مقاله تحقیقی

بررسی تأثیرات تستوسترون بر ساختار بیضه و پارامترهای اسپرم موش

فرهاد مرتضی‌زاده میمند .M.Sc*، منصوره موحدین .Ph.D*، منیژه مختاری دیزجی .Ph.D**

*گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

**گروه فیزیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۴، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۴

چکیده

هدف: بررسی تغییرات اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و پارامترهای اسپرم موش بعد از تزریق تستوسترون

مواد و روشها: به منظور تعیین دوز موثر تستوسترون، دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۲۵ میلی گرم دارو به صورت داخلی صفاقی به موشهای مورد آزمایش تزریق شد. بعد از گذشت ۳ تا ۴ هفته از تزریق، تعداد اسپرم دم اپی‌دیدیم شمارش شد و دوز ۲۵ میلی‌گرم به دلیل کاهش تعداد اسپرم به زیر حد طبیعی دوز موثر شناخته شد. برای ارزیابی آثار تستوسترون گروهی به مدت ۶ هفته دارو، به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. به‌منظور ارزیابی برگشت‌پذیری آثار تزریق تستوسترون، گروهی به مدت ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون، دارویی دریافت نکردند. پس از پایان دوره تزریق، موشها به روش دررفتگی مهره‌های گردنی کشته شدند و دم اپی‌دیدیم موشها را بعد از خارج کردن از شکم در ۱ میلی‌لیتر PBS که در انکوباتور به تعادل رسیده بود خرد کرده تا اسپرمهای درون آن خارج شوند وبعد درصد زنده ماندن اسپرم، درصد تحرک اسپرم و تعداد اسپرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. همچنین از بیضه چپ موشها بعد از تثبیت، پاساژ و قالب‌گیری در پارافین، برشهای بافتی تهیه شده و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. در مطالعه مورفومتری، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌ها و شمارش سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید گرد اندازه‌گیری شد. در گروه کنترل، ۶ هفته آب مقطر هم حجم تستوسترون به موشها تریق شد و بقیه مراحل شبیه گروه مورد آزمایش با دارو انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل ارتفاع اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز کاهش یافته است و تعداد سلولهای اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت و اسپرماتید گرد هم کاهش نشان دادند. از لحاظ پارامترهای اسپرم هم تعداد اسپرم در میلی‌لیتر و درصد زنده ماندن اسپرمها کاهش نشان داد ولی در درصد تحرک اسپرمها تغییری مشاهده نشد. بعد از قطع تزریق تستوسترون، برگشت ارتفاع اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد سلولها و پارامترهای اسپرم به حالت طبیعی مشخص شد.

نتیجه‌گیری: تزریق تستوسترون به موش روی سلولهای اسپرماتوگونی تاثیرگذار بوده و باعث کاهش تعداد آنها شده است و در نتیجه در تعداد سلولهای اسپرماتوسیت و اسپرماتید گرد هم کاهش دیده شده و به این دلیل تعداد اسپرم تولید شده کم می‌شود.

کلید واژها: تستوسترون، آزواسپرمی، موش

مقدمه

به‌خاطر کمبود در وجود روشهای ناباروری مردانه تلاشهایی در جهت ساخته شدن داروی هورمونی ناباروری مردانه که مشابه قرصهای ناباروری در زن یعنی استروژن و پروژسترون باشد گسترش یافت. چنین داروی ناباروری باید مطمئن باشد و به راحتی قابل استفاده و همچنین ناباروری قابل برگشت باشد. تستوسترون می‌تواند چنین وظیفه ناباروری را داشته باشد و با متوقف کردن ترشح گنادوتروپینهای هیپوفیز یعنی FSH و LH اثرگذار است و سطح پایین FSH و LH، بیضه را از سیگنالهایی

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

که برای اسپرماتوژنزیس نیاز است محروم می‌سازد و این منجر به کاهش زیاد تعداد اسپرم در بیشتر مردان و نه همه آنها می‌شود. تعداد اسپرم مجدداً بعد از توقف مصرف تستوسترون بالا می‌رود. در سال ۲۰۰۰ گلاسیر (Glasier) و مارتین (Martin) و همکاران [۲] اظهار داشتند که در خیلی از کشورها چنین داروی هورمونی ناباروری که مورد رضایت بسیاری از مردان و زنان است پیشنهاد شده است. در بیشتر رژیم‌های ناباروری هورمونی، استرهای قابل تزریق تستوسترون اندکانئات مصرف شده‌اند که به شکل تزریق داخل عضلانی هفته‌ای یک بار یا دو هفته‌ای یک بار استفاده شده‌اند. مراکز متعددی برای امتحان اثر تستوسترون انانتات به عنوان داروی ناباروری مردانه توسط سازمان بهداشت جهانی WHO هدایت شده‌اند [۳ و ۴]. روشهای جدید مصرف ثابت تستوسترون به عنوان رژیم ناباروری‌مناسب بررسی شده‌اند. تستوسترون اندکانئات یک زنجیره استری بلند است که مصرف خوراکی آن ۲ تا ۴ بار در روز است یا به صورت تزریق داخل عضلانی مصرف می‌شود. در سال ۱۹۹۸ ژانگ (Zhang) و همکاران در سال ۱۹۹۹ [۵] و در سال ۱۹۹۹ بهر (Behre) و همکاران [۶] و نسچلاگ (Nieschlag) و همکاران در سال ۱۹۹۹ [۷] اظهار کردند که تستوسترون اندکانئات در مدت ۶ هفته سطح تستوسترون سرم مردان هیپوگنادیسم را به حالت طبیعی می‌رساند. ژانگ (Zhang) و همکاران در سال ۱۹۹۹ [۸] در چین ایجاد ناباروری توسط تستوسترون اندکانئات را بررسی کرده‌اند. از آنجا که در مطالعات انجام شده به تاثیر هورمون تستوسترون بر ساختار بیضه پرداخته نشده و مشخص نگردیده که تستوسترون روی کدام رده سلولی جرم اثر می‌کند که منجر به کاهش تعداد اسپرم می‌شود. در تحقیق حاضر تاثیرات تستوسترون انانتات بر پارامترهای ساختاری بیضه در موش سوری نژاد Bulb-C ارزیابی شده است.

