cm}^2$ که به صورت تغییرات فراساختاری در غشای پایه، سلولهای سرتولی و سلولهای جنسی بروز نمود، می‌توان چنین اظهار کرد که تابش لیزر کم‌توان با دوزهای بالا، از نظر تأثیر کمی و کیفی بر اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز، در نقطه مقابل دوزهای تابشی پایین قرار دارد و به نظر می‌رسد که دوزهای بالای انرژی لیزر از این جنبه مشابه دیگر اشعه‌های مخرب نظیر اشعه X و میکروویو عمل می‌نمایند. لذا ضرورت دقت و احتیاط در استعمال دانشیه‌های متفاوت تابش لیزر برای مقاصد درمانی ناگفته پیداست و تعیین آستانه تحریک زیستی تابش در این موارد از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.

ما در گزارش قبلی خود به توجیه مکانیسم مولکولی آثار وابسته به دوز لیزر از دیدگاه Karu پرداختیم، از طرفی به علل احتمالی دخیل در ریزش پاتولوژیک سلولهای جنسی پس از تابش دوزهای لیزر اشاره نمودیم [۱۲]. اکنون در تحقیق حاضر برای تعیین دیگر آثار نامطلوب دوزهای بالای لیزر و مکانیسم ایجاد آنها، در باره تغییرات کیفی و فراساختاری اپی‌تلیوم پس از تابش لیزر گالیوم - آلومینیوم آرسناید 830 nm نانومتر بحث شده است.

طبق نتایج بررسی حاضر بیشترین تغییرات هیستولوژیک متوجه گروه تابشی $46/80 \text{ J/cm}^2$ بود و عمده تغییرات در گروه فوق شامل موارد زیر بودند:

۱- در این گروه تیغه قاعده‌ای نسبتاً ضخیم، نامنظم و غیریکنواخت به نظر می‌رسید.

۲- سلولهای اسپرماتوگونی تغییر فراساختاری خاصی را نشان ندادند، به این ترتیب به نظر می‌رسد که سلولهای اسپرماتوگونی در برابر آثار تخریبی دوزهای بالای لیزر مقاوم‌تر باشند. این عقیده ما بر خلاف بیانات Bermudez است که

اسپرماتوژنز در آنها از روند طبیعی برخوردار بود، در حالی که اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز گروه تابشی $46/80 \text{ J/cm}^2$ تغییرات هیستولوژیک و فراساختاری شدیدی را نشان داد که حاکی از اثر تخریبی این دوز بر اپی‌تلیوم منی‌ساز فوق بود. این نتایج از جهت تأیید ارتباط منطقی بین دانسیته انرژی تابشی لیزر و تغییرات کیفی القا شده در اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز کاملاً موافق با یافته‌های پیشین ما [۱۲] و نیز تأییدی در جهت یافته‌های Karu و Bermudez است که یک نقش تحریکی برای تابش لیزر بانورهای پایین نشان داده‌اند [۱].

ما در مطالعه پیشین خود برای بررسی اثر تحریک زیستی لیزر گالیوم - آلومینیوم - آرسناید 830 nm نانومتر بر اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز در رت به مطالعه مورفولوژیک و مورفومتریک بیضه در سطح 4 mm پرداخته، نشان دادیم که تابش لیزر سبب القاء تغییرات کمی و کیفی در اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز می‌شود و این تغییرات ارتباط قطعی با دوز انرژی به کار رفته دارد به طوری که با به کار بردن دوز کلی $28/05 \text{ J/cm}^2$ اثر تحریک زیستی لیزر گالیوم - آلومینیوم - آرسناید 830 nm نانومتر بر روند اسپرماتوژنز مشاهده شد و این تغییرات در قالب افزایش ضخامت و سطح اپی‌تلیوم و افزایش تعداد سلولهای جنسی به ویژه سلولهای پکی تن و اسپرماتید طویل بالغ در بررسیهای مورفومتریک و ظاهر طبیعی اپی‌تلیوم در بررسیهای هیستولوژیک بروز کرد. بر عکس با به کار بردن دوز کلی $46/80 \text{ J/cm}^2$ آثار تخریبی لیزر روی اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز مشاهده شد و این اثرها به صورت شکاف در اپی‌تلیوم، ریزش سلولهای جنسی نابالغ به داخل لومن مجاری و حذف آنها به درجات مختلف و کاهش ضخامت اپی‌تلیوم بروز کرد [۱۲].

