چکیده پایان نامه شماره 21-1 دکتری تخصصی دانشگاه ارومیه

سال تحصیلی: 1391-1390

نگارنده: فاطمه زبیری

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر سیپروفلوکساسین روی ساختار بافتی و هیستوشیمیایی بیضه، کیفیت اسپرم و توانایی باروری در موشهای سوری

امروزه ناباروری مشکل اساسی در 15-20%زوجهایی است که در سن تولید مثل قرار دارند. ناباروری جنس مذکر در نیمی‌از زوجهایی که به کلینیکهای ناباروری مراجعه می کنند دیده می شود. عوامل مختلفی درناباروری جنس مذکر تأثیرگذار است و از میان این عوامل فاکتورهای محیطی مانند داروها و مواد شیمیایی از مهمترین فاکتورها می باشند. سیپروفلوکساسین، متعلق به نسل دوم فلوروکینولونها است که به صورت معمول در درمان بسیاری از عفونتهای میکروبی مانند عفونتهای استخوان و مفاصل، عفونتهای دستگاه تنفسی و ادراری مورد استفاده قرار می گیرد. اساس فعالیت این دارو از طریق مهار توپوایزومراز DNAgyrase/ II باکتریها می باشد.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات سیپروفلوکساسین بر روی کارآیی سیستم تناسلی نر از طریق ارزیابی پتانسیل باروری، ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت بیضه، فعالیت کاسپاز-3 و کاسپاز-9 در بافت بیضه، غلظت سرمی تستوسترون، پارامترهای اسپرم، یکپارچگی DNA و کیفیت کروماتین اسپرم در موش سوری می باشد. همچنین تغییرات هیستوپاتولوژیکی و هیستوشیمیایی بافت بیضه در این تحقیق بررسی گشت. در نهایت نقش مسیر میتوکندریایی در آپوپتوز ایجاد شده توسط سیپروفلوکساسین در سلولهای اسپرم کشت داده شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این بررسی از 24 سر موش سوری نر نژاد NMRI استفاده گردید. سیپروفلوکساسین حل شده در کربوکسی متیل سلولز در دوزهای 412 mg/kg و 206 به مدت 45 روز از طریق گاواژ تجویز گردید و گروه کنترل به طور همزمان کربوکسی متیل سلولز را دریافت نمودند. در انتهای دوره درمانی حیوانات آسان کشی شدند و بیضه و دم اپیدیدیم از بافت احشایی جدا شد. یکی از بیضه ها جهت فیکس شدن برای تهیه مقاطع میکروسکوپی در داخل فرمالین بافری 10 درصد قرار داده شد و بیضه دیگر جهت انجام کارهای هیستوشیمی وآزمایشات بیوشیمیایی تا زمان انجام آزمایش در دمای 70- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اسپرم های آزاد شده از دم اپیدیدیم جهت ارزیابی کیفیت اسپرم، کیفیت کروماتین و آسیب DNA آنالیز شدند. همچنین میزان باروری آزمایشگاهی، جنین های دو سلولی، بلاستوسیست و جنین های متوقف شده مورد بررسی قرار گرفت. ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت بیضه بوسیله اندازه گیری توانایی آنتی اکسیدانتها در تبدیل Fe^{+3} به Fe^{+2} با استفاده از آزمایش کاهش قدرت احیاءکنندگی فریک یا FRAP ارزیابی شد. فعالیت آنزیم کاسپاز-3 و -9 در بافت بیضه با روش الایزای ساندویچی با استفاده از کیت اختصاصی کاسپاز-3 و -9 موش سوری اندازه گیری شد. پس از استخراج DNA از نمونه های بافتی بیضه، مرگ سلولی آپوپتوتیک از طریق آنالیز ژل الکتروفورز با عکس برداری توسط تابش اشعه X مورد بررسی قرار گرفت.

سیتوتوکسیسیتی سیپروفلوکساسین، پتانسیل غشاء میتوکندریایی و میزان کاسپاز-3 و -9 در سلولهای اسپرم کشت داده شده به ترتیب از طریق تست MTT و ارزیابی های مربوط به JC-1 aggregation ، کاسپاز-3 و -9 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که میزان فعالیت کاسپاز-3 و -9 در بافت بیضه گروههای درمان شده با دوز پایین و دوز بالای سیپروفلوکساسین در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین بررسی ژل محتوی باندها با عکس برداری توسط اشعه X نشان داد که در گروه درمان شده با سیپروفلوکساسین در الکتروفوروگرام ژل آگارز الگوی ویژه نردبانی تشکیل شده است. در این بررسی علیرغم اینکه ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت بیضه در دو دوز پایین و بالا به شکل ملایمی افزایش پیدا کرده ولی از لحاظ آماری افزایش مذکور معنی دار نیست.