مواد و روشها

حیوان آزمایشگاهی

در این پژوهش موشهای سوری‌نژاد Bulb-c با سن ۸-۴ هفته آزمایش شدند. آنها پس از ورود به حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس به مدت حداقل یک هفته نگهداری شدند تا با شرایط موجود در حیوانخانه وفق پیدا کنند. حیوانات تحت‌شرایط ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد تحت مراقبت قرار گرفتند. موش کوچک آزمایشگاهی از جانورانی است که به دلیل نگهداری آسان و زاد و ولد فراوان در تحقیقات زیاد استفاده می‌شود.

تزریق هورمون تستوسترون

در این تحقیق از آمپول تستوسترون انانتات ۲۵۰ میلی‌گرم، ساخت کارخانه ابوریحان استفاده شد. دوز تزریق ۲۵mg برای هر موش و تعداد تزریق یک بار در هفته بود. تزریق به روش داخل صفاقی انجام شد. قبل از شروع دوره تزریق در گروه آزمون، دوز مناسب ۲۵mg به صورت تزریق هفتگی از طریق اندازه‌گیری تعداد اسپرم (sperm count) در میلی‌لیتر در موشهای مورد آزمایش به‌دست آمد. به این منظور دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم ارزیابی شد. تعداد تزریق ۳ بار در هفته، یک روز در میان و طول دوره تزریق ۳ هفته بود. همچنین دوز ۲۵ میلی‌گرم با دوره تزریق ۳ هفته به‌صورت هفتگی ارزیابی شد. علت تزریق هفتگی دوز ۲۵ میلی‌گرم این بود که تزریق بیش از یک بار در هفته این دوز یا دوزهای بالاتر دارو قابل تحمل برای موشهای مورد آزمایش نبود. بعد از پایان تزریقات با اندازه‌گیری تعداد اسپرم دم اپی‌دیدیم دوز ۲۵ میلی‌گرم به دلیل کاهش تعداد اسپرم به زیر حد طبیعی دوز مناسب شناخته شد. تعداد موش مورد آزمایش در هر گروه برای تعیین دوز مناسب دارو و در گروههای آزمون ۳ عدد بود. برای ارزیابی برگشت‌پذیری آثار تستوسترون، گروهی ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون، دارو دریافت نکردند و سپس مورد آزمایش قرار گرفتند.

تهیه اسپرم

اسپرمها از بخش اپی‌دیدیم گروههای موش مورد آزمایش تهیه شدند. به این ترتیب که موشهای نر به طریق کشیدن و جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند. بعد از کشتن حیوان شکم آن را از ناحیه خط وسط پاره کرده و با فشار به اسکروتوم، بیضه در ناحیه شکم نمایان شد و توسط قیچی جراحی بخش

اپی‌دیدیم آنها جدا شدند و درون قطراتی از محیط کشت PBS (یک سی‌سی) که قبلاً در انکوباتور به تعادل رسیده بود گذاشته شدند و برشهای کوچکی در آنها ایجاد شد تا اسپرمها بیرون بیایند. بعد از آن مدت ۰/۵ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷° سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO_2 قرار داده شده تا اسپرمها ظرفیت‌پذیر شوند.

ارزیابی اسپرم

پس از ۰/۵ ساعت انکوباسیون اسپرمها با شرایط ۵ درصد CO_2 و ۳۷° سانتی‌گرداد در جنبه‌های زیر ارزیابی شدند؛ میزان اسپرمهای زنده برحسب درصد، میزان اسپرمهای متحرک بر حسب درصد و شمارش اسپرمها.

قدرت زنده ماندن (Viability)

برای شناسایی اسپرمهای زنده متحرک و غیرمتحرک از اسپرمهای‌مرده، از رنگ‌آمیزی‌فوق حیاتی (supra vital staining) استفاده شد. برای این منظور یک قطره از نمونه اسپرم روی لام قرار گرفت و سپس با یک قطره کوچک ائوزین B (۰/۵ درصد در سالین) که یک نوع رنگ حیاتی است مخلوط و بلافاصله لامل را روی قطره قرار داده و با بزرگنمایی ۴۰۰ مطالعه شد. در این رنگ‌آمیزی سر اسپرمهای مرده به دلیل نقص در غشا، ائوزین را جذب کرده و قرمز می‌شوند در حالی که اسپرمهای زنده رنگ ائوزین را به خود نمی‌گیرند. تعداد اسپرمهای زنده و مرده در ۵ میدان دید مطالعه و درصد اسپرمهای زنده محاسبه شد [۹].

تحرک (Motility) و درجه‌بندی تحرک اسپرمها (Motility Grade)

هدف از ارزیابی تحرک اسپرم، تعیین درصد اسپرمهای متحرک و سرعت اسپرمها بود که با قرار دادن یک قطره کوچک از نمونه روی لام و گذاشتن لامل و مشاهده با درشتنمایی ۴۰۰ میسر می‌شود. برای تعیین درصد تحرک، ابتدا درصد اسپرمهای متحرک را در چند میدان میکروسکوپ تخمین زده و سپس میانگین آنها به عنوان درصد تحرک ثبت شد. برای تعیین سرعت تحرک اسپرمها نیز چند میدان میکروسکوپی را مشاهده کرده و سپس با استفاده از درجات قراردادی که بین ۱ تا ۴ است سرعت حرکت اسپرمها مشخص شدند. درجه‌بندی حرک اسپرمها با توجه به مواد زیر انجام شد: درجه I: اسپرمها درجا حرکت نموده و به سمت جلو پیش نمی‌روند درجه II: حرکت اسپرمها به طرف جلو است اما این حرکت با سرگردانی و پیچ و خم زیاد همراه است و حرکت دم اسپرم دم ماهی ساکن را در ذهن تصور می‌کند. درجه III: حرکت اسپرمها روی یک خط مستقیم و با سرعت متوسط است. درجه IV: حرکت اسپرمها روی یک خط مستقیم بوده و سرعت به حدی است که حرکت دم دیده نمی‌شود [۹].