به این ترتیب، با در نظر گرفتن نتایج پیشین مبنی بر افزایش تعداد سلولهای جنسی به ویژه سلولهای پکی تن و اسپرماتید طویل بالغ، به دنبال تابش لیزر با دوز $28/05 \text{ J/cm}^2$ [۱۲] و نیز با توجه به طبیعی بودن فراساختار انواع سلولهای جنسی و سلولهای سرتولی در این گروه می‌توان دریافت که تابش لیزر با دوز $28/05 \text{ J/cm}^2$ واجد اثر تحریکی و مثبت بر روند اسپرماتوژنز است. به عبارتی این امکان وجود دارد که بتوان از دوزهای پایین انرژی لیزر در درمان برخی از انواع عقیمی‌های

سیتوپلاسم و نواحی بین سلولی بودند. به علاوه میتوکندریهای آنها برخلاف میتوکندریهای مشاهده شده در سلولهای سرتولی هر سه گروه و سلولهای اسپرماتید دو گروه دیگر، غیرطبیعی به نظر می‌رسیدند، چرا که اکثر آنها کروی، بزرگ، متورم و فاقد کریستاهای طبیعی بودند.

اختلال در مراحل اسپرمیوژنز نیز از یافته‌های قابل ذکر دیگر در این گروه بود، به طوری که در لومن برخی از مجاری منی‌ساز ریزش سلولهای اسپرماتید نابالغ در مراحل تکاملی مختلف مشاهده می‌شد و در دسته دیگری از اسپرماتیدها نیز هسته به شدت هتروکروماتین و چروکیده شده و تغییرات دژنراتیو شدیدی در آن به چشم می‌خورد.

برای بیان تغییرات مشاهده شده در سلولهای جنسی ذکر چند نکته خالی از لطف نیست. محققین دریافته‌اند که اشعه لیزر می‌تواند یک آسیب تدریجی شدید به سلولها وارد نماید. به عنوان مثال Shepanek اظهار می‌دارد که ۳۰ روز پس از تابش لیزر به شبکیه و عنبیه، یک لیز شدگی در هسته‌های سلولی و ضایعات آتروفیک رخ می‌دهد که نه تنها به انرژی خروجی بلکه به طول موج پرتو بستگی دارد [۱۴]. از طرفی واکتولیزیشن سیتوپلاسم، مهار فعالیت میتوزی و مرگ سلولهای Hela در محیط کشت به دنبال دوزهای بالای نور قرمز لیزر هلیوم - نئون مشاهده شده است [۱۵]. به نظر می‌رسد که این یافته‌ها تا حدی مشابه آثار مشاهده شده در تابش لیزر با دوز $46/80 \text{ J/cm}^2$ در بررسی حاضر باشند.

یکی از مواردی که جالب توجه به نظر می‌رسد، این است که Hugon و Burgers در مطالعات EM دژنراسیون اسپرماتوگونی‌ها به دنبال تحت تابش قرار گرفتن موش با اشعه X گزارش کردند که اولین تغییرات شامل دیلاته شدن SER، بزرگ شدن میتوکندریها و تورم غشای هسته است [۱۶]. گرچه تشابه بین آثار تخریبی اشعه X و دوزهای بالاتر لیزر مجهول بوده و تحقیقات وسیعتری را می‌طلبد، به نظر می‌رسد که بروز واکتولها در سیتوپلاسم سلولهای اسپرماتید و بزرگ و متورم شدن میتوکندریها در سلولهای فوق طی تابش $46/80 \text{ J/cm}^2$ تا حدی با یافته‌های فوق قابل مقایسه باشد.

Huckins دو مکانیسم را برای تبیین علت دژنره شدن

ادعا کرد "حساسیت سلولهای جنسی به اشعه لیزر بسیار شبیه به حساسیت آنها به اشعه X است و بنابراین باید انتظار داشت که اسپرماتوگونی‌ها حساسترین و اسپرماتیدها مقاومترین سلولها باشند" [۱ و ۱۱]. البته با توجه به اینکه سلولهای اسپرماتوگونی با طول عمر کوتاهتر نسبت به سلولهای دیگر، کمتر در معرض تابش لیزر قرار می‌گیرند، احتمال تغییرات تخریبی در فراساختار آنها ضعیف‌تر به نظر می‌رسد و نتیجه حاصل از این بررسی منطقی است.