همچنین نتایج نشان داد که سیپروفلوکساسین باعث کاهش معنی دار تعداد اسپرم های اپی دیدیمی و کاهش تحرک آنها می گردد. در حالی که تعداد اسپرم های مرده و غیر طبیعی و نیز اسپرم های بلوغ نیافته (اسپرم هایی با اختلال در پروتامینیشن) و اسپرم های با DNA آسیب دیده به صورت معنی داری افزایش یافت.

متعاقب تجویز سیپروفلوکساسین کاهش معنی داری در غلظت سرمی تستوسترون به همراه اختلال در اسپرماتوژنز و کاهش پتانسیل باروری مشاهده گردید.

در گروههای درمان شده با سیپروفلوکساسین، میزان کربوهیدرات داخل سیتوپلاسمی در رده اسپرماتوژنز کاهش پیدا کرد و همزمان ذخایر چربی و سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز بویژه در اپی تلیوم زایگر دژنره افزایش یافت.

سیپروفلوکساسین بر روی سلولهای اسپرم کشت داده شده سیتوتوکسیسیتی معنی داری در یک روند وابسته به دوز ایجاد کرد.EC50 در این تست 146/73 میکروگرم به ازای میلی لیتر تعیین گردید.کاهش پتانسیل غشاء میتوکندریایی در سلولهای اسپرم درمان شده با دوزهای مساوی و بالاتر از 50 میکروگرم به

ازای میلی لیتر پس از 36 ساعت در مقایسه با سلولهای گروه کنترل معنی دار بود. افزایش فعالیت کاسپاز-3 و -9 در سلولهای درمان شده با دوز مساوی و بالاتر از 50 میکروگرم به ازای میلی لیتر به ترتیب در مدت 36 و 24 ساعت در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود.

نتایج مطالعه حاضر بیانگر اثرات توکسیک سیپروفلوکساسین بر روی کارآیی تولید مثلی موش سوری نر می باشد. تغییرات مربوط به رادیکالهای آزاد (که به نوبه خود باعث استرس اکسیداتیو می شود) در مدت 45 روز چندان قابل توجه نبوده لذا ظرفیت آنتی اکسیدانتی سرم تغییر چندانی را نشان نمی دهد. بنابراین آسیب های وارده به بافت بیضه و سلولهای ژرمینال می تواند به آپوپتوز سلولهای ژرمینال (تأثیر مستقیم دارو) و یا تغییرات مربوط به کاهش دسترسی سلولها به منابع انرژی از قبیل گلوکز مربوط باشد. همچنین بررسی حاضر مبتنی بر شواهد جدیدی از توانایی سیپروفلوکساسین بر روی القاء آپوپتوز در سلولهای اسپرم در یک روند وابسته به دوز و زمان است که از طریق فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوز به واسطه میتوکندری انجام می گیرد. اثرات سیپروفلوکساسین در القاء آپوپتوز مرتبط با بیان ژنی در اسپرم نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

بـر طبـق گـزارش در دو دهـه گذشـته کـاهش چشـمگیری در کیفیـت اسـپرم مشـاهده شـده اسـت. (Carlsen et al., 1992). کاهش کیفیت اسپرم اغلب وابسته به فاکتورهـای محیطـی اسـت. مـواد شـیمیایی و داروهایی که بصـورت نادرسـت مصـرف مـی شـوند از جملـه ایـن عوامـل محیطـی محسـوب مـی گردنـد (Oliva et al., 2002). عوامل محیطی می توانند اثرات سوئی روی رشد سلولهای جنسی در مراحل مختلـف، از مرحله تکثیر اسپرماتوگونی تا بلوغ اسپرماتوزوآ داشته باشند. اثـرات سـمی احتمـالی شـامل مـرگ سـلول، آسیب سلول یا تغییرات ژنتیکی می باشند، مرگ سلولی از طریـق رونـد نکـروز و یـا آپوپتـوز (مـرگ برنامـه ریزی شده سلول) صورت می‌گیرد. شواهد اخیر بیان می کند که القای روند آپوپتوز مکانیسم اصـلی عملکـرد بعضی از مواد زیان بار بر روی بافت بیضه یا شرایط فیزیولوژیک نامساعد، مانند کـاهش سـطح گنـادوتروپین هاست. آسیب سلولهای جنسی ممکن است ترمیم شده و یا یک اثر دائمـی بـر روی عملکـرد اسـپرماتوزوآی بالغ از جمله نقص ژنتیکی داشته باشد. باروری معمولاً از طریـق یکـی از چهـار مکانیسـم پایـه ذیـل مختـل می شود: الف: اثرات مستقیم گنادوتوکسیک ها ب: تغییر محور هیپوتالاموسی- هیپـوفیزی-گنـادی ج: اثـرات مستقیم روی انزال و نعوظ د: اثرات مستقیم روی لیبیدو (Nudell et al., 2002).

