مقاله پژوهشی

اثرمحافظتی ملاتونین بر کیفیت اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم در موش تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید

دکتر فهیمه محمدقاسمی* ، سینا خواجه جهرمی ، نیلوفر هدایتی امامی****

دریافت : ٩٠/٤/١٩ ، پذیرش : ٩٠/٨/٢

چکیده:

مقدمه و هدف: ملاتونین مهمترین هورمون مترشحه غده اپی فیز، به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی پتانسیل بالائی جهت خنثی سازی سموم دارویی دارد. هدف از این مطالعه، تعیین اثر ملاتونین بر کیفیت اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم در بیضه موش بالغ تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید(ASA) می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی موش های نر NMRI به ٤ گروه تقسیم شدند: ١) کنترل ٢) تحت درمان با ASA ٣) تحت درمان با ملاتونین ٤) تحت درمان با ASA و ملاتونین. ASA به میزان ٥٠mg/kg از طریق گاواژ برای مدت ١٤ روز و ملاتونین به میزان ١٠mg/kg بصورت داخل صفاقی به مدت ٥ روز تجویز می شد. موش های کنترل از طریق گاواژ نرمال سالین دریافت می کردند. ١٥ روز پس از درمان بیضه و اپیدیدیم تشریح شد. ارزیابی ها از طریق جدول جانسون و مطالعه پارامترهای اسپرم انجام شد. آنالیزهای آماری از طریق آزمون ANOVA صورت گرفت.

نتایج: موش های تحت درمان با ASA در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی داری در درجه بندی جدول جانسون و کیفیت اسپرماتوژنز ($P<٠/٠٥$)، و پارامترهای اسپرم ($P<٠/٠٠١$) داشتند. ملاتونین در گروه ٤، بصورت معنی دار بلوغ لوله های سمی نیفروس ($P<٠/٠٥$)، کیفیت و کمیت پارامترهای اسپرم را در مقایسه با گروه ٢ افزایش داد($P<٠/٠٥$).

نتیجه نهائی : چنین به نظر می رسد که تجویز داخل صفاقی ملاتونین به مدت ٥ روز، یک عامل مهم برای بهتر کردن کیفیت اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم موش ، در بیضه تحت درمان با ASA می باشد و این عمل از طریق کاهش دادن استرس های اکسیداتیو صورت می گیرد.

کلید واژه ها: آسپرین / اسپرم سازی / بیضه / ملاتونین

مقدمه :

استیل سلیسیلیک اسید(Acetylsalicylic acid; ASA) یا آسپرین، از دسته داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی می باشد که دارای اثرات مهار کننده سنتز پروستاگلاندینها می باشد(١). پروستاگلاندین ها در بلوغ جنسی، بروز رفتارهای مردانه و تولیدمثل مردان، فعالیت استروئیدوژنز سلول های لیدیگ و تولید تستوسترون می توانند نقش تنظیم کننده داشته باشند(٢،٣). پروستاگلاندینها بر روی تحرک اسپرم، ظرفیت گیری و واکنش آکروزومی(٤،٥) تحریک انقباض لوله سمی نیفروس از طریق تأثیر بر روی سلول های میوئید در اطراف لوله های سمی نیفروس و همچنین در فرایند آزادسازی اسپرم به داخل لوله سمی نیفروس نقش دارند(٦). آنزیم های کاتالیز کننده پروستاگلاندین در موش و انسان در سلول های لیدیگ و زایای بیضه بیان می شوند(٧) ضمن این که نشان داده شده است که مجاری دستگاه تناسلی مردانه مانند سلول های پوشش اپیدیدیم، دفران و کیسه منی نیز حاوی مقادیر زیادی آنزیم کاتالیز کننده پروستاگلاندین هستند (٣،٥،٨). استیل سلیسیلیک اسید که به عنوان یکی از داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی است از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز دارای خاصیت آنتی پروستاگلاندین است و به طور وسیعی جهت درمان تب، درد، التهاب و همچنین بیماری هایی مانند روماتوئید و استئوآرتریت(٧) لوپوس

* استادیار بافت شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان

** دانشجوی رشته پزشکی ، کمیته تحقیقات دانشجوئی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان (sinakhajehjahromi@gmail.com)

اریتماتوز و جهت کنترل آسیب های بافتهای نرم- التهاب تاندون ها و بورس ها استفاده می شود. این دارو به صورت پروفیلاکسی جهت جلوگیری از حملات قلبی عروقی، سرطان های دستگاه گوارش به خصوص کولورکتال و نیز دستگاه پروستات مورد استفاده قرار می گیرد(۷،۸) مصرف استیل سلیسیلیک اسید در دوز بیش از ۸۰mg/kg/day در انسان با ایجاد عوارض ناشی از سمیت داروئی همراه است(۸).

