

## اثر محافظتی ملاتونین بر کیفیت اسپر ماتوژنز و پارامترهای اسپرم در موش تحت درمان با استیل سلیسیلیک اسید

دکتر فهیمه محمدقاسمی\*، سینا خواجه چهرمی\*\*، نیلوفر هدایتی امامی\*\*

دریافت: ۹۰/۴/۱۹، پذیرش: ۹۰/۸/۲

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** ملاتونین مهمترین هورمون مترشحه غده اپی فیز، به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی پتانسیل بالایی جهت خنثی سازی سموم دارویی دارد. هدف از این مطالعه، تعیین اثر ملاتونین بر کیفیت اسپر ماتوژنز 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 ۴ گروه تقسیم شدند: (۱) کنترل (۲) تحت درمان با ASA (۳) تحت درمان با ملاتونین (۴) تحت درمان با ASA و ملاتونین. ASA به میزان ۵۰ mg/kg از طریق گاوژ برای مدت ۱۴ روز و ملاتونین به میزان ۱۰ mg/kg بصورت داخل صفاقی به مدت ۵ روز تجویز می شد. موش های کنترل از طریق گاوژ نرمال سالین دریافت می کردند. ۱۵ 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 اسپر ماتوژنز ( $P < 0.05$ )، و پارامترهای اسپرم ( $P < 0.001$ ) داشتند. ملاتونین در گروه ۴، بصورت معنی دار بلوغ لوله های سمی نیفروس ( $P < 0.05$ )، کیفیت و کمیت پارامترهای اسپرم را در مقایسه با گروه ۲ افزایش داد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه نهایی:** چنین به نظر می رسد که تجویز داخل صفاقی ملاتونین به مدت ۵ روز، یک عامل مهم برای بهتر کردن کیفیت اسپر ماتوژنز 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:

آزادسازی اسپرم به داخل لوله سمی نیفروس نقش دارند (۶). آنزیم های کاتالیز کننده پروستاگلاندین در موش و انسان در سلول های لیدیگ و زایای بیضه بیان می شوند (۷) 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 (۳، ۵، ۸). استیل سلیسیلیک اسید که به عنوان یکی از داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی است از طریق مهار آنزیم سیکلوآکسیژناز دارای خاصیت آنتی پروستاگلاندین است و به طور وسیعی جهت درمان تب، درد، التهاب و همچنین بیماری هایی مانند روماتوئید و استئوآرتریت (۷) لوپوس

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 (۱). 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 (۲، ۳). پروستاگلاندینها بر روی تحرک اسپرم، ظرفیت گیری و واکنش آکروزومی (۴، ۵) تحریک انقباض لوله سمی نیفروس از طریق تأثیر بر روی سلول های میوئید در اطراف لوله های سمی نیفروس و همچنین در فرایند

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

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

پروستاگلاندین ها باشد. در مطالعات انجام شده بصورت *In vivo* نشان داده شده است که مصرف آگروژن 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 سیکلو اکسیژناز و ترشح پروستا گلاندین 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 پارامترهای 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 ۵۰ mg/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 ۱۰ mg/kg ملاتونین (Sigma-USA) دریافت می کردند. دوز و مدت مصرف ملاتونین بر اساس مطالعات قبلی

اریتماتوز و جهت کنترل آسیب های بافتی های 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 ۸۰ mg/kg/day در انسان با ایجاد عوارض ناشی از سمیت دارویی همراه است (۸).

تجویز ۵۰ mg/kg استیل 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/day برای 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 های فیزیولوژیک شرکت نماید. ملاتونین دارای عملکرد نورو-هورمونی، تنظیم تولیدمثل، ایمنی و دما می باشد. علاوه بر این موارد ملاتونین بر روی تکثیر و تزیاید 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/kg ملاتونین در موش های بزرگ آزمایشگاهی در معرض اشعه X، مانع ایجاد آسیب های حاد در بیضه آنها می شود (۱۶). علاوه بر این مطالعات تجویز ملاتونین در موش های دیابتیک تحت درمان با استروپتوزوتوسین (۱۷) و نیز موش های تحت درمان با سیس پلاتین و بوسولفان (۲۰-۱۸) باعث کاهش عوارض جانبی داروهای نامبرده روی بیضه می شود. رایتر معتقد است که ملاتونین می تواند 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

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 هم  $10 \text{ mg/kg}$  ملاتونین به مدت ۵ روز و هم  $50 \text{ mg/kg}$  ASA به مدت ۱۴ روز استفاده می کردند.