گزارشـهای زیـادی در مـورد نقـص در مورفولـوژی اسـپرم و کـاهش غـلـظـت آن در اسـتـفـاده از کـوکـائـیـن (Bracken et al., 1990; Hurd et al., 1992) و یا شواهدی در مـورد اثـرات سـیگار بـر روی بـاروری از طریـق کـاهش تولیـد اسـپرم، تحـرک و مورفولـوژی آن وجـود دارد (Thonneau et al., 1991; Vine et al., 1994). اسـتفاده طـولانی مـدت الکـل روی محـور HPG[1] اثـر گذاشـته وکـاهش تعـداد اسـپرم، اسـپرم هـای نرمـال و تحـرک اسـپرم را بـه دنبـال دارد (Nudell et al., 2002; Pasqualotto et al., 2004). بلوکرهای کانال کلسیم باعث ایجاد نقص عملکردی در اسپرم شده و توانایی آن را برای بارور کردن تخم، بدون اثر بر روی تولیـد اسـپرم یـا پارامترهـای آن، کـاهش می‌دهند (Benoff et al., 1994; Hershlag et al., 1995). دیورتیکها با کـاهش جریـان خـون آلـت تناسـلی مـی تواننـد در عملکـرد آن مـؤثر باشـند و بتـا بلوکرهـا، لیبیـدو را تحـت تـأثیر قـرار مـی‌دهنـد (Nudell et al., 2002). هورمونها از موارد دیگری هستند که بر روی باروری اثر دارند. مثلاً آنتـی آنـدروژنها و استروژنها می توانند از طریق تغییر محور HPG یاکاهش لیبیدو یا نعوظ اثر منفی روی باروری داشته باشند و پروژسترونها با کاهش لیبیدو یا نعوظ عمل می کنند (Nudell et al., 2002).

عوامل روان درمانی از موارد دیگری است که باروری جنس نر را تحت تأثیر قرار می دهد در واقـع یکـی از مهم ترین اثرات جانبی داروهای ضد افسـردگی افـزایش پـرولاکتین سـرم اسـت کـه منجـر بـه سـرکوب

[1]Hypothalamic- pituitary-gonadal axis

اسپرماتوژنز می گردد(Nudell et al., 2002; Pasqualotto et al., 2004). گزارشاتی در مورد اثرات آنتی آندروژنیک سایمیتیدین وجود دارد که باعث ژینکو ماستی و کاهش تعداد اسپرم می‌گردد (Nudell et al., 2002).کولشیسین نیز باعث ایجاد الیگو اسپرمی در استفاده طولانی مدت از آن می گردد (Sarica et al., 1995; Hairnov-Kochman et al., 1998).

آنتی بیوتیک ها جزو عوامل محیطی و استرسی بوده که اثرات آنها بر روی باروری کمتر مورد توجه قرار گرفته است، این در حالی است که گزارشاتی درباره اثرات سوء بعضی از آنها برروی باروری جنس نر در مطالعات حیوانی وجود دارد (Schlegel et al., 1991). اغلب نشانه ها شامل توقف روند اسپرماتوژنیک و کاهش تحرک اسپرم وتغییر در مورفولوژی آن می باشد. مشاهداتی وجود دارد که نشان داده دوز بالای نیتروفورانتها باعث ایجاد توقف بلوغ در مرحله اسپرماتوسیت اولیه گشته است (Nudell et al., 2002).