تجویز ۵۰ mg/ kgاستیل سلیسیلیک اسید به مدت دو هفته در رت های بالغ و نابالغ با کاهش تعداد اسپرماتیدها (۹) و همچنین کاهش سطح تستوسترون و افزایش سطوح LH (Luteinizing hormone) و FSH (Follicle stimulatory hormone) همراه است(۱۰). در گوسفندان تجویز استیل سلیسیلیک اسید به میزان ۱۵۰ mg/kg/dayبرای مدت چهار روز منجر به کاهش تعداد اسپرم و حجم مایع منی می شود (۱۱).

ملاتونین که یکی از ترشحات غده اپی فیز است میتواند در تنظیم برخی پدیده ها ی فیزیولوژیک شرکت نماید. ملاتونین دارای عملکرد نورونی-هورمونی، تنظیم تولیدمثل، ایمنی و دما می باشد. علاوه بر این موارد ملاتونین بر روی تکثیر و تزاید و تمایز سلولی اثر دارد(۱۲،۱۳) همچنین دارای اثرات ضد سرطانی و ضد پیری است. ملاتونین تعداد زیادی رادیکال های آزاد و مضر مانند رادیکال های هیدروکسیل، پر اکسیل و آنیون های پراکسی نیترات را برداشت و خنثی می نماید(۱۴) و در واقع ملاتونین استرس های اکسیدانی را به طرق متعددی کاهش می دهد(۱۵). تجویز یک دوز بالا، ۱۰۰ mg/kgملاتونین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در معرض اشعهX ، مانع ایجاد آسیب‌های حاد در بیضه آنها می‌شود (۱۶). علاوه بر این مطالعات تجویز ملاتونین در موش‌های دیابتیک تحت درمان با استروپتوزوتوسین (۱۷) و نیز موش‌های تحت درمان با سیس پلاتین و بوسولفان (۲۰-۱۸) باعث کاهش عوارض جانبی داروهای نامبرده روی بیضه می‌شود. رایتر معتقد است که ملاتونین می‌تواند سمیت و عوارض جانبی داروها را کاهش دهد (۱۵) در انسانها نشان داده شده است که تجویز ملاتونین، ۳۰ دقیقه قبل از مصرف آسپرین باعث حفظ مخاط معده و بهبود وضعیت زخم معده می شود (۲۱). به نظر می رسد برخی از اثرات موثر ملاتونین ناشی از تاثیر آن بر تولیدات پروستاگلاندین ها باشد. در مطالعات انجام شده بصورت In vivo نشان داده شده است که مصرف اگزوژن ملاتونین باعث افزایش غلظت پروستا گلاندین F2 می شود(۲۲). در رتها، برداشت غده اپی فیز، که با حذف ملاتونین همراه است باعث کاهش بروز بیان ژن سیکلواکسیژناز و ترشح پروستاگلاندین می شود، در حالی که تجویز ملاتونین به آنها این اثرات را از بین می برد(۲۳) همچنین نشان داده شده که مصرف ملاتونین در رتها بصورت وابسته به دوز باعث افزایش میزان تولید پروستا گلاندین E2 می شود (۲۳).

با جستجوهای بعمل آمده در پایگاههای اطلاعاتی از سوی پژوهشگران در ارتباط با اثرات توأم ملاتونین و استیل سلیسیلیک اسید بر روی اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم گزارشی در دسترس نمی باشد. لذا این مطالعه با هدف تعیین اثر محافظتی ملاتونین بر روی تغییرات هیستوپاتولوژیک اسپرماتوژنز و پارامتر های اسپرم شامل حرکت، تعداد و مورفولوژی نرمال در موش سوری بالغ تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید انجام گرفت.

روش کار:

در این مطالعه تجربی از ۳۲ سر موش نر بالغ ۸ تا ۱۰ هفته نژاد NMRI استفاده گردید. جهت تطابق حیوانات به مدت دو هفته در قفس های خود با دسترسی آزاد به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد شامل: شرایط تاریکی و روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت، درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵ درصد نگهداری شدند. پس از آن حیوانات به ۴ گروه، هر گروه شامل ۸ سر موش، تقسیم شدند.

۱. گروه کنترل: به مدت ۱۴ روز، روزانه ۰/۵ ml نرمال سالین به صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت می کردند.
۲. گروه تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید: به مدت ۱۴ روز، روزانه ۵۰mg/kg استیل سلیسیلیک اسید (Sigma-USA) به صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت می کردند.

دوز و مدت مصرف استیل سلیسیلیک اسید بر اساس مطالعات قبلی انجام شده بر روی رتها انتخاب شده بود(۱۰).

۳. گروه تحت درمان با ملاتونین: که به مدت ۵ روز روزانه ۱۰mg/kg ملاتونین(Sigma-USA) دریافت می کردند.

دوز و مدت مصرف ملاتونین بر اساس مطالعات قبلی

انجام شده بر روی رت و موش انتخاب شده بود(۱۸،۲۰) و ملاتونین بصورت داخل صفاقی تزریق می شد.

۴. گروه درمان ترکیبی: که هـم mg/kg ۱۰ ملاتـونین بـه مـدت ۵ روز و هـم ASA ۵۰mg/kg بـه مـدت ۱۴ روز استفاده می کردند.