شمارش اسپرم (Sperm count)

برای مطالعه تعداد اسپرم، دم اپی‌دیدیم موشها را جداکرده و در یک میلی‌لیتر حجم محلول PBS گذاشته و با قیچی آنها را خرد کرده تا اسپرم درون آنها بیرون بیاید. سپس از لام هموسیتومتر نئوبار (Neubar hemocytometer) برای شمردن اسپرمها استفاده شد. سپس قطره‌ای از این محلول زیر میکروسکوپ قرار داده شد و با بزرگنمایی ۴۰۰ اسپرمها شمارش شده و در ضریب 10^6 ضرب شد. عدد به‌دست آمده میزان اسپرمها را به‌صورت تقریبی در یک میلی‌لیتر نشان می‌دهد [۹].

مطالعه مورفومتری

به منظور مطالعات میکروسکوپی بعد از انجام مراحل ثبوت، آماده‌سازی و برش‌گیری، از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) استفاده شد. کلیه مواد مورد استفاده ساخت شرکت MERCK، کشور آلمان بودند.

اندازه‌گیزی قطر مجاری و ضخامت اپی‌تلیوم مجاری اسپرم‌ساز

برای اندازه‌گیری این پارامترها از میکروسکوپ زایس دارای میکرومتر چشمی مدرج (Eye-piece) با درشتنمایی (کالیبره شده به‌وسیله یک Stage micrometer) استفاده شد. طول خط‌کش در عدسی چشمی ۱۰۰ واحد بوده که هر واحد آن برابر ۹/۸ میکرومتر محاسبه شد. روش مطالعه بدین‌ترتیب بود که

پارامترهای مورد نظر (قطر مجاری اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم مجاری) در ۴۰ مجرای اسپرم‌ساز با مقطع گرد یا نزدیک به گرد در هر بیضه اندازه‌گیری شد. برای دقیق بودن این اندازه‌گیریها میانگین قطر بزرگ و قطر کوچک هر مجرای اسپرم‌ساز محاسبه شد. در پایان میانگین اندازه این پارامترها در هر بیضه و سپس در کل بیضه‌های هر گروه محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفتند [۱۰].

محاسبه تعداد سلول‌های اپی‌تلیوم مجاری اسپرم‌ساز

۵ مجرای منی‌ساز در هر بیضه که در مراحل VIII و VII سیکل سلولی بوده و مقطع کاملاً گرد داشته مطالعه شدند. [۱۱]. برای شمارش سلولهای اپی‌تلیوم مجاری اسپرم‌ساز از روش رولی (Rowley) استفاده شد [۱۲]. بدین‌ترتیب که ابتدا در هر مجرا چهار منطقه در زوایای (۹۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳۶۰) درجه انتخاب شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری زایس دارای یک عدسی چشمی با درشتنمایی ۱۰ که روی آن یک گراتیکول شطرنجی ۱۰۰ مربعی چسبانده شده بود و با عدسی شیئی با درشتنمایی ۱۰۰ شمارش سلولی انجام شد. سطح هر منطقه مورد مطالعه ۱۰۰×۱۰۰=۱۰۰۰۰ میکرومتر مربع بوده و در هر بیضه سلولهای ۴۵ منطقه شامل اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت و اسپرماتید گرد شمارش شد. در پایان هر یک از سلولها در بیضه و سپس در کل بیضه‌های هر گروه محاسبه و مقایسه شد.

روشهای آماری

داده‌ها پس از جمع‌آوری و دسته‌بندی توسط نرم‌افزار SPSS (Version 12) تجزیه و تحلیل شد. برای این کار از روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و آزمون تکمیلی Post hac (Tukay) استفاده شد.

یافته‌ها

مقایسه تأثیرات دوزهای مختلف تزریق تستوسترون بر میزان اسپرم

در جدول ۱ اثر دوزهای مختلف تزریق تستوسترون برای تعیین دوز مناسب تستوسترون در گروه ۱ که گروه شاهد بود و شامل موشهایی بود که هیچ دارویی دریافت نکردند. با گروه ۲ که شامل موشهایی بود که دور ۰/۰۱mg تستوسترون را ۳ بار در هفته به مدت ۳ هفته دریافت کردند، گروه ۳ که شامل موشهایی بود که دوز ۰/۱mg تستوسترون را ۳ بار در هفته به مدت ۳ هفته دریافت کردند، گروه ۴ که شامل موشهایی بود که دوز ۱mg تستوسترون را ۳ بار در هفته به مدت ۳ هفته دریافت کردند و گروه ۶ که شامل موشهایی بود که دوز ۲۵mg تستوسترون را ۱ بار در هفته به مدت ۴ هفته دریافت کردند با هم مقایسه شده‌اند. با توجه به جدول ۱، در میانگین تعداد اسپرم بین گروهها تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P=0.001). نتایج حاصل از جدول ۱، کاهش تعداد اسپرم پایین‌تر از حد طبیعی را در گروه ۶ که دوز ۲۵ میلی‌گرم تستوسترون را ۱ بار در هفته به مدت ۴ هفته دریافت کرده بودند نسبت به گروههای دیگر نشان داد.

جدول ۱: مقایسه تأثیرات دوزهای مختلف تزریق تستوسترون بر میزان اسپرم

گروه	دوز	تعداد تزریق	طول دوره تزریق	10^4 (تعداد اسپرم در میلی‌مترمربع) انحراف معیار ± میانگین
۱	شاهد	-	-	۳۲۰ ± ۳۶^{a}
۲	۰/۰۱ میلی‌گرم	۳ بار در هفته	۳ هفته	۳۳۰ ± ۴۰^{a}
۳	۰/۱ میلی‌گرم	۳ بار در هفته	۳ هفته	$۳۸۳ \pm ۱۸^{a,b}$
۴	۱ میلی‌گرم	۳ بار در هفته	۳ هفته	۲۷۵ ± ۴۰^{a}
۵	۱۰ میلی‌گرم	۳ بار در هفته	۳ هفته	۲۴۹ ± ۲۶^{a}
۶	۲۵ میلی‌گرم	۱ بار در هفته	۴ هفته	۱۵۳ ± ۸

a: تفاوت معنی‌دار با گروه ۶، b: تفاوت معنی‌دار با گروه ۵

بررسی آزواسپرمی ناشی از ۶ هفته تزریق تستوسترن و برگشت‌پذیری آزواسپرمی ناشی از قطع تزریق تستوسترون بعد از گذشت ۳ هفته از آخرین تزریق