سولفاسالازین ها که دردرمان کولیت اولسراتیو استفاده می شوند، داروهای شناخته شده در ایجاد نقص در غلظت و تحرک اسپرم می باشند (Birnie et al., 1981; Toovey et al., 1981). در کل، آنتی بیوتیکهایی که به عنوان عوامل تأثیر گذار برروی باروری نر شناخته شده اند، شامل آمینوگلیکوزیدها، مینوسایکلینها، ماکرولیدها و سولفاسالازینها می‌باشند. فلوروکینولونها جزو دسته‌ای دیگر از عوامل ضد میکروبی می‌باشند که به صورت وسیع در پزشکی و دامپزشکی مورد استفاده قرار می گیرند. فلوروکینولونها به طور معمول توسط اورولوژیست ها، آندرولوژیست‌ها و متخصصین باروری برای درمان عفونتهای باکتریایی که قبل از IVF[1] اتفاق می افتد یا زمانی که غلظت بالای گلبولهای سفید خون در مایع منی این بیماران دیده می شود تجویز می گردند. این داروها جزو داروهای وسیع الطیف بر علیه پاتوژن های میکروبی و جزو مؤثرترین داروها برای درمان عفونتهای ادراری-تناسلی هستند (Herbold et al., 2001).

اغلب فلوروکینولونها به صورت نامناسب تجویزمی‌گردند. درکانادا معیارهای کلینیکی برای تجویز فلوروکینولونها فقط برای درمان سرپایی پنومونیها در بعضی از بیماران با شرایط خاص، مثلاً با تاریخچه ای از COPD[2] می‌باشد (Carrie et al., 2006). این داروها در درمان بعضی موارد برونشیت مؤثرهستند. با این حال حدود 10-5% موارد برونشیت، باکتریایی است و بیشتر موارد بوسیله عفونتهای ویروسی ایجاد می شوند و پس از چند هفته خود به خود بر طرف می‌گردند. فلوروکینولون‌ها به عنوان اولین انتخاب در درمان سینوزیت‌های حاد در شرایطی که ریسک استفاده از آن از فواید آن نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها بیشتر است ویا روند بیماری خود محدود شونده[3] است، پیشنهاد نمی‌گردند

[1] In-vitro fertilization
[2] Chronic obstructive pulmonary disease
[3] Self limiting

(Karageorgopoulos et al., 2008; Le Saux, 2008). در کل استفاده از فلوروکینولونها در مواردی توصیه شده که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر با شکست مواجه شده ودر مواردی مانند پیلونفریت یا پروستاتیت باکتریایی به عنوان داروی انتخابی می‌باشند (Liu et al., 2005).

تحقیقات نشان می‌دهد استفاده از فلوروکینولون‌ها درایالات متحده بین سالهای 1995 و 2002 سه برابر افزایش یافته است در حالی که جایگزین های بی خطرتر مانند ماکرولیدها به صورت معنی داری کاهش یافته است (Linder et al., 2005; MacDougall et al., 2005). فلوروکینولون‌ها رایج ترین گروه آنتی‌بیوتیکی تجویز شده در سال 2002 بوده است. نزدیک به نصف تجویز این داروها بر اساس شرایط خاص بوده و بوسیله FDA مورد تأئید نبوده است (Linder et al., 2005). در یک تحقیق نشان داده شده است که از 100بیمار مورد بررسی، 81 نفر فلوروکینولون را به دلیل تجویز اشتباه دریافت کرده اند که از این تعداد در 53% موارد آنتی‌بیوتیک دیگری می توانسته به عنوان اولین انتخاب باشد. در 33%موارد نشانه ای از عفونت باکتریایی برای شروع آنتی بیوتیک تراپی نبوده ودر 14% نیاز به درمان مشکوک بوده است. از 19 بیماری که فلوروکینولون را بر اساس تجویز درست دریافت کرده بودند فقط در یک نفر دوز و مدت درمان درست تجویز شده بود (Lautenbach et al., 2003).

با توجه به این موارد و گسترش استفاده از این داروها، آگاهی در مورد اثرات زیان بار آنها لازم به نظر می رسد.