پانزده روز پس از شروع درمان، همه حیوانات به طریقه جابجایی نخاع، کشته و بیضه و اپیدیدیم آن هـا از حفـره شکم خارج می شد و به دقت از یکدیگر جدا مـی گردیـد. جهت ثبوت بافتی، بیضه ها بـه داخـل محلـول فیکـساتیو فرمالدئید بافری ۱۰ در صد به مدت ۷۲ سـاعت در دمـای اتاق غوطه ور می شدند.

ارزیابی پارامترهای اسپرم : جهت ارزیابی پارامترهای اسـپرم از دم اپیدیدیم اسـتفاده گـشت کـه بـداخل پتـری دیـش حاوی محلول هامز F_{10} (Sigma) کـه قبـل از اسـتفاده در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم شده بود انتقال داده می شد. به منظور خارج شـدن اسـپرم هـا از اپیدیـدیم، اپیدیـدیم بـا کمک تیغه جراحی به قطعـات کوچـک بریـده مـی شـد و سپس پتری دیش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵ درصد به مدت نیم ساعت قرار داده می شد.

پس از گذشت نیم ساعت پتری دیش از انکوباتور خارج می شد. جهت ارزیابی حرکت، ۲ قطره از محلـول بـر روی یک اسلاید میکروسکوپی چکانده و سپس بر روی هر کدام یک لامل قرار داده می شد. در هر حیوان حـداقل ۵ فیلـد میکروسکوپی با بـزرگ نمـایی ×۴۰۰ مـورد مطالعـه قـرار گرفته و درصد اسپرم های متحرک مشخص می گشت.

همچنین ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی یک لام نئوبار انتقال داده می شد و تعداد اسـپرم هـا در ۵ خانه شمارش می گردید و به صـورت 10^6 بـر میلـی لیتـر بیان مـی شـد. همچنـین یـک قطـره ۲۰ میکرولیتـری از سوسپانسیون اسپرم بر روی یک اسلاید گسترانده و پس از خشک شدن در هوا در اتانول ۹۶ در صد فیکس می شد و سپس با روش پاپا نیکولا رنگ آمیزی می گردید و پـس از چـسباندن لامـل هـا و خـشک شـدن آن هـا در زیـر میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۱۰۰۰ از نظر مورفولوژی سر و دم مورد ارزیابی قرار می گرفتند. مواردی مانند کـوچکی و یا بزرگی سر، شکل غیر نرمال سر یا دو سر بودن و جدایی سـر از دم، دم کوتـاه، دم بلنـد، مـارپیچی بـودن دم، دم خمیده وجود دو دم به عنوان غیـر نرمـال در نظـر گرفتـه شده و به صورت درصد بیان می شدند.

مطالعه بـافتی: پـس از گذشـت سـه روز از فیکـساسیون و اطمینان از ثبوت بافتی بیضه ها، نمونه ها جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری مـورد پاسـاژ بـافتی قـرار گرفتنـد. بـه منظور پاساژ از اتانول با درجات صعودی، گزیلن و پـارافین مذاب استفاده می شد. جهت بـه حـداکثر رسـاندن تعـداد برش های مناسـب لولـه هـای سـمی نیفـروس در مقطـع عرضی، بیضه ها در جهت محـور طـولی در پـارافین قالـب گیری می شدند. سپس بـا اسـتفاده از دسـتگاه میکروتـوم دوار(Leitz, Germany) مقاطعی بـه ضـخامت ۵ میکـرون تهیه می شد. از هـر بیـضه ۴ اسـلاید تهیـه و بـه طریقـه هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olampus, Japan) و با درشت نمایی ×۴۰۰ مورد مطالعه قرار می گرفتند.

مطالعه کیفیت و بلوغ لوله های سمی نیفروس با روش جانسون: به منظور مطالعه بلوغ و کیفیت لوله های سمی نیفروس از روش جانسون اسـتفاده مـی شـد (۲۴). بـدین منظـور از مقطع عرضـی ۱۰۰ لولـه سـمی نیفـروس در هـر حیـوان استفاده مـی شـد و بـه هـر لولـه نمـرات ۱ تـا ۱۰ تعلـق می گرفت. ضمن این که درصد لوله ها با بلوغ بالا (نمـرات ۹ و ۱۰) نیز محاسبه می شد.

براسـاس معیارهـای زیـر بـه هـر مقطـع عرضـی لولـه سـمی‌نیفـروس، نمـره داده مـی‌شـد(۲۰،۲۴)

۱۰: اسپرماتوژنز کامل، تعـداد زیـادی سـر اسـپرم کـه در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند.

۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد ولی لومن گرد و مـنظم دیده نمی‌شود.

۸: تعداد اسپرم خیلی کم است.

۷: اسپرم دیده نمی‌شود ولی تعداد زیادی اسـپرماتید گـرد دیده می‌شود.

۶: تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می‌شود.

۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمـی‌شـود. تعـداد زیادی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود.

۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اولیه دیـده مـی‌شـود.

۳: هـیچ اسپرماتوسـیت اولیـه دیـده نمـی‌شـود. فقـط اسپرماتوگونی دیده می‌شود.