در جدول ۲ نتایج حاصل از ۶ هفته تزریق تستوسترون به گروه آزمون ۱ با گروه شاهد که ۶ هفته آب مقطر هم حجم تستوسترون دریافت کردند و گروه آزمون ۲ که ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون، دارویی دریافت نکردند، مقایسه شده

است. با توجه به جدول ۲ تفاوت در میانگین تعداد اسپرم در گروهها معنی‌دار بود. (P=0.008). نتایج حاصل از جدول ۲ نشان داد که گروهی که ۳ هفته از آخرین تزریق تستوسترون دارویی دریافت نکردند با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند در حالی با گروهی که ۶ هفته تستوسترون دریافت کرده بود تفاوت معنی‌داری داشتند و این تاثیر تستوسترون بر تعداد اسپرم و برگشت تعداد اسپرم به حالت طبیعی بعد از قطع تزریق دارو را نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۲، میانگین درصد زنده ماندن اسپرم در گروه شاهد، ۵۸ درصد در گروه آزمون ۱، ۴۷ درصد و در گروه آزمون ۲، ۵۲ درصد بود و بین گروهها تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<0.005). نتایج حاصل از جدول ۲، نشان داد که درصد تحرک اسپرم در این گروهها هیچ تغییری نکرده بود. با توجه به اشکال ۲ و ۳ که تصویری از بیضه در گروهی است که ۶ هفته تستوسترون دریافت کرده‌اند، ملاحظه می‌شود که در برخی از لوله‌ها هیچ اسپرمی دیده نشده و در بعضی اسپرم کمی مشاهده شد و خالی بودن برخی لوله‌ها از اسپرم در تصاویر دیده می‌شود. در شکل ۴ که تصویر از بیضه در گروهی است که ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون، دارو دریافت نکردند در بعضی از لوله‌ها باز هم اسپرم دیده شد.

جدول ۲: بررسی برگشت‌پذیری آزواسپرمی ناشی از تزریق تستوسترون بعد از گذشت ۳ هفته از آخرین تزریق

گروه	۱۰۴× (تعداد اسپرم در میلی‌متر مربع) میانگین ±انحراف معیار	میزان‌درصد زنده‌ماندن اسپرم میانگین ±انحراف معیار	میزان‌درصد تحرک اسپرم میانگین ±انحراف معیار
شاهد	۲۸۵±۳۰[a]	۵۸±۲	۶۴±۱
آزمون ۱	۹۳±۲۳	۴۷±۳[b]	۵۴±۱
آزمون ۲	۲۷۳±۴۹[a]	۵۲±۳[b]	۵۵±۱

شاهد: گروهی که ۶ هفته آب مقطر دریافت کردند.

آزمون ۱: گروهی که ۶ هفته تستوسترون به میزان mg/mouse ۲۵ هفتگی دریافت کردند.

آزمون ۲: گروهی که ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون به میزان ۲۵mg/mouse هفتگی، دارویی دریافت نکردند.

a: تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد

b: تفاوت معنی‌دار با گروه آزمون ۱

بررسی تغییرات ساختار بیضه بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون و برگشت‌پذیری تغییرات ساختار بیضه ناشی از قطع تزریق تستوسترون، بعد از ۳ هفته از آخرین تزریق

در جدول ۳ پارامترهای ساختار بیضه در گروه آزمون ۱ که ۶ هفته تستوسترون با دوز ۲۵mg/mouse، دریافت کردند با گروه شاهد که ۶ هفته آب مقطر هم حجم تستوسترون دریافت کردند و گروه آزمون ۲ که ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون، دارو دریافت نکردند، مقایسه شدند.

با توجه به جدول ۳، میان پارامتر قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در بین گروهها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P=0.15). با توجه به جدول ۳، میان ضخامت اپی‌تلیوم در بین گروهها نیز تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<0.005). نتایج حاصل از جدول ۳ نشان داد که ضخامت اپی‌تلیوم در گروههایی که تستوسترون دریافت کرده‌اند نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی‌داری داشته است و ضخامت اپی‌تلیوم کاهش یافته است. اما بعد از قطع تزریق تستوسترون به مدت ۳ هفته این اختلاف در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته است و اندازه ضخامت اپی‌تلیوم به حالت طبیعی نزدیک شده است. با توجه به جدول ۳، میان تعداد سلولهای اسپرماتوگونیا در گروهها تفاوت معنی‌داری ملاحظه شد (P<0.005). نتایج حاصل از جدول ۳ نشان داد که بین گروه آزمون ۲ با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد که این تاثیر تستوسترون بر تعداد سلولهای اسپرماتوگونیا را نشان می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از جدول ۳، نشان داد که تعداد سلولهای اسپرماتوگونیا در گروههایی که ۳ هفته از آخرین تزریق تستوسترون دریافت کردند تفاوت داشته است و تعداد سلولهای اسپرماتوگونیا افزایش یافته است ولی این افزایش در مقایسه با افزایشی که بقیه رده‌های سلولی شامل اسپرماتوسیت و اسپرماتیدگرد داشتند کمتر بوده است. با توجه به جدول ۳، میان تعداد سلولهای اسپرماتوسیت در بین گروهها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<0.005). نتایج حاصل از جدول ۳، نشان داد که گروه آزمون ۲ با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری دارد که این تأثیرات تستوسترون بر تعداد سلولهای اسپرماتوسیت را نشان می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از

جدول ۳: بررسی برگشت‌پذیری تغییرات ساختار بیضه ناشی از تزریق تستوسترون (میانگین ±انحراف‌معیار)، بعد از گذشت ۳ هفته از آخرین تزریق

گروه	قطرلوله اسپرم‌ساز (میکرومتر)	ارتفاع اپی‌تلیوم لوله اسپرم ساز (میکرومتر)	تعداد سلولهای اسپرماتوگونی در میلی متر	تعداد سلولهای اسپرماتوسیت در میلی متر	تعداد سلولهای اسپرماتید گرد
شاهد	۱۸/۱±۰/۷	۵/۶±۰/۲	۵/۲±۰/۱	۱۲/۸±۰/۳	۲۲/۷±۰/۱
آزمون۱	۱۹/۵±۰/۳	۳/۲±۰/۰[a]	۳/۴±۰/۱[a]	۷/۹±۰/۱[a]	۱۲/۲±۰/۴[a]
آزمون۲	۲۰/۳±۰/۱	۴/۶±۰/۰	۴۳۶/۰±۰/۱	۱۲/۱±۰/۱	۲۱/۴±۰/۱

شاهد: گروهی که ۶ هفته آب مقطر دریافت کردند.

