

تأثیر کلستاز انسدادی بر روی محور جنسی موشهای صحرایی نر بالغ

دکتر ابراهیم نصیری^{۱*}، دکتر سیدمحمدحسین نوری موگهی^۲، دکتر احمدرضا دهپور^۳، دکتر محمد بربرستانی^۴،

دکتر علی اکبر امیرزرگر^۵، دکتر محمد اکبری^۶، دکتر محسن پورقاسم^۷

۱- استادیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی همدان ۲- دانشیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۳- استاد گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۴- دانشیار گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۵- استادیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی بابل

سابقه و هدف: کلستاز انسدادی نوعی بیماری کبدی با تجمع اسیدهای صفراوی، افزایش تونوس اوپیوئیدهای درون ساز و نیتریک اکساید در پلازما می باشد. بعضی از این تغییرات بر روی فیزیولوژی سیستم هورمونهای محور جنسی تأثیر می گذارد. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط بین کلستاز انسدادی و تغییرات هورمونهای محور جنسی در موشهای صحرایی نر بالغ انجام شده است.

مواد و روشها: این مطالعه بر روی سه گروه هشت تایی از موش صحرایی انجام شد. گروهها بصورت شاهد (بدون جراحی)، گروه شاهد - جراحی یا شمش (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) تقسیم بندی شدند. سه هفته بعد از انجام جراحی غلظت سرم هورمون های FSH و LH توسط ایمونو رادیومتریک اسی (IRMA) و Inhibin B (مهارکننده B) با استفاده از کیت الیزا اندازه گیری شد. **یافته ها:** در این مطالعه کاهش معنی داری بین هورمون های FSH و LH در گروه کلستاتیک نسبت به گروه های شاهد و شاهد - جراحی مشاهده شد، در حالیکه سطح پلاسمای Inhibin B در گروه کلستاتیک نسبت به گروه دیگر افزایش قابل ملاحظه ای را نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه در کلستاز انسدادی علیرغم کاهش هورمونهای گنادوتروپین بنظر نمی رسد اختلالی در روند اسپرماتوژنز ایجاد شود، چون وجود Inhibin B نشانه سلامت سلولهای مجاری منی ساز است.

واژه های کلیدی: کلستاز انسدادی، FSH، LH، مهارکننده B.

مقدمه

هورمون های محور جنسی فرآیند استروئیدوژنز و اسپرماتوژنز را کنترل می کنند. هورمون لوتئینه (LH) از هیپوفیز قدامی ترشح شده و سلول های لیدیک بیضه را جهت تولید تستوسترون و ۱۷-بتا استرادیول تحریک می کند. تستوسترون نیز بصورت فیدبک منفی ترشح هورمون LH را کنترل می کند (۱). هورمون محرک - فولیکولی

(FSH)، فرآیند اسپرماتوژنز را در سلولهای زاینده و تولید هورمون Inhibin B (مهارکننده B) را در سلولهای سرتولی تحریک می کند (۲و۳). هورمون Inhibin B نیز بصورت فیدبک منفی بر ترشح FSH و در نهایت روی اسپرماتوژنز تأثیر می گذارد (۴). دو نوع Inhibin بیواکتیو به نام های Inhibin A و Inhibin B وجود دارد.

هر یک از آنها دارای یک زیر واحد آلفا (α) مشابه و یک زیر واحد بتا (βA , βB) غیر مشابه هستند که توسط پیوند دی سولفیدی به همدیگر متصل می‌شوند (۵). Inhibin A (αA) در پلاسمای جنس نر بخاطر مقدار کم ترشح آن ($< 2 \text{ Pg/ml}$) غیر قابل تشخیص است (۶) ولی ترشح Inhibin B ($\alpha \beta B$) قابل توجه بوده و نقش مهم فیزیولوژیکی در کنترل ترشح FSH در وضعیت طبیعی و پاتولوژیکی دارد (۷).

کلستازیس انسدادی یا یرقان انسدادی نوعی بیماری کبدی است که ممکن است داخل کبدی یا خارج کبدی باشد. این بیماری همراه با تجمع نمکهای صفراوی، بیلی روبین، چربی‌ها و افزایش تونوس اوپیوئیدهای اندوژن و تولید بیش از اندازه نیتریک اکساید های درون ساز است (۸-۱۰). نیتریک اکساید یک میانجی شیمیایی است که در سیستم های فیزیولوژیکی مختلف از جمله سیستم محور جنسی، نقش بسزایی دارد ولی وقتی مقدار تولید آن به مدت طولانی افزایش یابد بر سلولهای حساس تأثیر سیتوتوکسیک دارد (۱۱). دخالت نیتریک اکساید در فرآیند آپوپتوز و عملکرد سلولهای بیضه ثابت شده است (۱۲ و ۱۳). از آنجائیکه عملکرد سلولهای بیضه وابسته به هورمونهای گنادوتروپین هیپوفیزی است، مطالعه حاضر میزان تغییرات هورمونهای گنادوتروپین و Inhibin B را در پلاسمای رت‌های کلستاتیک بررسی می‌نماید.