۳- در سلولهای سرتولی این گروه تغییرات فراساختاری قابل ملاحظه‌ای نظیر بروز واکتولهای بزرگ، واکتولهای چربی الکترون شفاف فراوان و کلاسترهای وسیعی از لیزوزوم در سیتوپلاسم به چشم می‌خورد. یافته‌های فوق مبین این امر است که فعالیت فاگوسیتوزی در این سلولها نسبت به دو گروه قبل از شدت بالاتری برخوردار بوده است. فعالیت فاگوسیتوزی در ارتباط با حذف سلولهای جنسی دژنره و اجسام باقیمانده است. محققین نشان داده‌اند که اجسام باقیمانده رها شده در مراحل I و II سیکل اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز توسط سلولهای سرتولی فاگوسیتوز شده و به واکتولهای چربی الکترون شفاف تبدیل می‌شوند، بنابراین واکتولهای فوق از مرحله I تا III افزایش می‌یابد و در طی مراحل IV و V کاهش نشان می‌دهد. در مردان پیرتر نسبت واکتولهای چربی الکترون شفاف به سیتوپلاسم سلول سرتولی $1/9 - 1/2$ برابر بیشتر از بالغین جوان است و این یافته‌ها احتمالاً در ارتباط با دژنره شدن بیشتر سلولهای جنسی در افراد مسن است [۱۳].

افزایش واکتولهای چربی الکترون شفاف در نمونه ما نیز احتمالاً در ارتباط با افزایش دژنره شدن سلولهای جنسی و فاگوسیتوز آنها توسط سلولهای سرتولی است و مشاهده اسپرمهای دژنره و کلاسترهای وسیع لیزوزوم در اپی‌تلیوم بیضه‌های این گروه خود تأییدی بر این ادعا است.

۴- سلولهای اسپرماتوسیت اولیه ظاهراً نسبتاً طبیعی داشته، تنها تفاوت آنها با دو گروه دیگر بروز واکتولهای شفاف متعدد در سیتوپلاسم آنها بود.

۵- سلولهای اسپرماتید در این گروه تغییرات نسبتاً شدیدی را نشان دادند. این سلولها حاوی واکتولهای فراوان در

Hillenkamp نیز با بررسی تأثیر تابش لیزر مادون قرمز بر بیضه به این نتیجه دست یافت که تابش لیزر مادون قرمز اغلب توسط آب موجود در بیضه جذب می‌شود و گرمای موضعی ایجاد نمی‌کند [۱۷]. لذا نمی‌توان دژنره شدن سلولهای جنسی را به دنبال تابش لیزر به افزایش دمای بافت بیضه نسبت داد. از طرفی با توجه به گزارشهایی که در زمینه ایجاد پرخونی در تخمدانها به دنبال تابش لیزر کم‌توان [۱۵]، خاصیت رگزایی لیزر کم‌توان [۲] و تغییر در بستر عروقی، پیچ و خم‌دار شدن و افزایش سطح مقطع عروق ریز داخل تخمدان به دنبال تابش لیزر [۱۸] وجود دارد، حتی می‌توان این احتمال را مطرح کرد که تابش لیزر با دوز ۲۸/۰۵ ژول بر سانتیمتر مربع در تحقیق حاضر نیز از طریق بهبود گردش خون در ناحیه تابش علاوه بر اینکه از طریق دور کردن گرمای احتمالی نقش مهمی در کنترل و حفظ دمای بیضه ایفا می‌نماید، می‌تواند در بهبود متابولیسم سلولی و دفع مواد زائد منطقه و بروز آثار biostimulatory نقش به‌سزایی داشته باشد.