آزمون ۱: گروهی که ۶ هفته تستوسترون با دوز mg/mouse ۲۵ هفتگی دریافت کردند.

آزمون ۲: گروهی که ۳ هفته تستوسترون با دوز mg/mouse ۲۵ هفتگی، دارویی دریافت نکردند.

a: تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و گروه آزمون ۲.

جدول ۳، نشان داد که بین گروههایی که ۳ هفته بعد از آخرین تزریق تستوسترون، دارویی دریافت نکردند نسبت به گروهی که ۶ هفته تستوسترون دریافت کردند تفاوت معنی‌داری وجود دارد و تعداد سلولهای اسپرماتوسیت افزایش یافته است و در واقع برگشت رده‌های مختلف سلولی سیکل اسپرماتوژنزیس به حالت طبیعی را نشان می‌دهد. بررسی میانگین تعداد سلولهای اسپرماتیدگرد در گروههای مورد مطالعه نیز تفاوت معنی‌دار بین گروهها را نشان می‌دهد ($P<0.005$). نتایج حاصل از جدول ۳، نشان داد که بین گروه آزمون ۱ و گروه شاهد تفاوت معنی‌دار وجود دارد که این تأثیر تستوسترون بر تعداد سلولهای اسپرماتیدگرد را نشان می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از جدول ۳، نشان داد که بین گروههایی که ۳ هفته از آخرین تزریق تستوسترون دارویی دریافت نکردند با گروهی که ۶ هفته تستوسترون دریافت کردند از نظر تعداد سلولهای اسپرماتیدگرد تفاوت معنی‌داری وجود دارد و تعداد سلولهای اسپرماتیدگرد افزایش یافته است. و این برگشت تعدادی از این سلولها به حالت طبیعی را نشان می‌دهد. با توجه به اشکال ۲ و ۳ که تصویر از بیضه در گروهی است که ۶ هفته تستوسترون دریافت کردند، تحلیل اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و به دنبال آن کاهش سلولهای دیواره لوله و نامنظم شدن این لوله‌ها دیده شد. در شکل ۴ که تصویر از بیضه در گروهی است که ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون، دارو دریافت نکردند برگشت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز به حالت طبیعی مشاهده شد.

بحث

در تحقیق حاضر تأثیرات تستوسترون بر موش سوری‌نژاد Bulb-C بررسی شد. ابتدا دوز مناسب و تأثیرگذار تستوسترون روی موش سوری ارزیابی شد. بعد از تزریق دوزهای مختلف تستوسترون این نتیجه حاصل شد که تزریق mg ۲۵ تستوسترون انانتات به شکل تزریقی هفتگی حداکثر دوزی است که موش سوری توانایی تحمل آن را دارد. میانگین تعداد اسپرم در گروهی که ۶ هفته تستوسترون با دوز mg/mouse ۲۵ دریافت کرده بود نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت و تعداد اسپرم در میلی‌لیتر در این گروه به زیر حد طبیعی کاهش یافته بود که این تأثیرگذاری تستوسترون بر کاهش تعداد اسپرم را نشان می‌دهد. همچنین به منظور ارزیابی برگشت‌پذیری آثار تستوسترون در گروهی دیگر ۳ هفته بعد از ۶ هفته تزریق تستوسترون دارویی تزریق نشد و برگشت تعداد اسپرم در میلی‌لیتر به حد طبیعی آن مشخص شد. آزواسپرمی یا الیگواسپرمی با فشار گرما [۱۳ و ۱۴] یا دوزهای بالای تستوسترون می‌تواند ایجاد شود [۱۵-۱۷]. ترشح FSH و LH تحت کنترل هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین[1] از هیپوتالاموس است. هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین یک

