فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۲۰، جلد ۶، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۴۳ تا ۴۷

بررسی اثرات ناهنجار زایی دی اتیل استیل بسترول بر بافت بیضه در موش های بالغ سوری

سیده الهام حسینی[۱]، وحید حمایت خواه جهرمی[۲]، سید ابراهیم حسینی[۳]، محسن فروزانفر[۳]، حسین کارگر[۴]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، کارشناس ارشد علوم جانوری گروه زیست شناسی، جهرم. ایران.Elham_h1361@yahoo.com

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، استادیار علوم جانوری گروه زیست شناسی، جهرم. ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، استادیار علوم جانوری گروه زیست شناسی، مرودشت. ایران.

٤- ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری گروه زیست شناسی، جهرم. ایران.

تاریخ دریافت:۹۱/۱۰/۲٦ تاریخ پذیرش:۹۱/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه وهدف: دی اتیل استیل بسترول (DES) یکی از آگونیست‌های استروژنی است که در درمان برخی اختلالات نظیر سرطان سینه و پروستات کاربرد دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر DES بر روند اسپرماتوژنز در موش های سوری نر بالغ نژاد Balb/c بوده است.

روش کار: در این تحقیق از ۳۲ سر موش سوری نر بالغ با وزن ۳۵ تا ٤۰ گرم و سنی در حدود ۸۰ الی ۹۰ روز استفاده شد که به ٤ گروه ۸ تایی شامل گروه‌های کنترل، شاهد و گروه های تجربی دریافت کننده دوزهای ۱۰ میکروگرم و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم داروی DES تقسیم شدند. کلیه تجویزها به مدت ۲۱ روز به صورت درون صفاقی انجام گرفت. در پایان روز بیست و یکم، حیوانات را با اتر بی هوش و با جدا سازی بیضه ها ضمن اندازه گیری وزن آن ها، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرم، لایدیگ و سرتولی وهم چنین با خون گیری از قلب حیوانات و جدا سازی سرم میزان هورمون های LH و تستوسترون اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که DES تاثیری بر وزن بیضه ها، تعداد سلول‌های اسپرم، لایدیگ و سرتولی نداشته اما باعث کاهش سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید و هورمون تستوسترون گردیده و بر میزان LH تاثیری نداشت.

نتیجه گیری: DES باعث کاهش پیشرفت اسپرماتوژنز در موش شده است.

واژه‌های کلیدی: موش سوری، دی اتیل استیل بسترول، بیضه، اسپرماتوژنز.

مقدمه

تولید مثل فرآیندی است که تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می گیرد و محور هیپوتالاموس – هیپوفیز– گناد را تحت کنترل ژنتیکی و هورمونی قرار می دهد. جهش‌های ژنی در میان ژن‌های محور هیپوتالاموس– هیپوفیز–گناد با اختلال در کنترل و سنتز هورمون‌های جنسی و یا با اختلال در مورفولوژی و یا تعداد سلول-های جنسی موجب بروز اختلالاتی در سیستم تولید مثلی و ناباروری می گردد. DES به عنوان آگونیست هورمون استروژن برای اولین بار در سال ۱۹۳۷ در انگلستان ساخته و در سال ۱۹۵۰ جهت جلوگیری از سقط جنین تجویز می‌شد(۴، ۳). با مجوز سازمان بهداشت و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) از سال ۱۹۹۰ تا کنون از این دارو در درمان سرطان سینه در زنان جوان و پروستات در مردان استفاده می‌شود(۶، ۵). مطالعات نشان داده‌اند که DES یکی از عواملی است که می‌تواند عملکرد محور هیپوتالاموس– هیپوفیز–گناد را تحت تاثیر قرار دهد(۵). گیرنده‌های استروژنی در هیپوفیز و سلول‌های اسپرماتوژنیک حضور دارند، لذا مواد شیمیایی استروژنی می‌توانند بر عملکرد این بخش‌ها و بر روند اسپرماتوژنز تاثیر گذارند (۱). نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده اند