۲: هیچ سلول زایایی وجود نـدارد. فقـط سـلول سـرتولی دیده می‌شود.

۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می‌شود و لوله‌ها آتروفیک هستند.

ضخامت اپیتلیوم ژرمینال : جهت ارزیابی ضخامت اپیتلیوم ژرمینال لوله سمی‌نیفروس، از گریدهای مدرج خطی نصب شده بر لنز چشمی میکروسکوپ استفاده شد. در هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ لوله سمی‌نیفروس در مقطع عرضی گرد و یا تقریباً گرد انتخاب و مطالعه شدند. لوله‌هایی که بیضوی بودند یا برش مایل داشتند مطالعه نشدند. با بزرگنمایی ×۴۰۰ اقطار لوله‌های سمی‌نیفروس یعنی از غشاء پایه یکطرف لوله تا غشاء پایه طرف دیگر براساس میکرومتر محاسبه گردید. ابتدا دو قطر عمود بر هم محاسبه و سپس میانگین اقطار در هر لوله محاسبه شد (۱۹).

تحلیل آماری: نتایج مورفولوژی میکروسکوپ نوری در نمونه های مورد مطالعه با هم مقایسه می شدند. بلوغ اسپرماتوژنز و همچنین کلیه پارامتر های اسپرم و اپیدیدیم شامل درصد حرکت، مورفولوژی غیر نرمال و تعداد اسپرم ها با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل می شدند. یافته ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر $P\leq ۰/۰۵$ معنی دار تلقی می گشت. همچنین جهت ارزیابی تفاوت معنی دار بین گروهها از تست توکی استفاده می شد.

نتایج:

الف) پارامترهای اسپرم های اپیدیدیم : میانگین اسپرمهای متحرک و درصد اسپرم های غیر نرمال و تعداد اسپرم ها در جدول ۱ نشان داده شده است. مصرف ۵۰ mg/kg استیل سلیسیلیک اسید به مدت دو هفته در موش بالغ، تمام پارامتر های اسپرم شامل تعداد، درصد اسپرم متحرک و درصد اسپرم های نرمال را در مقایسه با کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P<۰/۰۰۱$). مصرف ۱۰ mg/kg ملاتونین به مدت ۵ روز اثر سوء بر روی اسپرم در مقایسه با کنترل نداشت. اگر چه به نظر می رسید مصرف ملاتونین تعداد اسپرم ها را (۳/۰ ±۳۲/۲میلیون بر میلی لیتر) در مقایسه با کنترل (۳/۴ ±۲۹/۷میلیون بر میلی لیتر) افزایش داده است ولی این افزایش معنادار نبود($P<۰/۰۷$). در گروه تحت درمان ترکیبی استیل سلیسیلیک اسید و ملاتونین در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معناداری در پارامتر های حرکت اسپرم، تعداد و مورفولوژی غیر نرمال سر دیده نشد. هر چند که درصد دم های غیر نرمال در گروه آخر در مقایسه با کنترل، تفاوت معنی داری نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). مصرف ملاتونین در گروه آخر، منجر به افزایش پارامترهای حرکت(۳/۰±۸۰/۱ درصد در مقابل ۴۰ ±۵۰/ ۷۱ درصد)، تعداد(۲/۶ ±۲۶/۸ در مقابل ۳/۱ ±۱۲/۶ میلیون بر میلی لیتر) و مورفولوژی نرمال اسپرم در مقایسه با گروه دوم شد که فقط استیل سلیسیلیک اسید مصرف می نمود(جدول ۱).

جدول ۱: میانگین اثر آسپرین و ملاتونین بر روی پارامترهای اسپرم اپیدیدیم موش بالغ

	حرکت (درصد)	تعداد ($\times ۱۰^{۶}$)	مورفولوژی غیر نرمال سر (درصد)	مورفولوژی غیر نرمال دم (درصد)
کنترل	۸۳/۶± ۵/۶	۲۹/۷± ۳/۴	۴/۹± ۱/۷	۵/۵± ۰/ ۶^{b}
آسپرین	۷۱ /۵۰±۴۰^{ab}	۱۲/۶± ۳/۱^{ab}	۹/۲۱± ۱/۱^{ab}	۱۴/۰± ۱/ ۴^{ab}
ملاتونین	۸۷/۴± ۵/۲^{b}	۳۲/۲± ۳/۰^{b}	۴/۱۰± ۱/۳	۵/۱± ۰/۸^{b}
آسپرین و ملاتونین	۸۰/۱±۳/۰	۲۶/۸± ۲/۶	۴/۶۵± ۰/۳	۷/۴± ۱/۳^{a}

a : در مقایسه با گروه کنترل$P<۰/۰۰۱$ ، b : در مقایسه با گروه ملاتونین + آسپرین $P<۰/۰۴$.