1. Gonadoropin releasing hormone

دی‌کاپپتید[1] هستند که در هیپوتالاموس سنتز می‌شوند. باند شدن هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین با رسپتورهای گنادتروپ هیپوفیز باعث آزاد شدن FSH و LH می‌شود. هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین با یک پالس که مکرراً هر یک ساعت یا روزی یک بار اتفاق می‌افتد، ترشح می‌شوند. در سال ۱۹۸۲ کلارک (Clark) و کامینس (Cummins) [۱۸] با اندازه‌گیری مستقیم هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین در خون سیستم پورت هیپوفیزی - هیپوتالاموسی گوسفند نشان دادند که بالا رفتن LH در سرم با پالسهای هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین در خون پورت افزایش می‌یابد. هورمونهای گناد می‌توانند باعث کاهش آزاد شدن گنادوتروپین‌ها شوند و به این صورت است که هورمونهای گناد باعث کاهش آزاد شدن هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین می‌شوند و این هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین می‌شوند و این هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین با توانایی تأثیری که بر ترشح گنادوتروپین‌ها دارند اعمال اثر می‌کنند. در سال ۱۹۸۴ بریمنر (Bremner) و ماتسوماتو (Matsumoto) [۱۹] اظهار داشتند که مصرف تستوسترون به شکل اگزوژنوس (exogenous) به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش تکرار پالسهای هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین در مردان می‌شود. در سال ۱۹۸۹ شکتر (Shecter) و همکاران [۲۰] نشان دادند که مصرف تستوسترون با تأثیر مستقیم بر هیپوفیز ترشح FSH و LH را مهار می‌کند. تنظیم آزاد شدن هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین در یک قسمت از مسیر با واسطه‌گری آروماتیزه شدن تستوسترون به استرادیول (E2) انجام می‌شود. در سال ۱۹۹۴ باگاتل (Bagatell) و همکاران [۲۱] بیان کردند که در مردان هیپوگناد (hypogonadotropic hypogonadism) که با هورمونهای آزادکننده گنادوتروپین متناوب درمان می‌شده‌اند تا ترشح گنادوتروپین‌ها شروع شود، تزریق تستوسترون و استرادیول (E2) باعث کاهش ترشح FSH و LH شده است، در حالی که دی‌هیدروتستوسترون (DHT) جنین تأثیری نداشته است. در سال ۱۹۹۱ اوربان (Urban) و همکاران [۲۲] گفتند که به هر حال در مردان طبیعی تزریق هر دوی تستوسترون و دی‌هیدروتستوسترون باعث کاهش FSH سرم می‌شود. در سال ۱۹۹۷ ولدویس (Veldhvis) و همکاران [۲۵-۲۳] شرح دادند که اختلال در تکامل فاکتورهای ژنتیکی ممکن است روی مهار فیدبکی آزاد شدن گنادوتروپینها اثر بگذارد که تنها تأثیرات شناخته شده FSH و LH در گنادها است. به‌طور کلاسیک مشخص شده است که LH تولید استروئید (steroidogenesis) را تحریک می‌کند و مخصوصاً باعث سنتزتستوسترون در سلولهای لیدیک مردان می‌شود. در حالی که FSH باعث تحریک تولید اسپرم (spermatogenesis) می‌شود. LH همچنین یک تأثیر تحریکی جزیی بر اسپرماتوژنزیس در مردان دارد و این شاید با افزایش دادن سطح تستوسترون بین سلولی بیضه همراه باشد. در سال ۱۹۹۷ سیمونی (Simoni) و همکاران [۲۶، ۲۷] گزارش دادند که هر دو گنادوتروپین از طریق مکانیسم کلاسیک رسپتوری هورمونهای پروتئینی عمل می‌کنند و یک G-protein با ۷ کانال داخل غشایی با رسپتورهای دوتایی (Domain) درگیر است. بعد از باند شدن لیگاند، ادنیلات (adenylate) فعال می‌شود و باعث افزایش C-AMP داخل سلولی شده و پروتئین کیناز (Protein Kinase) فعال شده و فسفریلاسیون پروتئین را واسطه‌گری می‌کند و تأثیرات سلولی گنادوتروپینها را باعث می‌شود. در سال ۱۹۸۴ ماتسوماتو(Matsumoto) و همکاران [۲۸] ذکر کردند که در حالی که LH تأثیر مستقیم شناخته شده‌ای روی اپی‌تلیوم لوله‌های سمی نیفروس ندارد ولی با بالا بردن سطح داخل بیضه‌ای تستوسترون یک تأثیر تحریکی قابل توجه روی سلولهای سرتولی و اسپرماتوگونی دارد. FSH عامل تحریکی بزرگی در رشد لوله‌های سمی نیفروس در طول تکامل است. به همین خاطر در شمارش لوله‌ها ۸۰ درصد حجم بیضه را اشغال کرده‌اند. FSH عامل تعیین‌کننده مهمی در اندازه بیضه است و در شروع اسپرماتوژنزیس در دوران بلوغ مهم است. در مردان بالغ با وجود کاهش سطح FSH اگرچه تولید اسپرم کلی پایین آمده است ولی تا اندازه‌ای تولید اسپرم باقی می‌ماند و این در حالی است که سطح LH طبیعی است. در سال ۱۹۸۶ ماتسوماتو (Matsumoto) و همکاران [۲۹] نشان دادند که طبیعی شدن سطح FSH باعث می‌شود که تولید اسپرم، طبیعی شود و این تلویحاً اشاره دارد که FSH برای نرمال بودن کیفیت

1. De capeptide

اسپرماتوژنزیس در مردان بالغ نیاز است. گزارشهایی وجود دارد که اظهار می‌دارند در پریماتهای غیرانسانی در غیاب گنادوتروپینها، غلظت خیلی پایین آندروژن برای بقای سطح تولید اسپرم کافی است [۳۰، ۳۱ و ۳۲].

در تحقیق حاضر تأثیر تستوسترون روی سلولهای اسپرماتوگونیا مشخص کرد که کاهش در بقیه رده‌های سلولی ناشی از کاهش در این سلولها است. همچنین مشخص شد که تستوسترون اگزوژنوس می‌تواند به‌صورت موقت باعث آزواسپرمی در موش شده و بعد از قطع تزریق دارو، اسپرماتوژنزیس مجدداً به حالت طبیعی برمی‌گردد.

تقدیر و تشکر

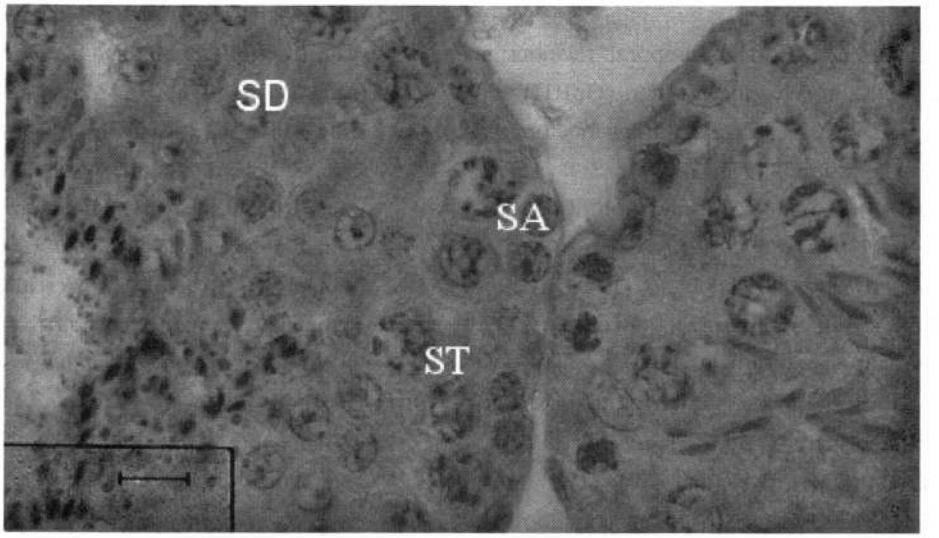
نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از گروه علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، ابراز می‌دارند.