که، DES باعث القای آپوپتوز سلول‌های اسپرماتوژنیک در موش ها از طریق افزایش بیان ژن-های FAS/FASL می‌شود(۱۴، ۷). ترکیبات تستوسترونی می‌توانند از تنظیم بیان ژن‌های FAS/FASL القا شده توسط DES جلوگیری نمایند(۱۱، ۲). بر اساس مطالعات مشخص شده است که ژن‌های کد کننده پروتئین‌های FAS و FAS در سلول‌های سرتولی بیان می‌شوند که از طریق لیگاندهای مربوطه مرگ سلول‌های اسپرماتوژنیک را تسریع می-کنند(۱۶، ۱). پروتئین FAS با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون آغاز کننده مسیر آپوپتوزی می‌باشد(۱۲). مطالعات نشان داده‌اند که تیمار با DES باعث بروز تغییراتی در ساختار DNA می‌گردد(۱۶، ۸). با توجه به اهمیت فرآیند تولید مثل، شناخت عواملی که بر عملکرد سیستم تولید مثل تاثیر می‌گذارند، بسیار مهم و ضروری است. این پژوهش با هدف بررسی اثرات ماده شبه استروژنی DES بر عملکرد سیستم تولید مثلی انجام گرفت.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم در سال ۱۳۹۰ انجام گرفت. در این تحقیق از ۳۲ سر موش سوری سوری نر بالغ نژاد Balb/c با وزن تقریبی ۳۵ تا ۴۰ گرم و با سن حدوداً ۹۰ روزه تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه شیراز استفاده شد. نمونه ها به ۴ گروه ۸ تایی، شامل یک گروه کنترل، یک گروه شاهد و دو گروه تجربی تقسیم شدند. ابتدا هر یک از گروه ها در قفس-های جداگانه قرار گرفتند و به منظور سازگاری نمونه‌ها با محیط آزمایشگاه به آن‌ها یک هفته فرصت داده شد. هم چنین در طول دوره آزمایش همه حیوانات از آب و غذای یکسان برخوردار بوده در شرایط دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی گراد و نور طبیعی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد جهرم به تصویب رسید. بر اساس مطالعات مختلف دوز کشنده داروی DES برای موش های سوری ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن می باشد. دراین تحقیق گروه کنترل تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و دو گروه تجربی، هم زمان و به مدت بیست و یک روز با رعایت دوز کشنده دارو، به ترتیب دوز های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن داروی DES را به صورت درون صفاقی دریافت داشتند. کلیه تجویز ها در ساعت ۹ صبح انجام شد و در نهایت در روز پایانی برای تهیه نمونه‌های خونی و بافتی ابتدا حیوانات را با اتر به صورت خفیف تحت بی‌هوشی قرار داده و با شکافتن قفسه سینه و با کمک سرنگ ۵ میلی لیتری از قلب حیوانات خون‌گیری به عمل آمد و با جدا سازی بیضه‌های سمت چپ و راست، سرم مورد نیاز جهت سنجش میزان هورمون‌های LH و تستوسترون تهیه و با استفاده از کیت های هورمونی خریداری شده از شرکت کاوشیار ایران و با کمک دستگاه الیزا میزان هورمون های فوق اندازه‌گیری و پس از وزن نمودن بیضه‌ها، اقدام به شمارش تعداد سلول-های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرم، لایدیگ و سرتولی گردید. در این پژوهش نتایج براساس با آزمون های آماری T-test، ANOVA و دانکن با اختلاف میانگین $p<0/05$ و کمک برنامه آماری SPSS۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که داروی DES با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم به مدت بیست و یک روز در موش های سوری نر بالغ باعث کاهش معنی‌دار در غلظت هورمون تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل شده، اما در میزان غلظت

هورمون LH تاثیر معنی داری نداشته است (جدول ۱). در سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری دیده شد اما در تعداد سلول‌های اسپرم، لایدیگ و سرتولی تاثیر معنی داری نشد (جدول ۲). وزن نهایی بدن در موش ها و بیضه‌های چپ و راست در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری دیده نشد (جدول ۳).