ب) یافته های هیستولوژیک و کیفیت بلوغ اسپرماتوژنز : مطالعه هیستولوژی مقاطع بافتی نشان داد که در مقاطع بیضه مربوط به گروه کنترل، اسپرماتوژنز فعال در لوله های سمی نیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده میشد. در داخل لوله ها، رده های مختلف سلولهای اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف تقسیم به همراه سلولهای سرتولی دیده می شدند. در این لوله ها اپی تلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود (۴/۲±۶۸/۰۱ میکرون) و سرحد مجاری لوله ها منظم بود. مجرای لوله سمی نیفروس به صورت کاملاً مشخص و روشن دیده می شد. همچنین در بافت بینابینی تجمعاتی از سلولهای اسیدوفیل لیدیگ به همراه عروق و سایر سلول های همبندی مشهود بود (شکل۱-A). کیفیت بلوغ لوله ها در حد بالا۹/۱±۰/۲ و تقریباً تمام لوله ها (۱/۴ ±۹۶/۶ درصد) از بلوغ کامل اسپرماتوژنز برخوردار بودند(جدول۲).

در گروه تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید، انواع مختلف سلول های زایا و سرتولی در داخل لوله ها دیده می شد ولی به نظر می رسید که تعداد آن ها کاهش یافته باشد. همچنین ضخامت اپی تلیوم ژرمینال(۳/۶ ±۵۲/۳ در مقابل ۴/۲±۶۸/۰۱ میکرون) در مقایسه با کنترل کاهش نشان داد. ضمن اینکه در ضخامت اپی تلیوم برخی لوله ها واکوئل نیز مشاهده می شد که این حالت در گروه کنترل

به هیچ وجه دیده نشد(شکل۱-B). در بافت بینابینی سلول های لیدیگ تفاوت خاصی با کنترل مشاهده نشد(شکلB). مصرف ۵۰ mg/kg استیل سلیسیلیک اسید به مدت ۲ هفته، بلوغ و درصد لوله های بالغ سمی نیفروس(۴/۳ ±۷۹/۳ در مقابل ۴ /۱ ±۹۶/۶ درصد) را به طور معنی دار در مقایسه با کنترل کاهش داد(جدول ۲).

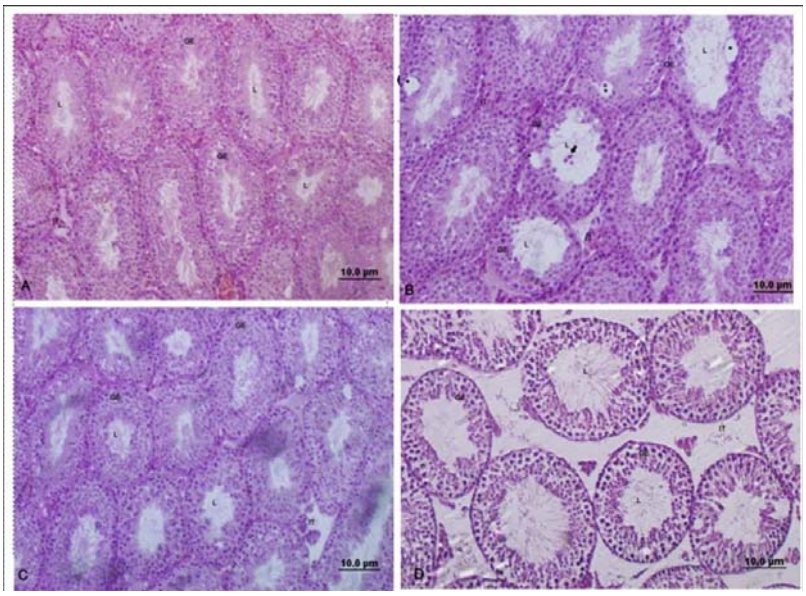
مصرف ۱۰ mg/kg ملاتونین در گروه سوم، نتوانست باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیک در لوله های سمی نیفروس و همچنین بافت بینابینی گردد(شکل۱-C). همچنین در این گروه مانند گروه کنترل اسپرماتوژنز فعال در تمام لوله ها دیده می شد و عمده لوله ها نیز از بلوغ اسپرماتوژنز برخوردار بودند(جدول ۲).

در گروه تحت درمان ترکیبی با استیل سلیسیلیک اسید و ملاتونین، لوله های سمی نیفروس مورفولوژی بهتری در مقایسه با گروه تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید نشان می دادند. تمام انواع سلول های زایا و سرتولی در ضخامت اپی تلیوم دیده می شد. در مقایسه با گروه دوم واکوئل در ضخامت اپی تلیوم مشاهده نمی شد(شکل۱-D). مصرف ملاتونین توأم با استیل سلیسیلیک اسید در گروه آخر ، باعث افزایش کیفیت(۸/۶±۰/۱ در مقابل۷/۰۸ ±۰/۱) و درصد بلوغ اسپرماتوژنز(۸۸/۱ ±۱ /۴ در مقابل ۷۹/۳ ±۴/۳) در مقایسه با گروه تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید شد($P<0/001$). هر چند که در مقایسه با کنترل هر دو پارامتر کاهش معنی دار داشتند ($P<0/001$)، (جدول ۲).