پانزده روز پس از شروع درمان، همه حیوانات به طریقه جابجایی نخاع، کشته و بیضه و اپیدیدیم آن ها از حفره شکم خارج می شد و به دقت از یکدیگر جدا می گردید. جهت ثبوت بافتی، بیضه ها به داخل محلول فیکساتیو فرمالدئید بافوری ۱۰ در صد به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق غوطه ور می شدند.

ارزیابی پارامترهای اسپرم: جهت ارزیابی پارامترهای اسپرم از دم اپیدیدیم استفاده گشت که بداخل پتری دیش حاوی محلول هامز  $F_{10}$  (Sigma) که قبل از استفاده در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم شده بود انتقال داده می شد. به منظور خارج شدن اسپرم ها از اپیدیدیم، اپیدیدیم با کمک تیغه جراحی به قطعات کوچک بریده می شد و سپس پتری دیش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و  $\text{CO}_2$  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 محلول بر روی یک اسلاید میکروسکوپی چکانده و سپس بر روی هر کدام یک لامل قرار داده می شد. در هر حیوان حداقل ۵ فیلد میکروسکوپی با بزرگ نمایی  $400\times$  مورد مطالعه قرار 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 اسپرم ها در ۵ خانه شمارش می گردید و به صورت  $10^6$  بر میلی لیتر بیان می شد. همچنین یک قطره ۲۰ میکرولیتری 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 پس از چسباندن لامل ها و خشک شدن آن ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی  $1000\times$  از نظر مورفولوژی سر و دم مورد ارزیابی قرار می گرفتند. مواردی مانند کوچکی و یا بزرگی سر، شکل غیر نرمال سر یا دو سر بودن و جدایی سر از دم، دم کوتاه، دم بلند، مارپیچی بودن دم، دم خمیده وجود دو دم به عنوان غیر نرمال در نظر گرفته شده و به صورت درصد بیان می شدند.

**مطالعه بافتی:** پس از گذشت سه روز از فیکساسیون و اطمینان از ثبوت بافتی بیضه ها، نمونه ها جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری مورد پاساژ بافتی قرار گرفتند. به منظور پاساژ از اتانول با درجات صعودی، گزین و پارافین مذاب استفاده می شد. جهت به حداکثر رساندن تعداد برش های مناسب لوله های سمی نیفروس در مقطع عرضی، بیضه ها در جهت محور طولی در پارافین قالب گیری می شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, Germany) مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه می شد. از هر بیضه ۴ اسلاید تهیه و به طریقه همتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و با درشت نمایی  $400\times$  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 استفاده می شد (۲۴). بدین منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله سمی نیفروس در هر حیوان استفاده می شد و به هر لوله نمرات ۱ تا ۱۰ تعلق می گرفت. ضمن این که درصد لوله ها با بلوغ بالا (نمرات ۹ و ۱۰) نیز محاسبه می شد.

براساس معیارهای زیر به هر مقطع عرضی لوله سمی نیفروس، نمره داده می شد (۲۴، ۲۰):  
۱۰: اسپرمتوژنز کامل، تعداد زیادی سر اسپرم که در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند.

۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد ولی لومن گرد و منظم دیده نمی شود.

۸: تعداد اسپرم خیلی کم است.

۷: اسپرم دیده نمی شود ولی تعداد زیادی اسپرمتاید گرد دیده می شود.

۶: تعداد کمی اسپرمتاید گرد دیده می شود.

۵: هیچ اسپرم و اسپرمتاید گردی دیده نمی شود. تعداد زیادی اسپرمتوسیت اولیه دیده می شود.

۴: تعداد خیلی کمی اسپرمتوسیت اولیه دیده می شود.

۳: هیچ اسپرمتوسیت اولیه دیده نمی شود. فقط اسپرمتوگونی دیده می شود.

۲: هیچ سلول زایایی وجود ندارد. فقط سلول سرتولی دیده می شود.

۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می شود و لوله ها آتروفیک هستند.

درصد در مقابل  $40 \pm 50.71$  درصد)، تعداد  $(2/6 \pm 26/8)$  در مقابل  $(3/1 \pm 12/6)$  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

مورفولوژی مورفولوژی	تعداد	حرکت	مورفولوژی مورفولوژی
غیر نرمال سر غیر نرمال دم	( $\times 10^6$ )	(درصد)	غیر نرمال سر غیر نرمال دم
(درصد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)
۵/۵±۰/۶ <sup>b</sup>	۲۹/۷±۲/۴	۸۲/۶±۵/۶	کنترل
۱۴/۰±۱/۴ <sup>ab</sup>	۱۲/۶±۳/۱ <sup>ab</sup>	۷۱/۵±۴/۰ <sup>ab</sup>	آسپرین
۵/۱±۰/۸ <sup>b</sup>	۳۲/۲±۳/۰ <sup>b</sup>	۸۷/۴±۵/۳ <sup>b</sup>	ملاتونین
۷/۴±۱/۳ <sup>a</sup>	۲۶/۸±۲/۶	۸۰/۱±۳/۰	آسپرین و ملاتونین

a: در مقایسه با گروه کنترل  $P < 0.001$ ; b: در مقایسه با گروه ملاتونین + آسپرین  $P < 0.04$ .

ب) یافته های هیستولوژیک و کیفیت بلوغ اسپرماتوژن: مطالعه هیستولوژی مقاطع بافتی نشان داد که در مقاطع بیضه مربوط به گروه کنترل، اسپرماتوژن فعال در لوله های سمی نیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده میشود. 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.  $(2/4 \pm 4/01 \pm 6/8)$  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 لیدیک به همراه عروق و سایر سلول های همبندی مشهود بود (شکل ۱- A). کیفیت بلوغ لوله ها در حد بالا  $9/1 \pm 0/2$  و تقریباً تمام لوله ها  $(4/1 \pm 96/6)$  درصد) از بلوغ کامل اسپرماتوژن برخوردار بودند (جدول ۲).

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  $(3/6 \pm 52/3)$  در مقابل  $(4/2 \pm 68/01)$  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

ضخامت اپیتلیوم ژرمینال: جهت ارزیابی ضخامت اپیتلیوم ژرمینال لوله سمی نیفروس، از گریدهای مدرج خطی نصب شده بر لنز چشمی میکروسکوپ استفاده شد. در هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ لوله سمی نیفروس در مقطع عرضی گرد و یا تقریباً گرد انتخاب و مطالعه شدند. لوله هایی که بیضوی بودند یا برش مایل داشتند مطالعه نشدند. با بزرگنمایی  $40 \times$  اقطار لوله های سمی نیفروس 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 اسپرماتوژن و همچنین کلیه پارامترهای 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  $P \leq 0.05$  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  $50 \text{ mg/kg}$  استیل سلیسیلیک اسید به مدت دو هفته در موش بالغ، تمام پارامترهای اسپرم شامل تعداد، درصد اسپرم متحرک و درصد اسپرم های نرمال را در مقایسه با کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ( $P < 0.001$ ). مصرف  $10 \text{ mg/kg}$  ملاتونین به مدت ۵ روز اثر سوء بر روی اسپرم در مقایسه با کنترل نداشت. اگر چه که به نظر می رسید مصرف ملاتونین تعداد اسپرم ها را  $(3/0 \pm 32/2)$  میلیون بر میلی لیتر) در مقایسه با کنترل  $(3/4 \pm 29/7)$  میلیون بر میلی لیتر) افزایش داده است ولی این افزایش معنادار نبود ( $P < 0.07$ ). در گروه تحت درمان ترکیبی استیل سلیسیلیک اسید و ملاتونین در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معناداری در پارامترهای 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 ( $P < 0.001$ ). مصرف ملاتونین در گروه آخر، منجر به افزایش پارامترهای حرکت  $(3/0 \pm 80/1)$