مواد و روشها

کیت‌های ایمونو رادیومتریک اسی (IRMA) برای سنجش هورمونهای FSH و LH از شرکت DSL (ویستر، تگزاس، امریکا) خریداری شد. کیت آنزیم ایمونواسی Inhibin B از شرکت سروتک (آکسفورد، انگلستان) تهیه گردید. رت‌ها از جنس نر و از نژاد Sprague-Dawley با سن ۱۶-۱۲ هفته و با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج تهیه گردیدند. رت‌ها بصورت تصادفی به سه گروه هشت تایی به ترتیب گروه شاهد (بدون جراحی)، گروه شاهد - جراحی یا شم (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه آزمایش یا کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) تقسیم شدند. هر سه گروه در شرایط یکسان و استاندارد از نظر رطوبت و درجه حرارت (23 ± 1 سانتیگراد) و

نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی که روشنایی از ساعت ۱۶ - ۴ بوده است) و دسترسی به مواد غذایی در خانه حیوانات بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی تهران نگهداری شدند. انسداد مجرای صفراوی با لاپاراتومی در وضعیت بیهوشی عمومی با کتامین (داخل صفاقی 50 mg/kg) و پرومتازین (10 mg/kg) صورت گرفت (۸ و ۹). در گروه شاهد - جراحی، مجرای صفراوی با استفاده از پنس فقط مشاهده گردید. در گروه کلستاتیک، مجرای صفراوی با دو گر در فاصله چند میلیمتری بسته شد و حد فاصل بین دو گر با قیچی قطع و سپس جدار شکم در دو لایه فاسیا و پوست بخیه گردید. یک روز بعد از لاپاراتومی رت‌های کلستاتیک علائم کلستازیس (زردی، ادرار تیره و استاتوره) را بروز دادند. بعد از ۲۱ روز موش‌های صحرایی ابتدا با اثر بیهوش و سپس قطع نخاع گردیده و مقدار ۵ سی سی خون با استفاده از سرنگ استریل از قلب آنها استخراج شد. سپس سرم نمونه‌ها با سانتریفوژ در 1500 rpm بمدت ۱۰ دقیقه جدا گردید. سرم‌ها تا زمان آزمایش در 70°C - نگهداری گردید. مقادیر FSH و LH پلازما با استفاده از روش IRMA براساس دستورالعمل‌های شرکت تولیدکننده کیت و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اندازه گیری شد. مقدار Inhibin B پلازما با استفاده از روش ساندویچ ایمونواسی آنزیم (ELISA) و با استفاده از دو جفت منوکلونال آنتی بادی براساس دستورالعمل‌های شرکت تولید کننده اندازه گیری شد. سپس داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

میانگین غلظت هورمون FSH در رت‌های کلستاتیک ($13.2 \pm 1 \text{ ng/ml}$) نسبت به گروه‌های شاهد ($1.8/1 \pm 1/3 \text{ ng/ml}$) و شم ($16.9/1 \pm 1/1 \text{ ng/ml}$) بطور معنی دار کاهش یافت ($p = 0.0192$). میانگین غلظت هورمون LH در رت‌های کلستاتیک ($0.83 \pm 0.21 \text{ ng/ml}$) نسبت به گروه‌های شاهد ($2/1 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$) و شم ($1/8 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$) بطور معنی دار کاهش داشت ($p = 0.0029$). هورمون Inhibin B در رت‌های کلستاتیک ($3.8/1 \pm 2/7 \text{ pg/ml}$) نسبت به گروه‌های شاهد ($2.8/9 \pm 1/2 \text{ pg/ml}$) و شم ($2.7/5 \pm 1/6 \text{ pg/ml}$) بطور معنی دار افزایش یافت ($p = 0.0049$).

بحث

در این مطالعه مشخص شد که کلتاز انسدادی روی محور هیپوتالاموس - هیپوفیز و گناد اثر گذاشته و باعث کاهش ترشح گنادوتروپین های LH و FSH می شود. این یافته ها با نتایج تحقیقات speroff و همکاران که اعلام کرده اند کلتاز باعث افزایش تونوس اویوئیدهای اندوژن و نیتریک اکساید میشود (۱۴) مطابقت دارد و افزایش آنها باعث کاهش هورمونهای محور جنسی می گردد (۱۵ و ۱۶). تحقیقات cicero و همکاران نشان داده است که دادن اویوئیدهای اگزوژن مثل مرفین باعث کاهش سطح سرمی تستوسترون می گردد و موجب آتروفی پروستات و کیسه های منوی می گردد (۱۵) و تجویز داروهای آزاد کننده نیتریک اکساید مانند نیترو پروساید سدیم بصورت *in vitro* درصد اسپرمهای متحرک را کاهش میدهد (۱۷). اگزوژنهای آندروژنی و همچنین هیپوفیزکتومی باعث کاهش گنادوتروپین ها و افزایش هورمون Inhibin B می گردد (۱۸). از بین رفتن گیرنده های گنادوتروپین در بیضه باعث آتروفی و تغییر شکل لوله های منی ساز در موش میشود (۱۹) و ثابت می کند که گنادوتروپین ها در پشتیبانی و تغذیه سلولهای بیضه نقش بسزائی دارند. در بیماران مبتلا به واریکوسل مقدار Inhibin B پایین تر از سطح نرمال بوده ولی بعد از درمان مقدار آن افزایش