جدول ۲: میانگین اثر آسپرین و ملاتونین بر روی کیفیت بلوغ لوله های سمی نیفروس موش بالغ

	بلوغ لوله های سمینی فروس	درصد لوله های سمینی فروس بالغ	ضخامت اپیتلیوم ژرمینال(میکرون)
کنترل	۹/۱± ۰/۲^{b}	۹۶/۶± ۱/ ۴^{b}	۶۸/۰۱±۴/۲
آسپرین	۷ /۰۸± ۰/۱^{ab}	۷۹/۳± ۴/۳^{ab}	۵۲/۳± ۳/۶^{ab}
ملاتونین	۸/۹± ۰/۶	۹۵/۸± ۳/۹^{b}	۶۳/۰۱± ۶/۶۳
آسپرین و ملاتونین	۸ /۶±۰/۱^{a}	۸۸/۱± ۱/ ۴^{a}	۶۰/۳۴± ۳/۱

a : در مقایسه با گروه کنترل$P<0/03$، b : در مقایسه با گروه ملاتونین + آسپرین $P<0/001$



شکل ۱: فوتومیکروگراف نوری از لوله های سمینی فروس موش Aکنترل ، B تحت درمان با استیل سلسیلیک اسید C تحت درمان با ملاتونین و D تحت درمان ترکیبی.

در کنترل به اسپرماتوژنز فعال در لوله ها توجه شود. درسمینی فروس موش تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید. به کاهش ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال در برخی لوله ها، حضور واکوئل (*) در ضخامت اپی تلیوم و همچنین حضور سلولهای ریزش یافته در داخل لومن که با فلش مشخص شده اند توجه نمائید. در گروه تحت در مان ترکیبی به بهبود وضعیت اسپرماتوزنز داخل لوله ها و مورفولوژی بهتر لوله ها و عدم حضور واکوئل و یا سلولهای ریزش یافته درلوله ها توجه نمائید. لومن (L)، اپی تلیوم ژرمینال (GE) ، بافت بینابینی (IT)، رگ خونی(BV). رنگ آمیزی هماتوکسیلین ، ائوزین. بزرگنمائی ۲۰۰ برابر.

بحث:

مطالعه حاضر اثرات استیل سلیسیلیک اسید و ملاتونین را بر روی پارامتر های اسپرم شامل تحرک، مورفولوژی و تعداد اسپرم و همچنین کیفیت بلوغ اسپرماتوژنز بررسی نمود که مارکر های مهمی برای کیفیت اسپرم هستند و این پارامتر ها می توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه بدهند. در این مطالعه تجویز ۵۰ mg/kg استیل سلیسیلیک اسید طی مدت ۱۴ روز، باعث کاهش کلیه پارامتر های اسپرم (تعداد، حرکت، مورفولوژی نرمال) شد. به طور مشابهی دیدالکار در سال ۱۹۸۰ نشان داد که تجویز ۵۰ mg/kg برای مدت ۱۴ روز و۳۰ روز در رت ها باعث کاهش حرکت اسپرم می شود(۹). همچنین نشان داده شده است که مصرف استیل سلیسیلیک اسید به میزان ۱۵ mg/kg برای ۱۰ هفته باعث کاهش حرکت اسپرم و تعداد اسپرم در رتها می شود و در نتیجه میزان باروری آن ها را کاهش می دهد(۱۵). این اثرات احتمالاً می تواند ناشی از اثرات آنتی پروستاگلاندینی استیل سلیسیلیک اسید و خاصیت مهار کنندگی آنزیم سیکلواکسیژناز باشد که بر روی تحرک اسپرم نقش دارند(۴). در تأیید این یافته کندی در سال ۲۰۰۳ نشان داد که افزایش مهار کننده های سیکلواکسیژناز به نمونه اسپرم بوقلمون، باعث کاهش حرکت اسپرم می شود(۵). ضمن این که میزان ۵۰۰ mg استیل سلیسیلیک اسید در طی یک هفته، با کاهش حرکت اسپرم انسان نیز همراه است(۱۲). مشابه با مطالعه ما مصرف استیل سلیسیلیک اسید در رت ها (۱۳،۲۵) انسان(۱۲) و همچنین در گوسفندان (۱۶) باعث کاهش تعداد اسپرم در اپی دیدیم می گردد. کاهش تعداد اسپرم ناشی از مصرف استیل سلیسیلیک اسید می تواند همچنین ناشی از کاهش قدرت انقباضی اپیدیدیم و دفران نیز باشد(۲۶،۲۷). استیل سلیسیلیک اسید باعث مهار عملکرد سلول های لیدیگ می شود که در تولید تستوسترون نقش دارند و یک هورمون بسیار مهم در فرایند اسپرماتوژنز می باشد(۱۶). نشان داده شده است که مصرف استیل سلیسیلیک اسید باعث ایجاد اثرات سوء بر روی متابولیسم بیضه، اپیدیدیم، سمینال وزیکول ، دفران و منجر به ایجاد اثرات آنتاگونیستی آندروژنی و آنتی آنابولیکی در رت ها می شود(۲۸).