ما در گزارش پیشین خود به احتمال تأثیر متضاد تابش لیزر با دانسیته‌های متفاوت روی سلولهای لیدیگ، ترشح تستوسترون، پدیده اسپرماتوژنز و به ویژه اسپرمیوژنز اشاره نمودیم [۱۲]. در این تحقیق نیز یادآور می‌شویم که نقش هورمون تستوسترون می‌تواند به عنوان یک توجیه احتمالی برای تخریب سلولهای جنسی پس از تابش دوزهای بالای لیزر مد نظر واقع شود. Kerr در سال ۱۹۹۳ به دنبال مشاهده پاسخ مورفولوژیک سلولهای سرتولی در اثر حذف نسبی یا کامل تستوسترون در رتهای بالغ، بروز سلولهای جنسی در حال دژنره و اکوتلهای بی‌شماری را در موقعیت قاعده‌ای اپی‌تلیوم در مراحل VII و VIII سیکل اپی‌تلیوم اعلام نمود. در بررسی حاضر نیز اگر بپذیریم که تابش لیزر با دوز بالا یعنی $46/80 \text{ J/cm}^2$ اثر تخریبی برای سلولهای لیدیگ داشته باشد، علت دژنره شدن سلولهای جنسی و بروز حداقل برخی از اکوتلها در سلولهای سرتولی تا حدی قابل توجیه است. در هر حال برای اخذ چنین نتیجه‌گیری بررسیهای بعدی در زمینه تأثیر تابش لیزر کم‌توان گالیوم - آلومینیوم - آرسناید 830 nm با دوزهای مختلف بر سلولهای لیدیگ ضروری است.

سلولهای اسپرماتوگونی در روند اسپرماتوژنز مطرح نموده است. وی معتقد است که دژنراسیون مکانیسمی برای کاهش هسته‌های با ناهنجاری‌های کروموزومی است و احتمال دیگر این است که دژنراسیون مکانیسمی باشد که سبب می‌شود تنها تعداد مناسبی از سلولهای جنسی که می‌توانند توسط سلولهای سرتولی حمایت و نگهداری شوند، در یک جانور معین رشد نمایند [۱۶].

Bermudez و همکارانش نیز در پی بررسی تأثیر لیزر مادون قرمز 904 nm با دوزهای $28/05$ و $46/80$ ژول بر سانتیمتر مربع بر سیکل اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز، با مشاهده افزایش نسبت اسپرماتوسیت‌های اولیه با محتوای DNA بیش از $4cDNA$ و نیز اسپرماتیدهای با محتوای $2cDNA$ که ۵ درصد اسپرماتیدها را تشکیل می‌دادند، احتمال وجود تعداد بیشتری از گامت‌های غیرطبیعی را پس از تابش لیزر مطرح نمودند. به علاوه طبق پیشنهاد آنها با وجود اینکه میوز یکی از سه نقطه بحرانی برای دژنره شدن سلولهای جنسی در روند اسپرماتوژنز است، برخی از اسپرماتوسیت‌های اولیه غیرطبیعی قادرند که تا پایان اسپرماتوژنز دیفرانسیه شده و اسپرماتیدهایی را ایجاد کنند که قدرت باروری آنها مورد تردید است. از طرفی اکثر این سلولها می‌توانند بعداً دژنره شوند، چراکه اسپرماتیدهای طویل شده فقط محتوی $cDNA$ هستند [۱ و ۱۱]. با توجه به بیانات فوق می‌توان حدس زد که ناهنجاری کروموزومی می‌تواند یکی از دلایل افزایش دژنراسیون سلولهای جنسی به دنبال تابش لیزر با دوز کلی $46/80 \text{ J/cm}^2$ در تحقیق حاضر باشد؛ گرچه احتمال ناکافی بودن حمایت سلولهای سرتولی از سلولهای جنسی برای بقای این سلولها، نقش گرمایی پرتوهای لیزر و نقش مؤثر تستوسترون نیز در این زمینه قابل طرح است.

می‌دانیم که افزایش درجه حرارت بیضه از عوامل مسبب ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز است. در تحقیق حاضر درجه حرارت اسکروتوم اندازه‌گیری نشد، اما محققین پیش از ما تغییر درجه حرارت را در اثر تابش لیزر نفی کرده‌اند. به عنوان مثال گزارش شده است که به‌طور کلی در همه انواع لیزرهای کم‌قدرت انرژی ایجاد شده کمتر از میزانی است که حرارت قابل درکی ایجاد نماید [۲].

احتمال ایجاد اسپرمهای بی حرکت تحت تأثیر دوزهای بالای لیزر وجود دارد و به نظر می رسد که تابش دوزهای بالای لیزر از این دیدگاه نیز تا حدی با تابشهای مخربی نظیر میکروویوها و پرتوهای یونیزان X مشابه باشند. چرا که در پی تابشهای مکرر شغلی با میکروویو، کاهش معنی داری در جمعیت اسپرمها، درصد اسپرماتوزوئیدهای متحرک و اسپرمهای با مورفولوژی طبیعی گزارش شده است [۱۹]. تابش مکرر اشعه X نیز به واسطه شغل خاص موجب کاهش در کیفیت اسپرم و افزایش در فراوانی اسپرمهای بی حرکت می شود [۱۹].