اگر چه گزارشهای زیادی درباره اثرات توکسیک فلوروکینولونها برروی ارگانها و سیستم های مختلف وجود دارد، ولی داده های کمی دررابطه با اثرات سوء آنها بر روی سیستم تولید مثلی در دسترس است. نا هنجاری های کبدی وکلیوی در درمان با سیپروفلوکساسین گزارش شده است (Wolfson et al., 1991). استرس اکسیداتیو و آسیب میتوکندریایی می تواند در توکسیسیتی فلوروکینولونها سهیم باشد (Hsiao et al., 2010). اثرات درماتولوژیک در استفاده از فلوروکینولونها به میزان 0/5 تا 3 % اتفاق می افتد. به نظر می رسد مکانیسم فتو توکسیسیتی فلوروکینولونها مربوط به توانایی آنها در ایجاد رادیکالهای آزاد اکسیژن باشد (Ball et al., 1995)، که تصور می شود این گونه های فعال، غشای لیپیدی سلولی را مورد حمله قرار می دهند (Mayne et al., 1997).

آرتروپاتی ناشی از فلوروکینولونها در 1% بیماران اتفاق می‌افتد (Hayem et al., 1995; Ribard et al., 1991). اختلال در اسپرماتوژنز و یا آسیب بیضه (آتروفی در رت و سگ)در بررسی های توکسیسیتی طولانی مدت با بعضی فلوروکینولونها گزارش شده است که احتمال دارد مکانیسم های نوروآندوکرین در این اثرات دخیل باشند (Christ et al., 1988).

اخیراً نشان داده اند کـه سیپروفلوکساسـین مـی توانـد باعـث مهـار رشـد و آپوپتـوز کارسـینومای مثانـه، استئوسارکوما و لوکمیا در یک روند وابسته به دوز و زمان شود. بنـابراین اگرچـه تصـور بـر ایـن اسـت کـه فلوروکینولونها فقط توپوایزومراز II باکتریهـا را مهـار مـی کننـد، نتـایج مطالعـات Herold وهمکـاران نشـان مـی دهـد کـه ایـن داروهـا مـی تواننـد در رشـد سـلولهای خـاص یوکـاریوتی نیـز اثـر داشـته باشـند (Herold et al., 2002). فرضیه ممکن این است که اثرات آنها احتمالاً از طریق مهار سنتز DNA میتوکنـدری وآسیب متعاقب میتوکندری باشد (Lawrence et al., 1993). بنابراین مهارکننـده هـای توپـوایزومراز ممکـن است در نهایت منجر به تهی شدن ذخایر ATP داخل سلولی گشته و کـاهش انـرژی از طریـق القـاء توقـف سیکل سلولی منجر به آپوپتوز می‌گردد.

با توجه به این یافته ها تحقیق حاضر بر اساس فرضیه های زیر انجام گرفت:

- سیپروفلوکساسین سبب اختلال ساختار و عملکرد جنسی موش سوری با ایجاد آپوپتوز در سـلولهای اسپرم به طریق فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوز به واسطه میتوکندری می گردد.
- اختلال به دلیل استرس اکسیداتیو ایجاد شده در بافت بیضه در اسپرم ایجاد می شود.
- سیپروفلوکساسین از طریق تغییرمیزان تستوسترون سرم اثرات خود را ایجاد می کند.

هدف از این مطالعه، بررسی های عمیق‌تر و کامل تری در ارتباط بـا اخـتلالات عملکـرد جنسـی ناشـی از مصرف نادرست سیپروفلوکساسین با تمرکز به بافت شناسی، هیستوشـیمی، IVF و عملکـرد میتوکنـدری بـه منظور جست وجوی تغییرات میکروسکوپیک ایجاد شده در بافت بیضـه، قـدرت بـاروری و نحـوه اثـر دارو می باشد.

2-1- دستگاه تناسلی نر

دستگاه تولید مثل جنس نر شامل یک جفت گناد یا غدد جنسی بنام بیضه، مجاری تناسلی، غـدد ضـمیمه و آلت تناسلی می باشد. بیضه ها را می توان جزو غدد مختلط مورد بررسـی قـرار داد، زیـرا از طرفـی دارای عملکرد اگزوکرین یعنی تولید اسپرماتوزوئید بوده و از طـرف دیگـر هورمونهـای تستوسـترون یـا هورمـون جنسی نر، استروژن و اینهیبین[1] را سنتز و ترشح می نمایند. بیضه ها در کیسه ای بنام اسکروتوم جـای دارنـد که برای عمل اسپرماتوژنز و تولید اسپرم، محیط مناسبی برای بیضه ها ایجاد می کند. مجاری تناسـلی و غـدد ضمیمه، ترشحاتی دارند که به کمک انقباض عضلات صاف، خروج اسپرماتوزوئیدها را تسهیل می کنند. ایـن ترشحات، مواد غذایی مورد نیاز اسپرم ها را تـا هنگـامی کـه در دسـتگاه تولیـد مثـل نـر قـرار دارنـد تـأمین می کنند. ساختمانهای ضمیمه شامل اپی دیدیم و کانال دفران می باشند و غدد ضـمیمه تناسـلی شـامل غـدد وزیکولی، پروستات و غـدد پیـازی پیشـابراهی یـا غـده کـوپر، مجـرای ادراری و آلـت تناسـلی مـی باشـند. اسپرماتوزوئیدها همراه با ترشحات مجاری تناسلی و غدد ضمیمه، منی را ایجادمی کنند(Junqurea, 2010).