نمی شد (شکل ۱-D). مصرف ملاتونین توأم با استیل سلسیلیک اسید در گروه آخر، باعث افزایش کیفیت (۱/۶±۰/۱ در مقابل ۰/۱±۰/۸) و درصد بلوغ اسپرماتوژنز (۴/۱±۸۸/۱ در مقابل ۳/۴±۷۹/۳) در مقایسه با گروه تحت درمان با استیل سلسیلیک 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

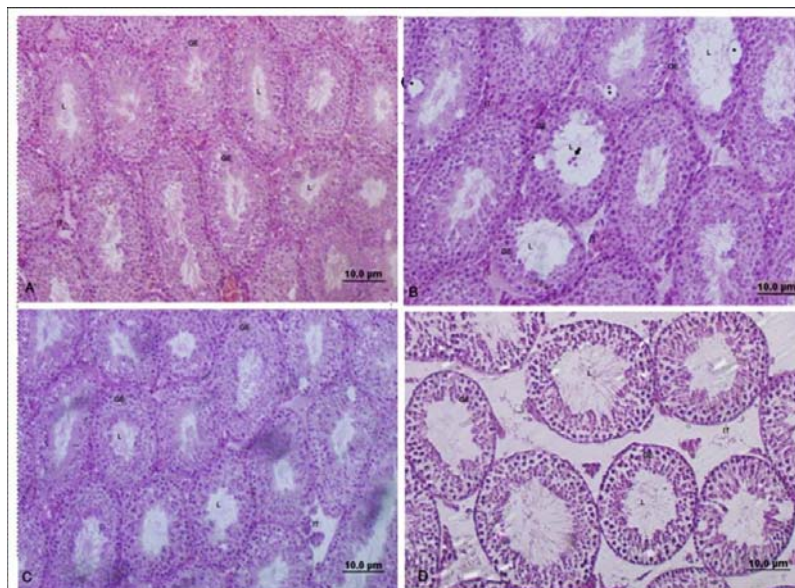
بلوغ لوله های سمینی فروس	درصد لوله های سمینی فروس بالغ	ضخامت اپیتلیوم ژرمینال (میکرون)	کنترل
۹/۱±۰/۲ <sup>b</sup>	۹۶/۶±۱/۴ <sup>b</sup>	۶۸/۰۱±۴/۲	کنترل
۷/۰۸±۰/۱ <sup>ab</sup>	۷۹/۳±۴/۳ <sup>ab</sup>	۵۲/۳±۳/۶ <sup>ab</sup>	آسپرین
۸/۹±۰/۶	۹۵/۸±۳/۹ <sup>b</sup>	۶۳/۰۱±۶/۶۳	ملاتونین
۸/۶±۰/۱ <sup>a</sup>	۸۸/۱±۱/۴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

a: در مقایسه با گروه کنترل  $P < 0.03$ ; b: در مقایسه با گروه ملاتونین + آسپرین  $P < 0.001$

به هیچ وجه دیده نشد (شکل ۱-B). در بافت بینابینی سلول های لیدیک تفاوت خاصی با کنترل مشاهده نشد (شکل B). مصرف ۵۰ mg/kg استیل سلسیلیک اسید به مدت ۲ هفته، بلوغ و درصد لوله های بالغ سمی نیفروس (۳/۴±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 (شکل ۱-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 سلسیلیک اسید و ملاتونین، لوله های سمی نیفروس مورفولوژی بهتری در مقایسه با گروه تحت درمان با استیل سلسیلیک 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



شکل ۱: فوتومیکروگراف نوری از لوله های سمینی فروس موش A کنترل، 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. در سمینی فروس موش تحت درمان با استیل سلسیلیک 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 نمایند. در گروه تحت درمان ترکیبی به بهبود وضعیت اسپرماتوژنز داخل لوله ها و مورفولوژی بهتر لوله ها و عدم حضور واکوئل و یا سلولهای ریزش یافته در لوله ها توجه نمایند. لومن (L)، اپی تلیوم ژرمینال (GE)، بافت بینابینی (IT)، رگ خونی (BV)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین، انوزین. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر.