References

1. **Glasier A.F, Anakwe R, Everington D, Martin CW, Vanderspuy Z, Cheng L, Ho PC, Anderson RA.** Would women trust their partners to use a mal pill ? Hum Reprod 2000; 15: 646-9.
2. **Martin CW, Anderson RA, Cheng L, Ho PC, Vanderspuy Z, Smith KB, Glasier AF, Everington D, Baird DT.** Potential impact of hormonal male contraception: cross - cultural implications for development of novel preparations. Hum Reprod 2000; 15: 637-45.
3. **World health organzation.** Contraceptive efficacy of testosterone induced azoospermia in normal men. Lancet 1990; 336: 995-1002.
4. **World health organization task force on methods for the regulation of male fertility.** Contraceptive effecacy of testosterone induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. Fertil Steril 1996; 65: 821-9.
5. **Zhang GY, Gu YQ, wang XH, Cui YG, Bremner WJ.** A pharmacokenetic sutdy of injectable testosterone undecanoate in hypogonadal men. J Androl 1998; 19: 791-68.
6. **Behre HM, Abshagen K, Oettel M, Hubler D, Nieschlag E.** Intramuscular injection of testosterone undecanoate for the treatment of male hypogonadism: phase I studies. Eur J Endocrinol 1999; 140: 414-9.
7. **Nieschlag E, Buchter D, Von Echardstein S, Abshagen K, Simoni M, Behre HM.** Repeated intramuscular injections of testosterone undecanoate for substitution therapy in hypogonadal men. Clin Endocrinol (OXF) 1999; 51: 757-63.
8. **Zhang GY, Gu YQ, wang XH, Cui YG, Bremner WJ.** A clinical trial of injectable testosterone undecanoate as a potential male contraceptive in normal chinese men. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 3642-7.
9. دکتر رضازاده ولوجردی مجتبی.تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، تهران، نشر و تبلیغ بشری. ۱۳۸۱.
10. **Wing TY, Christensen AK.** Morphometric studies on Rat seminiferous tubules. A M Y Anat 1982; 165: 13-25.
11. **Leblond CP, Clermont R.** Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelum in the rat. Ann NY Acad SCI 1952; 55: 548-52.
12. **Rowley MY, Heller CG.** Quantitation of the cell of the seminiferous epithelum of the human testis employing the sertoli cell as a constant. Zellforsch 1971; 1: 115-401.
13. **Guo CX, Hu ZY, Zou RJ, Liu YX.** Expression and regulation of orphan receptor TR2 mRNA in germ cells of cryptorchid testis in rat and rhesus monkey. Chinese Sci Bull 2000; 45: 720-5.
14. **Kandell FR, Swerdloff RS.** Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. Fertil Stril 1998; 49: 1-23.
15. **Liu K, Liu YX, Du Q.** Preliminary studies on the role of plasminogen activator in seminal plasma of human and rhesus monkey. Molec Hum Reprod 1996; 2: 99-104.
16. **Word Health Organization Task Force on Method for Regulation of Male Fertility.** Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligospermia in normal men. Lancet 1990; 336: 955-9.
17. **Word Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility.** Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligospermia in normal men. Fertil Steril 1996; 65:

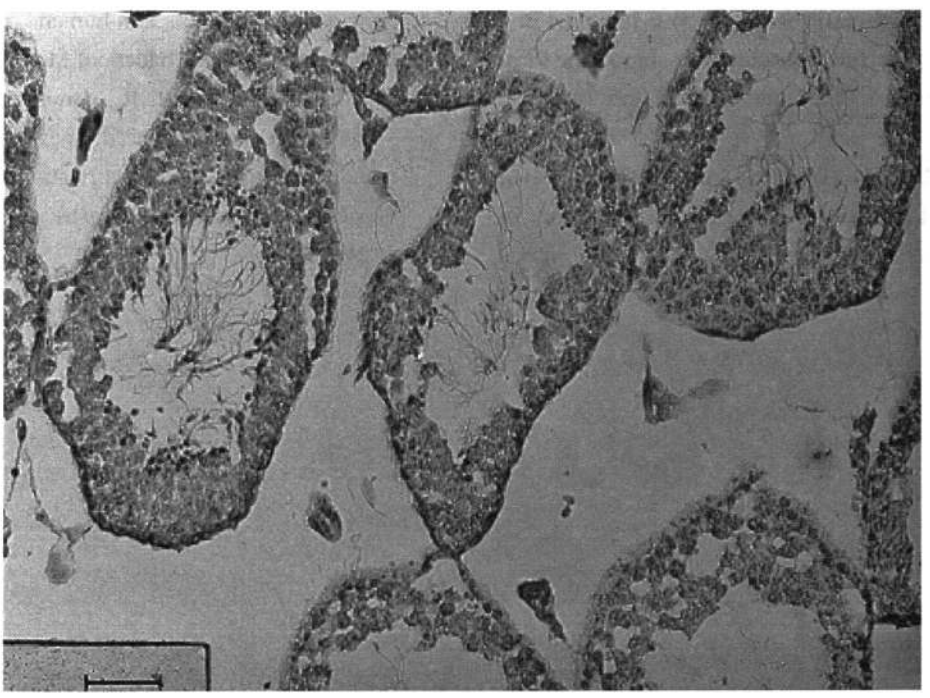
821-9.