2-2- گنادها یا غدد جنسی

2-2-1- تونیکا واژینالیس(غشاء مهبلی)

تونیکا واژینالیس شامل مزوتلیوم و بافت هم بندی است که با بافت هـم بنـد اسـکروتوم و بیضـه در هـم می آمیزد. زمانی که بیضه از داخل اسکروتوم برداشته شود لایه جداری تونیکا واژینـالیس چسـبیده بـه سـطح داخلی اسکروتوم باقی می ماند، در حالی که لایه احشایی یا پوشـش صـفاقی بیضـه (و اپیدیـدیم) متصـل بـه کپسول بیضه یا سپید پرده باقی می ماند. حفره واژینال لایه های جداری و احشـایی را از هـم جـدا مـی کنـد (Eurell & Frappier, 2006).

2-2-2- تونیکا آلبوژینا

سپید پرده کپسولی از جنس بافت همبند متراکم نا منظم است که شامل رشته های کلاژن، کمی رشته هـای الاستیک و میوفیبروبلاست می باشد. انشعابات شریان بیضه ای و شبکه ای از سیاهرگهای آناسـتوموزی، لایـه احشایی سپید پرده را تشکیل می دهد(Eurell & Frappier, 2006).

2-2-3- تیغه های بیضه ای و مدیاستن بیضه

از سپیدپرده، تیغه های همبندی بنام ترابکول یا تیغه های بیضه ای به داخل بیضه نفـوذ نمـوده و بـه تـوده همبندی بنام میان پرده یا مدیاستن بیضه منتهی می شوند و بیضه را به حجراتـی بنـام لوبـول بیضـوی تقسـیم

[1] Inhibin

می نمایند که تعداد حجرات مذکور در انسان به 250 عدد می رسد. در داخل هر لوبول تعداد 4-1 عدد لوله منی ساز در یک محیطی از بافت هم بند سست قرار دارند(Eurell & Frappier, 2006).

4-2-2- سلولهای آندوکرینی بینابینی

فضاهای ما بین لوله های منی ساز حاوی بافت هم بند سست، رگهای خونی و لنفی، فیبروسیت، سلولهای مونونوکلئار و سلولهای آندوکرینی بینابینی یا لیدیگ می باشد. سلول لیدیگ، یک سلول چند شکلی بزرگ با هسته گرد و سیتوپلاسم اسیدوفیلی غنی از قطرات چربی است. این سلول ها به صورت طنابها و توده هایی قرار دارند و ضرورتاً همه آنها در تماس نزدیک با مویرگ نیستند. توری آندوپلاسمیک صاف ارگانل غالب در سلولهای آندوکرینی است. غشاهای توری آندوپلاسمیک صاف اکثر آنزیمهای ضروری برای بیوسنتز استروئید را تشکیل می دهند. میتوکندری‌های این سلولها دارای کریستاهای لوله ای هستند و در مرحله اول تولید هورمون استروئیدی نقش دارند (مانند تبدیل کلسترول به پرگننولون). کمپلکس گلژی نسبتاً کوچک این سلولها در ترشح آندروژن نقشی ندارند. ترشح آندروژن از سلولهای لیدیگ از نظر مورفولوژیکی نامشهود است. گلبولهای چربی در همه گونه ها وجود دارد. بین سلولهای مجاور، کانالیکولهای بین سلولی و اتصالیهای روزنه دار وجود دارد. دو نسل از سلولهای لیدیگ یعنی جنینی و بالغ از پیش سازهای شبیه مزانشیم بوجود می آیند. سلولهای لیدیگ عامل سنتز آندروژنهای بیضه (تستوسترون) هستند. بیشتر از 90 % کل آندروژنها به وسیله بیضه تولید می شود. تستوسترون در بعضی بافتها برای اعمال اثر باید توسط آنزیم 5 آلفا –ردوکتاز به ماده دیگری بنام دی هیدروتستوسترون تبدیل شود. عملکردهای اصلی تستوسترون شامل تحریک رفتارجنسی نرمال (لیبیدو)، تحریک رشد و عملکردآلت تناسلی، غددضمیمه جنسی وکنترل صفات ثانویه جنسی، کنترل اسپرماتوژنز (همراه با FSH[1])، عمل فیدبک منفی روی هیپوفیز و هیپوتالاموس، اثرات آنابولیکی عمومی ودر نهایت حفظ مجرای مزونفریک[2] قبل از تولد و سپس تمایز آن به اپی دیدیم و کانال دفران می باشد(Eurell & Frappier, 2006).