پیدا می کند که نشان دهنده بازگشت عملکرد بیضه است (۲۰). افزایش Inhibin B در جریان کلتازیس بیانگر دو مسئله مهم است اول اینکه از ارتباط فیدبک منفی Inhibin B روی FSH حدس زده میشود که کاهش سطح سرمی FSH باعث افزایش سطح سرمی Inhibin B شده، دوم اینکه Inhibin B در ارتباط مستقیم با عملکرد سلولهای بیضه میباشد و مهمترین نشانگر درون ریز برای سلولهای بیضه و اسپرماتوژنز محسوب میشود (۲۱). بنابراین کاهش گنادوتروپینها در جریان کلتازیس حاد نتوانسته است آسیب جدی به سلولهای بیضه وارد نماید و موجب کاهش شاخص اسپرماتوژنز (Inhibin B) گردد. بررسیهای آینده در مورد قدرت باروری و تغییرات احتمالی در زمینه آپوپتوز سلولهای بیضه در رتھای کلتاتیک، میتواند دانش ما را در مورد تظاهرات کلتاز کاملتر نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پرسنل مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بخصوص از آقای دکتر هدایتی و خانم دکتر آذری و خانم خسروی که در انجام سنجش هورمونی ما را یاری نمودند تقدیر و قدردانی می گردد.

References

1. Kolb BA, Stanczyk FZ, Sokol RZ. Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertility and Sterility* 2000; 74(2): 234-8.
2. McLachlan RI, Wreford NG, O Donnell L, De Kretser DM, Robertson DM. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 1996; 148: 1-9.
3. Pierik FH, Vreeburg JJM, Stijnen T, De Jongand FH. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(9): 3110-14.
4. Burger HG, Igarashi M. Inhibin: definition and nomenclature, including related substance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 885-6.
5. Wanzhu J, Herath CB, Midori Y, et al. Inhibin B regulation FSH secretion during testicular recrudescence in male Golden Hamster. *J of Andrology* 2003; 23(6): 845-53.
6. Anderson RA, Wallace EM, Groome NP, Bellis AJ, Wu FCW. Physiological relationships between inhibin B, FSH

- secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotropin suppression by exogenous testosterone. Hum Reprod 1997; 12(4): 746-51.
7. Bradley D, Richard AB, et al. Serum inhibin B levels reflect sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81(9): 3341-5.
 8. Nahavandi A, Dehpour AR, Mani A, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhosseini MR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. Eur J Pharmacol 2001; 411: 135-41.
 9. Dehpour AR, Seyyedi A, Rastegar H, et al. The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct ligated rats. Eur J Pharmacol 2002; 445:31-6.
 10. Narimani KH, Samini M, Ejtemaei MS, Gaskari SA, Rastegar H, Homayounfar H, Dehpour AR. Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rats: roles of opioid and nitric oxide systems. Eur J Pharmacol 2001;423:185-93.
 11. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Paul J. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decrease sperm motility and induces sperm toxicity. Hum Reprod 1995; 10(7): 1786-90.
 12. Shiraishi K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. Biol Reprod 2001; 65(2): 514-21.
 13. Kubota Y, Sasaki S, Kubota H, Tatsura H, Kohri K. A study on the mechanism of the spermatogenic damage after vasectomy in rats. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 2001; 92(1): 13-22.
 14. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Lippincott Williams and Wilkins 1999; pp: 172-8.
 15. Cicero TJ, Meyer ER, Wiest WG. Effects of chronic morphine administration on the reproductive system of male rat. J Pharmacol Exp Ther 1975; 192(3): 542-8.
 16. Cicero TJ, Bell RD, Meryer E. Narcotic and the hypothalamic pituitary gonadal axis: acute androgen dependent systems. J Pharmacol Exp Ther 1977; 201(1): 76-83.
 17. Tomlinson MJ, East SJ, Barratt CL. Preliminary communication: possible role of reactive nitrogen intermediate in leucocyte mediate sperm dysfunction. Am J Reprod Immonol 1992; 27(1-2): 89-92.
 18. Au CL, Robertson DM, De Krester DM. An in-vivo method for estimating inhibin production by adult rat testis. J Reprod Fert 1984; 71: 259-65.
 19. Korach KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptors. Science 1994; 266: 1524-7.
 20. Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, Crowley WF. Clinical review 96: differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 1835-41.
 21. Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T, Yong FHD, Weber RFA. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83(9): 3110-14.

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم تشریحی، تلفن: ۰۲۱-۶۹۵۳۱۴۷.