در انتها خاطر نشان می شود که استناد به آثار تحریکی زیستی تابش دوزهای پایین انرژی لیزر به صورت *in vivo* برای مقاصد درمانی نظیر آزو اسپرمی، الیگو اسپرمی و آستنو اسپرمی نیاز به بررسیهایی در ابعاد گسترده دارد و به نظر می رسد که لیزر درمانی جایگاه درخشانی را در آینده کلینیکها و پاراکلینیکها به خود اختصاص خواهد داد.

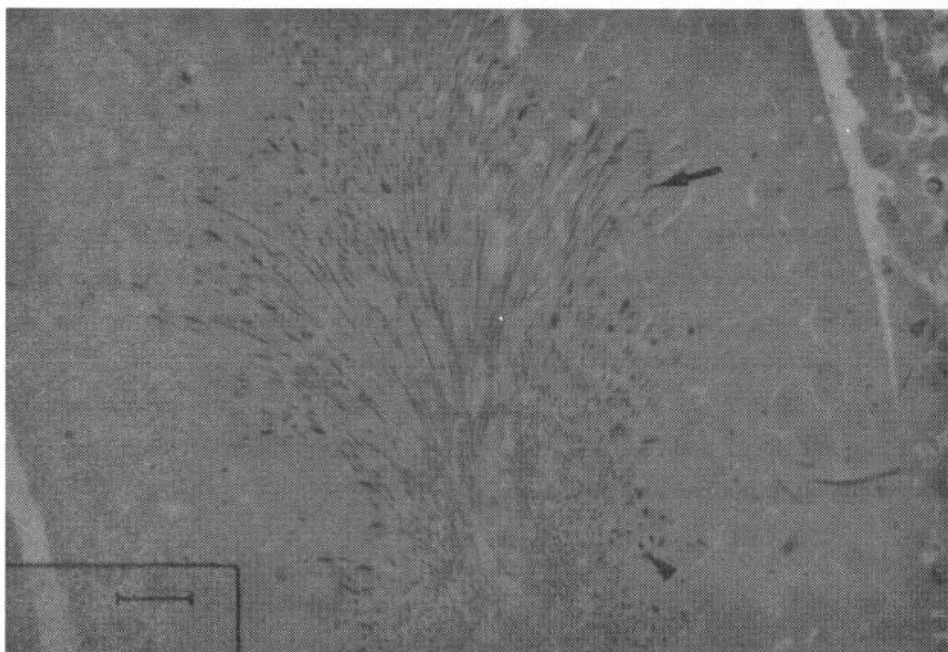
علاوه بر دژنه شدن سلولهای اسپرماتید که به بیان آن پرداخته شد، وقوع گامت های غیرطبیعی از مواردی بود که در اپی تلیوم مجاری منی سازگروه تابشی $46/80 \text{ J/cm}^2$ یافت شد. گر چه در اپی تلیوم این گروه ناهنجاری های متعددی نظیر عدم تشکیل دم اسپرم با تجمع نامناسب میتوکندریها در ناحیه تشکیل دم و فقدان غلاف میتوکندریایی در قطعه میانی دم، عدم تراکم کافی و مناسب هسته، ایجاد فاصله بین هسته و غشای داخلی اکروزوم و اسپرمهای دو سره به چشم می خورد؛ اما به نظر می رسد که بیشترین ناهنجاری در ناحیه دم و به خصوص در قطعه میانی آن رخ داده است. چرا که نه تنها تقریباً میتوکندریهای تمام اسپرمها از ظاهر طبیعی برخوردار نبوده، متورم و فاقد کریستا به نظر می رسیدند بلکه در مقاطع میانی دم اسپرم ظاهر مارپیچی مشاهده شده در اسپرمهای طبیعی گروههای دیگر را نداشتند.