**بحث:**

مطالعه حاضر اثرات استیل سلیسیلیک اسید و ملاتونین را بر روی پارامترهای اسپرم شامل تحرک، مورفولوژی و تعداد اسپرم و همچنین کیفیت بلوغ اسپرماتوژن بررسی نمود که مارکرهای مهمی برای کیفیت اسپرم هستند و این پارامترها می توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه بدهند. در این مطالعه تجویز  $50 \text{ mg/kg}$  استیل سلیسیلیک اسید طی مدت ۱۴ روز، باعث کاهش کلیه پارامترهای اسپرم (تعداد، حرکت، مورفولوژی نرمال) شد. به طور مشابهی دیدالکار در سال ۱۹۸۰ نشان داد که تجویز  $50 \text{ mg/kg}$  برای مدت ۱۴ روز و ۳۰ روز در رت ها باعث کاهش حرکت اسپرم می شود (۹). همچنین نشان داده شده است که مصرف استیل سلیسیلیک اسید به میزان  $15 \text{ mg/kg}$  برای ۱۰ هفته باعث کاهش حرکت اسپرم و تعداد اسپرم در رت ها 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 مهارکنندگی آنزیم سیکلواکسیژناز باشد که بر روی تحرک اسپرم نقش دارند (۴). در تأیید این یافته کندهی در سال ۲۰۰۳ نشان داد که افزایش مهارکننده های سیکلواکسیژناز به نمونه اسپرم بوقلمون، باعث کاهش حرکت اسپرم می شود (۵). ضمن این که میزان  $500 \text{ mg}$  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 اسپرماتوژن 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، واکنش بین سلول های زایا دیده می شود در واقع این واکنشها می توانند نشان دهنده از دست دادن اتصالات سلولی و یا کاهش مولکول های چسبنده مانند کادهرینها باشند و می توانند به عنوان یکی از علائم پره آپوتوز مطرح باشند (۲۰).

کاهش بلوغ و درصد رسیدگی لوله های بالغ در مطالعه حاضر شاید ناشی از مرگ سلول های زایا و یا آپوتوز آنها به دنبال مصرف استیل سلیسیلیک اسید باشد. هر چند که ما مطالعه ای در این زمینه انجام ندادیم. در تأیید این یافته، نشان داده شده که درمان با نمی سولاید منجر به تغییرات آپوتوتیک فراساختاری در اپیتلیوم دفران می شود (۳). ضمن این که بیشتر داروهای NSAID می توانند آپوتوز 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 اسپرماتوژن و پارامترهای 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  $10 \text{ mg/kg}$  ملاتونین برای مدت ۵ روز، به صورت توأم با استیل سلیسیلیک اسید، اثرات سوء استیل سلیسیلیک اسید را بر روی اسپرماتوژن و اسپرم کاهش می دهد. احتمالاً این تغییرات و روند حفظ اسپرماتوژن با بلوغ بهتر در گروه چهارم نسبت به گروه دوم می تواند ناشی از چند مکانیسم باشد:

الف- خاصیت آنتی اکسیدانی قوی ملاتونین، چرا که ملاتونین می تواند فعالیت و یا بروز ژن های آنزیم های آنتی اکسیدان مانند: سوپر اکسید دیس موتاز، گلووتاتیون

- 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, Ceribaşı 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, Khajehjehromi S. [Protective effect of melatonin on histologic

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

ج- خواص آنتی پرولیفراتیو ملاتونین، شاید ملاتونین با مهار روند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، روند تمایز آنها را به اسپرماتوسیت مهار می‌نماید و باعث می‌شود 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 می‌دهد (۲۰-۱۸). همچنین یک دوز بالا ۱۰۰ mg/kg ملاتونین در رت‌های در معرض اشعه X، آسیب‌های پوستی را کاهش می‌دهد (۱۶).  
 نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استیل سلیسیلیک اسید باعث کاهش درصد بلوغ لوله‌های سمی نیفروس شد (۷۹/۳ درصد). در حالی که مصرف ملاتونین توأم با استیل سلیسیلیک اسید میزان بلوغ و درصد بلوغ را در لوله‌های سمی نیفروس افزایش می‌دهد (۸۸ درصد).  
 در انتها، مطالعات فرا ساختاری سلول‌های 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 می‌گردد.

### نتیجه نهایی:

چنین به نظر می‌رسد 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 می‌باشد و این عمل از طریق کاهش دادن استرس‌های اکسیداتیو صورت می‌گیرد.

### 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

- changes of adult 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, Cichoż-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.