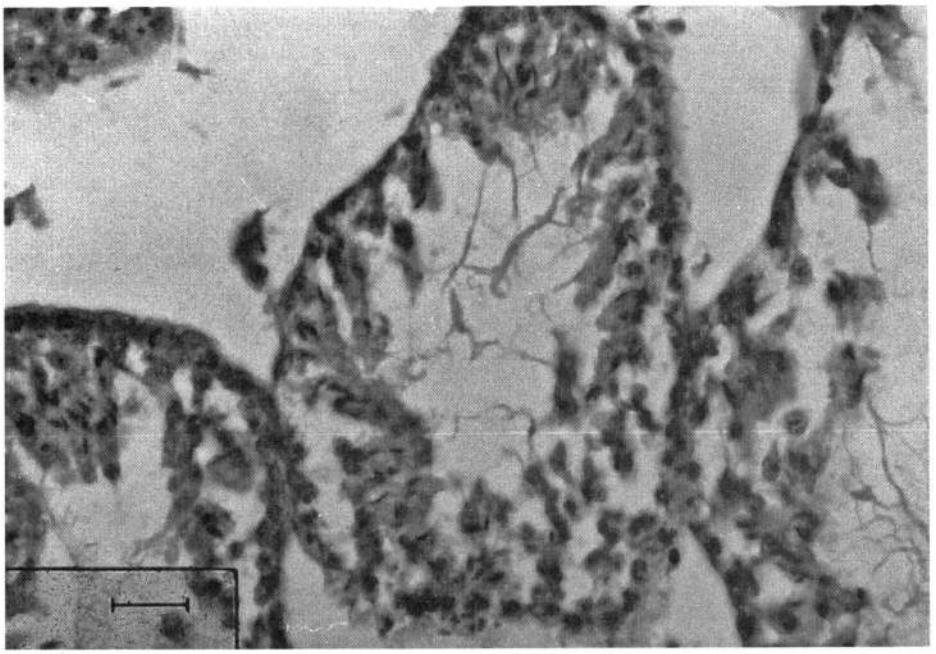
18. **Clarke IJ, Cummins JT.** The temporal relationship between gonadotropin releasing hormon (GnRH) and luteinizing hormon (LH) secretion in ovariectomized ewes. Endocrinology 1982; 111: 1737-9.
19. **Matsumoto AM, Bremner WJ.** Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in men. J Clin Endocrinol Metab 1984; 58: 609-14.
20. **Sheckter CB, Matsumoto AM, Bremner WJ.** Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect on the human pituitary. J Clin Endocrinol metab 1989; 68: 397-401.
21. **Bagatell CJ, Dahl KD, Bremner WJ.** The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estrogen. J Androl 1994; 15: 15-12.
22. **Urban RJ, Dahl KD, Padmanabhan V, Beitins IZ, Veldhuis JD.** Specific regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol: The dynamics of FSH secretion and clearance in human. J Androl 1991; 12: 27-35.
23. **Veldhuis JD, Iranmanesh A, Samoylik E, Urban RJ.** Differential sex steroid negetive feedback regulation of pulsatile follicle - stimulating hormone in healthy older men: de convolution analysis and steady - state sex - steriod hormon infusions in fre quently sampled healthy older individuals. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 1248-54.
24. **Lllingworth PY, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, Mc Neilly AS, Mather JP, Bremner WJ.** Inhibin - B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 1321-5.
25. **Mclachlan RL, Matsumoto AM, Burger HG, Dekretser DM, Bremner WJ.** The relative roles of follicle - stimulating hormone and luteinizing hormone in the control of inhibin secretion in normal men. J Clin Invest 1988; 82: 880-4.
26. **Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, Mcneilly AS, Bremner WJ.** Serum inhibin B levels reflect sertoli cell function in normal men with testicular dysfunction. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 3341-5.
27. **Simoni M, Gromoll J, Nicschlag E.** The follicle - stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, phisiology and pathophysiology. Endocr Rev 1997; 18: 739-73.
28. **Matsumoto AM, Paulsen CA, Bremner WJ.** Stimulation of sperm production in gonadotropin - suppressed normal men by physiological dosages of human luteinizing hormone. J Clin Endocrinol - Metab 1984; 59: 882-7.
29. **Matsumoto AM, Karpas AE, Bremner WJ.** Chronic human chorionic gonadotropin administration in normal men: evidence that follicle stimulating hormone is necessary for the maintenance of quantitatively normal spermatogenesis in men. J Clin Endocrinol Metab 1989; 62: 1184-92.
30. **Lunningham GR, Huchins C.** Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intra-testicular cocncentrations of testosterone. Endocrinology 1979; 105: 177-86.
31. **Weinbauer GF, Gockeler E, Nieschlag E.** Testosterone prevents the complete suppression of spermatogenesis in gonadotropin- releasing hormone antagonist treated non-human primate (Macaca Fscicularis). J Clin Endocrinol Metab 1988; 67: 284-90.
32. **Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL.** Maintenance of advanced spermatogenetic cells in adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. Endocrinology 1989; 124: 3043-9.



شکل ۱. تصویر از بیضه در گروه طبیعی که ۶ هفته آب مقطر هم‌حجم تستوسترون دریافت کردند. سلولهای اسپرماتوگونیا (SA)، اسپرماتوسیت (ST)، اسپرماتیدگرد (SD) در اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز مشخص شده است. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین & ائوزین، بزرگنمایی: ۱۰۰۰×

شکل ۲. تصویر از بیضه در گروهی که ۶ هفته تستوسترون با دوز mg/mouse ۲۵، هفتگی دریافت کردند. تحلیل اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز و نامنظم شدن آنها در تصویر مشخص است، در برخی از لوله‌ها هیچ اسپرمی دیده نمی‌شود و در برخی دیگر اسپرم کمی دیده می‌شود. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین & ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰×





شکل ۳. تصویر از بیضه در گروهی که ۶ هفته تستوسترون با دوز mg/mouse ۲۵، هفتگی دریافت کردند. تحلیل اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز و خالی بودن بعضی از لوله‌ها از اسپرم در تصویر مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین & ائوزین، بزرگنمایی: ۴۰۰×

شکل ۴. تصویر از بیضه در گروهی که ۳ هفته از آخرین تزریق تستوسترو، دارو دریافت نکردند. در بعضی از لوله‌ها مجدداً اسپرم مشاهده شده است و ساختار بافت لوله‌های منی‌ساز تقریباً مشابه گروه طبیعی است. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین & ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×