با توجه به بیانات ذکر شده و با توجه به غیرطبیعی بودن میتوکندریها و ابنرمالیتی های مشاهده شده در ناحیه دم اسپرم،

References

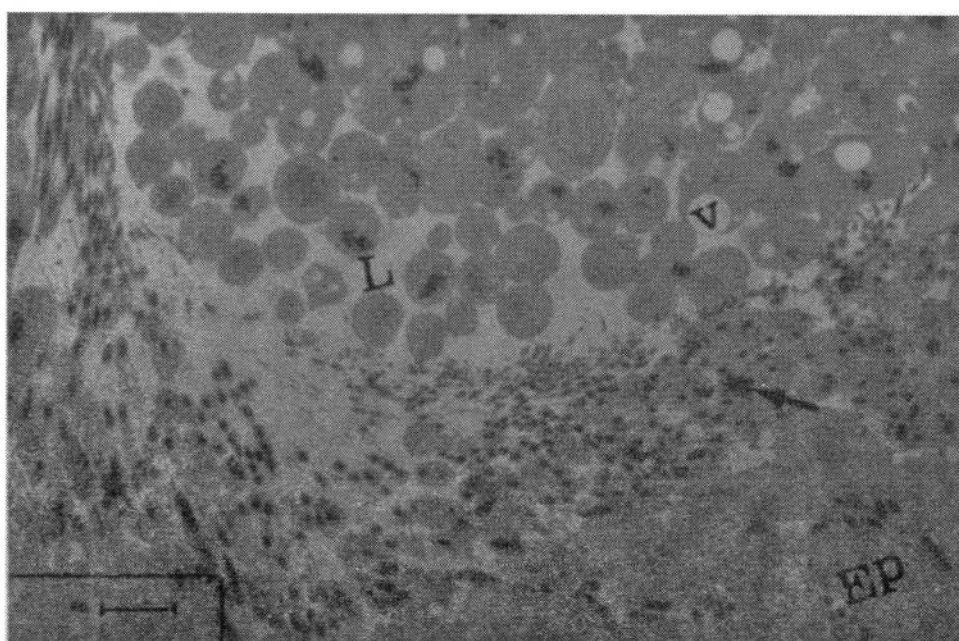
1. Bermudez D, Carrasco F, Vargas IP. Effect of laser radiation on germ cell DNA content after one cycle of seminiferous epithelium. Arch Androl. 1993; 37: 177-181
2. Kert J, Rose L. Clinical laser therapy, low level laser therapy. Scandavian Med Technol. 1989
3. Kitchen S, Bazin S. Clayton's electrotherapy. 10th edition. WB saunders compny Ltd. 1996; 167-217
4. Loevschall H, Bindslev DA. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. lasers Surg Med. 1994; 14: 347-354
5. Singer R, Sagiv M, Barnet M, Levinsky H, segenreich E, Fuchs B, Mendes E. Low energy narrow band non-coherent infrared illumination of human semen and isolated sperm. Androl. 1991; 23: 181-184
6. Sato H, Landthaler M, Haina D, Schill WB. The effects of laser light on sperm motility and velocity in vitro. Androl. 1984; 16(1): 23-25
7. Kovalev EV. The effects of low-intensity laser radiation on spermatogenesis in men. Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. 1990; 5: 33-36
8. Cohen N, lubart R, Rubinstein S, Breitbart H. Light rrradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. Photochem Photobiol. 1998; 68(3): 407-413
9. Lubart R, Friedmann H, Levinshal T. Effect of light in calcium transport in bull sperm cells. J Photochem Photobiol B Biol. 1992; 15: 337-341
10. Celani MF, Gilioli G, Montanini V, Morramma P. Further evidenc that mid laser radiaions may stimulate leydig cell steroidogenesis. IRCS Med Sci. 1985; 13: 336-337
11. Bermudez D, carrasco F, Diaz F, Vargas IP. Germ cell DNA quantification shortly aftr IR laser radiation. Andrologia. 1991; 23: 303-307
12. Fakhrr Taha M, Rezazadeh M, Tiraihi T. To study the changes of seminiferous epithelium after Ga-Al-As laser radiation (830 nm). J Iranian Anat Sci. 2003; 1(2): 9-20
13. Paniagua R, Codesal J, Nistal MC, Rodriguez MC,