جدول ۱- مقایسه میزان هورمون های LH و تستوسترون در گروه های تجربی تیمارشده با DES نسبت به گروه کنترل

گروه‌ها	میانگین هورمون LH (µg/ml)	میانگین هورمون تستوسترون (µg/ml)
کنترل	۰/۲۱±۰/۰۰۶	۰/۷۳±۰/۰۰۱
شاهد	۰/۲±۰/۰۰۶	۰/۷۲±۰/۰۰۱
تجربی با دوز ۱۰ µg /kg	۰/۱۷±۰/۰۰۸	۰/۷۴±۰/۰۰۱
تجربی با دوز ۲۰ µg /kg	۰/۱۷±۰/۰۵	۰/۰۰۳±۰/۰۰۰۴

اختلاف معنی دار در سطح $P<۰/۰۵$

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک در گروه‌های تجربی تیمارشده با DES نسبت به گروه کنترل

گروه‌ها	اسپرماتوگونی	اسپرماتوسیت	اسپرماتید	اسپرم	لایدیگ	سرتولی
کنترل	۶۶/۴۵±۲/۶۵	۷۰/۲±۲/۳۴	۱۴۶/۴۷±۵/۰۹	۸۴/۷۷±۵/۴۸	۱۰±۰/۱۹	۲۲/۸۵±۰/۸۴
شاهد	۶۴/۸۹±۲/۱۲	۷۰/۰۸±۱/۷۶	۱۴۴/۹۱±۴/۱۲	۸۳/۰۶±۴/۱۷	۹/۷۶±۰/۱۹	۲۱/۹۸±۰/۸۲
تجربی با دوز ۱۰ µg/kg	۵۹/۸۷±۳/۴۷	۶۲/۲۷±۲/۷۳	۱۴۰/۲۱±۷/۵	۸۱/۹۲±۳/۰۰	۹/۷۲±۰/۱۹	۲۱/۹۵±۰/۸۱
تجربی با دوز ۲۰ µg /kg	۵۵/۴۶±۱/۷۶	۵۹/۴۴±۱/۳۸	۱۳۲/۲۸±۹/۴۲	۷۹/۵۶±۵/۳۷	۹/۳۲±۰/۴۲	۲۰/۹۶±۰/۷۷

اختلاف معنی دار در سطح $P<۰/۰۵$

جدول ۳- مقایسه میانگین وزن بدن و بیضه راست و چپ در گروه های تجربی تیمار شده با DES نسبت به گروه کنترل

گروه‌ها	وزن نهایی بدن	وزن بیضه راست	وزن بیضه چپ
کنترل	۳۷/۸۲±۱/۰۹	۰/۱۳±۰/۰۰۳	۰/۱۲±۰/۰۰۷
شاهد	۳۷/۷۹±۱/۱۲	۰/۱۲±۰/۰۰۵	۰/۱۲±۰/۰۰۵
تجربی بادوز ۱۰ µg /kg	۳۶/۵۳ ± ۱/۳۸	۰/۱۱±۰/۰۰۷	۰/۱۱±۰/۰۰۷
تجربی با دوز ۲۰ µ g /kg	۳۳/ ۴۲ ± ۱/۰۶	۰/۱±۰/۰۰۷	۰/۱±۰/۰۰۶

اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۵$

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش اثر داروی DES بر میزان هورمون‌های LH و تستوسترون و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرم، لایدیگ و سرتولی بر روی ۳۲ سر موش سوری نر بالغ بررسی شد. نتایج به‌دست آمده بیان‌گر آن است که غلظت سرمی هورمون تستوسترون و تعداد سلول‌های

اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار و غلظت هورمون LH و تعداد سلول‌های اسپرم،لایدیگ و سرتولی و هم چنین وزن بیضه های چپ و راست در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی-داری نداشت. امروزه با توجه به شیوع سرطان سینه در زنان و سرطان پروستات در مردان استفاده از داروهای ضد سرطان نظیر DES کاربرد فراوانی پیدا کرده است. DES از دسته دارو های آگونیست استروژنی می‌باشد که از طریق افزایش بیان ژن‌های FAS/FASL سلول-های اسپرماتوژنیک باعث القا آپوپتوزیس سلول‌های مذکور می‌گردد(۱۱)که در نتیجه آن سلول‌های اسپرماتید کاهش می‌یابند(۱۸). بر اساس مطالعات هیستولوژیکی بافت بیضه مشخص شده است که اثرات آپوپتوزیس داروی DES با افزایش دوز مصرفی شدیدتر می‌شود (۹). DES از طریق اثر بر غده هیپوفیز و سرکوب روند اسپرماتوژنز باعث کاهش تعداد سلول‌ها و میزان هورمون تستوسترون می‌گردد (۱۵، ۲).از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که تجویز درون وریدی تستوسترون تکثیر سلول‌های اسپرماتوژنیک را افزایش می‌دهد(۱۳) و لذا کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید می‌تواند به دلیل کاهش تستوسترون در حضور DES باشد. اگر چه سلول‌های سرتولی منبع بالقوه FASL می‌باشد، سلول‌های اسپرماتوگونی نیز قادر به بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های FAS و FASL به طور هم‌زمان می‌باشند(۱۷، ۷). به نظر می-رسد که سلول‌های اسپرماتوگونی نیز نسبت به تغییرات القا شده با DES از دیدگاه بیان ژن FAS/FASL و در نتیجه مرگ سلولی آسیب پذیر باشند(۱۰). از طرف دیگر احتمالاً کاهش سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوسیت نیز می‌تواند به دلیل کاهش تعداد سلول-های اسپرماتوگونی باشد. بنابراین با توجه به تحقیق حاضر و براساس شواهد و مدارک مطرح شده و با توجه به میزان کاهش تعداد سلول‌های جنسی موش‌ها چنین نتیجه گیری می‌شود که DES از طریق مهار تقسیمات سلول‌های زاینده باعث کاهش پیشرفت روند اسپرماتوژنز در موش‌های سوری نر بالغ نژاد Balb/c شده است.

تشکر و قدردانی

در پایان نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند که از همکاری‌های معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

1.Akingbemi, B. T., Hardy, M. P. (2001). Antiandrogenic chemical in the environment effects on male reproductive. Health, 33; 391-403.
2.Amador, A. G., Esquifino, A. I., Hodges, S. L. (1989). DES induced rat spermatogenic cell apoptosis. Cell, 45; 245-253.
3.Anony, M. (1991). Diethylstilbestrol effects of exposure in utero. Health, 18; 933-957.
4.Barnes, A. B. (1990). Fertility and outcome of pregnancy in women exposed in utero to diethylstilbestrol. N Engl J Med, 770-782.
5.Briston, N. Y. (1995). Prostate cancer yields to drugs, 15Dec, New York, U.S.A.
6.Clark, L. C., Portier, K. M. (1989). Diethyl stilbestrol and the risk of cancer. N Engl J Med, 263-
264.
7.Dalessio, A., Riccioli, A. (2001). Testicular fasL is expressed by sperm. Cell, 98-113.
8.Goyal, H. O., Braden, T. D. (2001). Effects of maternal exposure to alow dose. DES, 927-934.
9.Greenberg, E. R. (1994). Breast cancer in mothers given diethyl stilbestrol in pregnancy. N Engl J Med, 311-320.
10. Mittendorf, R., Williams, M. A. (1995). DES exposure in utero and risk of pre- eclampsia. N Engl J Med, 6; 245- 265.

11. Miura, M., Sasagawa, I., Suzuki, Y. (2002). FAS/ FASL up regulation is followed increased caspase- 8 breakdown and activation of caspase-9 and 3. DES, 278-312.

12. Rao, A. V., Shaha, C. (2002). Toxicant induced oxidative stress in cancer. Cancer, 133-137.

13. Russell, L. D., Ren, H. P., Sinha, H. I. (2004). Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil. N Engl J Med, 25; 107-193.

14. Sapi, E., Brown, W. D., Lim, C. (2002). Changes in FAS/ FASL in response to DES. Treatment, 243-250.

15. Sinha, H., Swerdloff, R. S. (2005). Effects of DES supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in DES treated male rats. Treatment, 4; 38-47.

16. Williams, K., Saunders, P . T., Fisher, J .S. (2000). Cell endocrind, 117-131.

17. Xu, J. P., Li, X., Morio, T. (1999). Inhibition of translation and induction of apoptosis by buhyavirat nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. Cell endocrind, 33-49.

18. Zuger, A. M. (2009). Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testis irrespective of testicular steroidogenesis. Treatment, 8; 94-110.

.

.