5-2-2- لوله های منی ساز

لوله های منی ساز، لوله های پیچ در پیچی هستند که دو انتهای آنها بوسیله یک قطعه انتهایی به لوله های بیضه ای راست منتهی می گردند و دارای قطری بین 150 تا 300 میکرومتر می باشند. این لوله ها دارای اپی تلیوم اسپرماتوژنیک مطبق هستند و از نظر هیستولوژیکی دارای 3 بخش پارین، سلولهای پشتیبان یا سرتولی و سلولهای اسپرماتوژنیک می باشند(Eurell & Frappier, 2006).

[1] Follicle Stimulating Hormone
[2] wolffian

6-2-2- پارین[1]

لوله های منی ساز را پارین در بر می گیرد. داخلی ترین لایه پارین غشاء پایه است که دارای برجستگی هایی است که به داخل چین خوردگی های قاعده ای سلولهای سرتولی و اسپرماتوگونی ادامه می یابد. فیبرهای کلاژن و الاستیک، غشاء پایه را به سلول های پیرامون لوله ای که طبقه ای متشکل از 1 تا 5 لایه را بر حسب گونه تشکیل می دهند، وصل می کنند. هنگام تولد، این سلولها شبیه سلولهای مزانشیمی هستند که پس از تولد بتدریج به سلولهای انقباضی تبدیل می شوند. سلولهای پیرامون لوله ای محتوی فیلامنتهای اکتین می باشند که در دو جهت حلقوی و طولی مرتب شده اند و مسئول انقباضات لوله ای هستند. بنابراین سلولهای میوئید در انتقال محتویات لوله ای و همچنین اسپرمیشن[2] که روند آزاد شدن اسپرماتوزوآ به داخل حفره لوله های منی ساز است، نقش دارند. خارجی ترین لایه پارین شامل فیبریل های کلاژن و فیبروسیت است. لنفوسیت و مونوسیت، پارین را مورد هجوم قرار می دهند ولی هرگز نمی توانند به اپی تلیوم لوله ای سالم نفوذ نمایند (Eurell & Frappier, 2006).

سلولهای پیرامون لوله ای ترکیباتی سنتز می کنند که سلولهای سرتولی را برای افزایش تولید پروتئین باند شونده به آندروژن و ترانسفرین تحریک می کنند. این ترکیبات مولکولهای مقاوم به اسید و حساس به گرما و تریپسین هستند و تحت عنوان P Mod – S نامیده می شوند که میزان آنها در حضور تستوسترون افزایش می یابد. در واقع آندروژنها بر روی سلولهای پیرامون لوله ای برای افزایش تولید P Mod – S اثر کرده و این ترکیبات به عنوان واسطه عملکرد تستوسترون روی سلولهای سرتولی می باشند (Skinner & Fritz, 1985).

7-2-2- سلولهای پشتیبان (سرتولی)

سلولهای پشتیبان از سلولهای تمایز نیافته گناد پیش بلوغی منشأ می گیرند. سلولهای تمایز نیافته از لحاظ تقسیم میتوزی فعال هستند و شامل مقادیر زیادی توری آندوپلاسمیک دانه دار می باشند و هورمون آنتی پارامزونفریک ترشح می کنند که این هورمون مانع رشد لوله های رحمی، رحم و واژن در جنس نر می شود. در طی بلوغ، تمایز سلولهای پشتیبان همراه با تغییرات مورفولوژیکی و از دست دادن توانایی تقسیم میتوزی می باشد. سلولهای پشتیبان بالغ، سلولهای هرمی شکل و کشیده ای هستند که قاعده وسیع آنها روی غشاء پایه قرار دارد و سیتوپلاسم آنها تا حفره میانی لوله های منی ساز کشیده شده است واغلب دارای قطرات لیپیدی و لیپوفوشینی در ناحیه قاعده سیتوپلاسم هستند. در مقطع عرضی یک لوله منی ساز