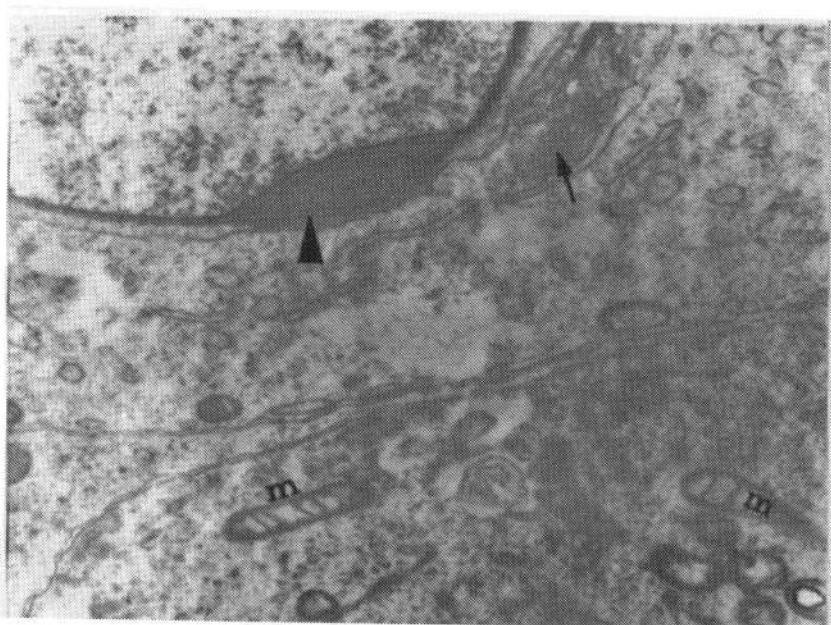
- Santamaria L.** Quantification of cell types throughout the cycle of the human seminiferous epithelium and their DNA content. *Anat Embryol.* 1987; 176: 225-230
14. **Shepanek NK, Kaplan BJ, Townsend D.** In vitro cell changes in laser - exposed tissue. *Acta Cytol J.* 1980; 24: 244-246
15. **Gregoraszczuk EWA, Dobrowolski JW, Galas J.** Effect of low intensity laser beam on steroid dehydrogenase activity and steroid hormone production in cultured porcine granulosa cells. *Folia Histochemica Cytochemica.* 1983; 21(2): 87-92
16. **Huckins C.** The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec.* 1978; 190: 905-926
17. **Hillenkamp F.** Interaction between laser radiation and biological systems. In: *lasers in biology and medicine*, edited by Hillenkamp F, Pratesis R, Sacchi C.A. Plenum press. New York. 1980; pp 37-68
18. **Chertok VM, Lubart R, Rubinsteins, Breibart H.** Light irradiation of mouse spermatozoa: Stimulation of invitro fertilization and calcium signals. *Photochem Phstobiol.* 1998; 68(3): 407-413
19. **Lahdetie J.** Occupation-and exposure-related studies on human sperm. *J Occup Environ Med.* 1995; 37(8): 922-930



▲ شکل ۱. هیستوگراف از بافت بیضه در گروه تابش با دوز $28/05 \text{ J/cm}^2$ که اسپرمتیدهای طویل بالغ (↑) و اجسام الکترون متراکم (▲) فراوان را در سطح اپی تلیوم نشان می‌دهد (رنگ آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی $\times 400$).

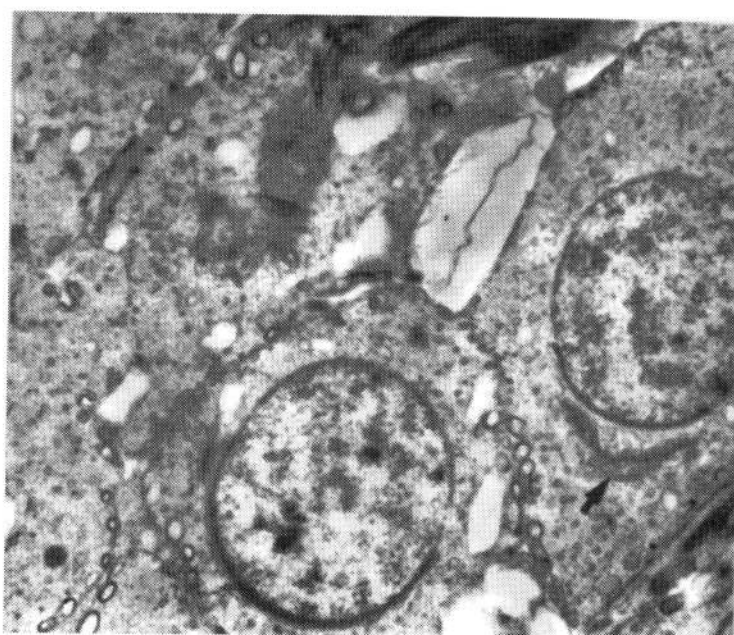
▼ شکل ۲. هیستوگراف از بافت بیضه در گروه تابش با دوز کلی $46/80 \text{ J/cm}^2$ که بخشی از اپی تلیوم (EP) و ریزش سلولی شدید درون لومن (L) مجرای منی‌ساز را نشان می‌دهد. اجسام الکترون متراکم بالغ (↑) و واکوئل فراوان (V) در داخل هر دوی سلولهای ریزش کرده به داخل لومن و سلولهای باقیمانده در اپی تلیوم دیده می‌شود (رنگ آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی: $\times 1000$).