یافته کاهش تعداد اسپرم، با یافته مورفولوژیک ما در ارتباط با کاهش بلوغ و درصد رسیدگی لوله های سمی نیفروس به دنبال درمان با استیل سلیسیلیک اسید مطابقت دارد. به عبارت دیگر مطالعه ما نشان داد که در اپیتلیوم ژرمینال گروه های تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید، واکوئل بین سلول های زایا دیده می شود در واقع این واکوئلها می‌توانند نشان‌دهنده از دست دادن اتصالات سلولی و یا کاهش مولکول‌های چسبنده مانند کادهرینها باشند و می‌توانند به‌عنوان یکی از علائم پره‌آپوپتوز مطرح باشند(۲۰).

کاهش بلوغ و درصد رسیدگی لوله های بالغ در مطالعه حاضر شاید ناشی از مرگ سلول های زایا و یا آپوپتوز آنها به دنبال مصرف استیل سلیسیلیک اسید باشد. هر چند که ما مطالعه ای در این زمینه انجام ندادیم. در تائید این یافته، نشان داده شده که درمان با نمی سولاید منجر به تغییرات آپوپتوتیک فراساختاری در اپیتلیوم دفران می شود (۳). ضمن این که بیشتر دارو های NSAID می توانند آپوپتوز را در سلول های التهابی از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز القا نمایند. بنا براین باعث تجمع اسید آراشیدونیک در سلول می شوند که برای سلول سایتوتوکسیک می باشد(۲۹).

در مطالعه حاضر اثر تجویز ملاتونین به تنهایی و به صورت توأم با استیل سلیسیلیک اسید بر روی اسپرماتوژنز و پارامتر های اسپرم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

ملاتونین به عنوان مهم ترین ترشحات غده اپی فیز، یک آنتی اکسیدان بسیار مؤثر و خنثی کننده رادیکالهای آزاد است(۳۰). ملاتونین به دلیل داشتن سایز کوچک و خاصیت چربی دوستی زیاد به راحتی از غشاء سلول عبور کرده و در کل سلول پخش می شود. غلظت آن در هسته سلول بسیار بالا است و DNA را در برابر عوامل مخرب حفظ می نماید(۳۱). مطالعه حاضر نشان داد که مصرف ۱۰ mg/kg ملاتونین برای مدت ۵ روز، به صورت توأم با استیل سلیسیلیک اسید، اثرات سوء استیل سلیسیلیک اسید را بر روی اسپرماتوژنز و اسپرم کاهش می دهد. احتمالاً این تغییرات و روند حفظ اسپرماتوژنز با بلوغ بهتر در گروه چهارم نسبت به گروه دوم می‌تواند ناشی از چند مکانیسم باشد:

الف- خاصیت آنتی اکسیدانی قوی ملاتونین، چرا که ملاتونین می‌تواند فعالیت و یا بروز ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند: سوپر اکسید دیس موتاز، گلوتاتیون

ردوکتاز و گلوتاتیون پر اکسیداز را تحریک نماید (۱۵).
ب- خواص آنتی‌آپوپتوتیک ملاتونین، که با مهار روند آپوپتوز سلول‌های زایا مانع تخریب اسپرماتوژنز شده است (۱۸). در تایید این مطلب، اثرات آنتی آپوپتوتیک ملاتونین بر روی بافت‌های مختلف در چندین آزمایش دیگر نشان داده شده است(۱۸،۲۰)

ج- خواص آنتی‌پرولیفراتیو ملاتونین، شاید ملاتونین با مهار روند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، روند تمایز آنها را به اسپرماتوسیت مهار می‌نماید و باعث می شود که اثرات سوء دارو بر سلولهای زایا کمتر محرز شود (۲۰).

به طور مشابه با مطالعه ما، مصرف ملاتونین در رتهای دیابتی و تحت درمان با سیس پلاتین و بوسولفان آسیب وارده به بیضه را کاهش می دهد(۲۰-۱۸). همچنین یک دوز بالا ۱۰۰ mg/kg ملاتونین در رت های در معرض اشعه X، آسیب های پوستی را کاهش می دهد(۱۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استیل سلیسیلیک اسید باعث کاهش درصد بلوغ لوله های سمی نیفروس شد(۷۹/۳ درصد). در حالی که مصرف ملاتونین توأم با استیل سلیسیلیک اسید میزان بلوغ و درصد بلوغ را در لوله های سمی نیفروس افزایش می دهد(۸۸ درصد).

در انتها، مطالعات فرا ساختاری سلول های زایا و سوماتیک بیضه و مطالعات مولکولی در زمینه مکانیسم اثر استیل سلیسیلیک اسید و ملاتونین بر بیضه از جمله مواردی است که جهت مطالعات بعدی پیشنهاد می گردد.

نتیجه نهایی:

چنین به نظر می رسد که تجویز داخل صفاقی ملاتونین به مدت ۵ روز، یک عامل مهم برای بهتر کردن کیفیت اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم موش ، در بیضه تحت درمان با ASA می باشد و این عمل از طریق کاهش دادن استرس های اکسیداتیو صورت می گیرد.