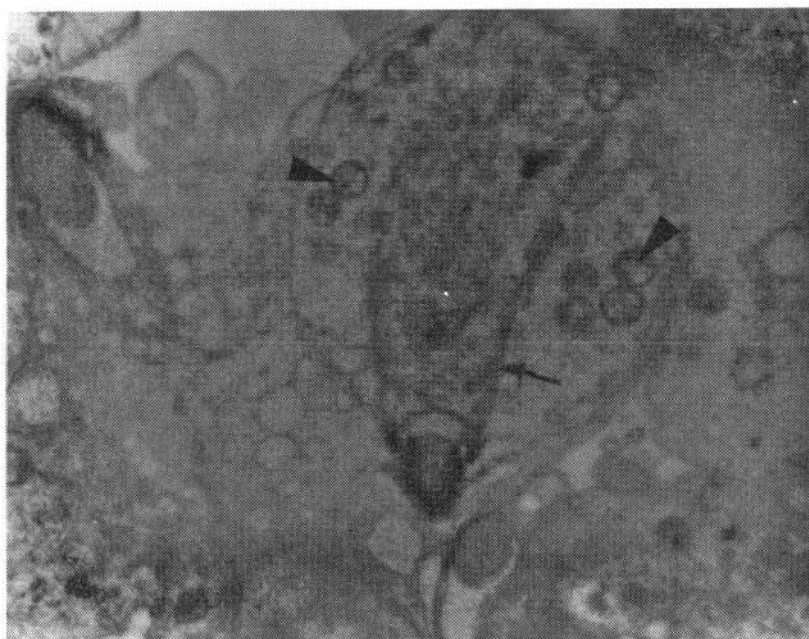




شکل ۲. میکروگراف الکترونی از بیضه در گروه تابش با دوز کلی $28/05 \text{ J/cm}^2$ که بخشهایی از دو اسپرماتید مجار یکدیگر را نشان می‌دهد. در سمت بالای تصویر، تشکیل آکروزوم (▲)، کمپلکس گلژی (↑) در یک اسپرماتید و در پایین تصویر، میتوکندریهای طبیعی واجد کریستا (m) در اسپرماتید دیگر قابل مشاهده است (بزرگنمایی: $\times 18000$).

شکل ۴. میکروگراف الکترونی از بیضه در گروه تابش با دوز کلی $46/80 \text{ J/cm}^2$ که مراحل ابتدایی تشکیل آکروزوم را در اسپرماتید نشان می‌دهد. در درون سلولها کمپلکس گلژی (↑) و واکوئل‌های شسته شده فراوان دیده می‌شود (بزرگنمایی: $\times 4000$).





▲ شکل ۵. میکروگراف الکترونی از بخشی رأسی اپی تلیوم مجرای منی ساز در گروه تابش با دوز کلی $24/80 \text{ J/cm}^2$ که یک اسپرماتید را در مرحله تشکیل منشبت توبول (↑) نشان می دهد. این اسپرماتید حاوی میتوکندریهای متورم، فاقد کریستا و غیرطبیعی (▲)، سانتیریول، هسته و اکروزوم است و اثری از تشکیل دم به چشم نمی خورد (بزرگنمایی: $\times 10500$).

▼ شکل ۶. میکروگراف الکترونی از بیضه در گروه تابش با دوز کلی $24/80 \text{ J/cm}^2$ که ریزش سلولهای اسپرماتید گرد نابالغ (S) را به فضای لومن (L) مجرای منی ساز نشان می دهد (بزرگنمایی: $\times 2500$).