منابع :

1. Fortan P, Hawkey C. drug-induced gastrointestinal disorders. Medicine 2007; 35(4):210-15
2. Gupta C, Gentlejewski CA. Role of prostaglandins in the testosterone dependent wolffian duct differentiation of the fetal mouse. Biol Reprod 1992; 47(6): 1151-1160
3. Balaji T, Ramanathan M, Menon VP. Localization of cyclooxygenase-2 in mice vas deferens and its effects on fertility upon suppression using nimesulide: a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. Toxicology 2007;234(1-2):135-144.
4. Gottlieb C, Svanborg K, Eneroth P, Bygdeman M. Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphate content. Fertil Steril 1988; 49(2):322-7.
5. Kennedy JH, Korn N, Thurston RJ. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. Reprod Biol Endocrinol 2003; 9(1):74.
6. Tripiciano A, Filippini A, Ballarini F, Palombi F. Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2alpha. Mol Cell Endocrinol 1998; 138(1-2):143-50.
7. Qstensen M, Khamashta M, Lokshin M, Parke A, Brucato A, Carp H, et al. Anti- inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction. Arthritis Res Therap 2006; 8(3): 209- 228.
8. Martínez ME, Greenberg ER. More aspirin for less cancer? J Natl Cancer Inst 2007;99(8):582-3.
9. Didolkar AK, Patel PB, Roychowdhury D. Effect of aspirin on spermatogenesis in mature and immature rats. Int J Androl 1980; 3(5):585-93.
10. Didolkar AK, Gurjar A, Joshi UM, Sheth AR, Roychowdhury D. Effects of aspirin on blood plasma levels of testosterone, LH and FSH in maturing male rats. Int J Androl 1980;3(3):312-8.
11. Gwayi N, Bernard RT. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. Andrologia 2002; 34(6):391-6.
12. Stutz G, Zamudio J, Santillán ME, Vincenti L, de Cuneo MF, Ruiz RD. The effect of alcohol, tobacco, and aspirin consumption on seminal quality among healthy young men. Arch Environ Health 2004; 59(11):548-52.
13. Polat A, Emre MH. Influence of melatonin and acetylsalicylic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in gastric mucosa. J Gastroenterol 2006; 4:507-508.
14. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal model. Int J Exp Pathol 2006; 87(3):237-50.
15. Reiter RJ, Tan D-x, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. Cell Biochem Biophys 2001; 34:237-256.
16. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. Trombosis Res 2003; 110: 255-258.
17. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. Eur Surg Res 2008; 40(4):354-60.
18. Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşi AO, Yilmaz S, Yüce A, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. J Pineal Res 2006; 41(1):21- 7.
19. Mohamadghasemi F, Faghani M, Khajehjahromi S. [Protective effect of melatonin on histologic

changes of adualt mouse testis treated by busulfan]. Journal of Reproduction and infertility 2010; 11(2): 67-77.(Persian)
20. Mohamadghasemi F, Faghani M, Khajehjahromi S, Bahadori M Nasiri E, Hemadi M. Effect of Melatonin on proliferative activity and apoptosis in spermatogenic cells in mouse under chemotherapy. Journal of Reproduction & Contraception 2010; 21(2): 79-94.
21. Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Brzozowska I, Drozdowicz D, et al. Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. J Pineal Res 2005; 39(4):375-85.
22. Abecia JA, Forcada F, Valares JA, Zúñiga O, Kindahl H. Effect of exogenous melatonin on in vivo and in vitro prostaglandin secretion in Rasa Aragonesa ewes. Theriogenology 2003; 60(7): 1345-55.
23. Konturek PC, Celinski K, Slomka M, Cichoz-Lach H, Burnat G, Naegel A, et al, Konturek SJ. Melatonin and its precursor L-tryptophan prevent acute gastric mucosal damage induced by aspirin in humans**.** J Physiol Pharmacol 2008; 59 (Suppl 2):67-75.
24. Aral F, Karaçal F, Baba F. The effect of enrofloxacin on sperm quality in male mice. Res Vet Sci 2008; 84(1):95-9.
25. Dare WN, Noronha CC, Kusemiju OT, Okanlawon OA. The effect of ethanol on spermatogenesis and fertility in male Sprague-Dawley rats pretreated with acetylsalicylic acid. Niger Postgrad Med J 2002; 9(4):194-8.
26. Shang X, Huang Y, Ye Z, Yu X, Gu W. Protection of melatonin against damage of sperm mitochondrial function induced by reactive oxygen species. Zhonghua Nan Ke Xue 2004; 10(8): 604-7.
27. Kokolis N, Theodosiadou E, Tsantarliotou M, Rekkas C, Goulas P, Smokovitis A. The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. Andrologia 2000; 32(2):107-14.
28. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. Biomed Pharmacother 2006; 60(3):97-108.
29. Fujinoki M. Melatonin-enhanced peractivation of hamster sperm. Reproduction 2008; 136(5): 533-41.
30. Tanyildizi S, Bozkurt T. Effects of acetylsalicylic acid and metamizol on hyaluronidase activity and sperm characteristics in rams. Anim Reprod Sci 2003; 76(3-4):195-204.
31. Asok KR, Chinoy NJ. Effects of acetylsalicylic acid on reproductive organs of adolescent male rats. Endocrinol Exp 1988; 22(3):187-195.