[1] Lamina propria
[2] Spermiation

بالغ تقریبا 20 سلول پشتیبان مشاهده می شود. زوائد سیتوپلاسمی رأسی و جانبی سلولهای پشتیبان همه فضای بین سلول های اسپرماتوژنیک مجاور را پر می کنند. هسته بیضی یا گلابی شکل این سلولها که دارای دندانه هایی در غشاء خود می باشد، در قسمت قاعده سلول قرار گرفته و یک هستک برجسته دارد. قسمت قاعده و ناحیه تنه مرکزی سلول پشتیبان حاوی میتوکندری، کمپلکس گلژی، توری آندوپلاسمیک صاف فراوان، مقدار کمی توری آندوپلاسمیک دانه دار، ریبوزوم های آزاد، میکروتوبولها، فیلامنتهای اکتین و ویمنتین، لیزوزوم ها و قطرات چربی می باشد. ارگانل های کمی در زوائد رأسی و جانبی سرتولی ها دیده می شود (Eurell & Frappier, 2006).

غشاء پلاسمایی سلولهای سرتولی به صورت پوششی در تماس نزدیک با سر اسپرماتید در حال رشد باقی می ماند که در آنجا ناحیه اختصاصی اکتوپلاسمی شکل می گیرد. این قسمت یک ساختار فعل و انفعالی ویژه ای است که بین اسپرماتیدها و سلولهای سرتولی ایجاد می شود و بیشتر در قسمت مجاور لوله ای لوله های منی ساز قرار می گیرد. این ساختار که قسمت مجاور لوله ای را تثبیت می کند و به آن ناحیه اختصاصی اکتوپلاسمی رأسی اطلاق می شود در تقابل با ناحیه اختصاصی اکتوپلاسمی پایه ای است که مابین سلولهای سرتولی مجاور تشکیل می شود. از نظر ساختاری، ناحیه اختصاصی اکتوپلاسمی رأسی از اندامک های سیتوپلاسمی منحصر به فرد مربوط به سلولهای سرتولی (مجموعه ای از شبکه آندوپلاسمی صاف و دسته های متراکم اکتین به فرم شش ضلعی) تشکیل شده است. نواحی اختصاصی اکتوپلاسمی اندکی قبل از اسپرمیشن، سطح آکروزوم اسپرماتیدهای در حال تشکیل را می پوشانند (Toshimori, 2009).

اتصالی های محکم بین سلولهای سرتولی، بخش قاعده ای را از بخش رأسی جدا می کنند و سدی تحت عنوان سد خونی- بیضه ای ایجاد می کنند. تجدید سلولهای بنیادی اسپرماتوژنیک و تکثیر اسپرماتوگونی ها در بخش قاعده ای صورت می گیرد. سد خونی– بیضه ای به صورت انتخابی مانع ورود بسیاری ازمواد به بخش رأسی می گردد که دراین بخش روند حیاتی میوز و اسپرمیوژنز در یک ریز محیط کنترل شده اتفاق می افتد. عمل دیگر سد خونی – بیضه ای جلوگیری از واکنش های خودایمنی ازطریق جداسازی تیپ های سلولی رشدیافته تر می باشد. اسپرماتوسیتهای اولیه بایدازاتصالی‌های محکم سلول های سرتولی عبور کنند و از بخش قاعده ای به بخش رأسی وارد شوند. یک منفذ زیپ مانند در این اتصالی باز شده و قبل از اینکه اسپرماتوسیت به بخش رأسی برسد دوباره در زیر آن بسته می شود (Johnson et al., 2008).

سلولهای سرتولی نقش تغذیه‌ای، حفاظتی و حمایتی سلولهای اسپرماتوژنیک را بر عهده دارند. به علاوه سلولهای اسپرماتوژنیک دژنره و اجسام باقیمانده را فاگوسیت می کنند. این سلولها اسپرماتوزوآ را به داخل

حفره لوله های منی سازآزاد می کنند (اسپرمیشن) و عملکرد FSH و تستوسترون را روی سلولهای جنسی وساطت کرده و در همزمانی وقایع اسپرماتوژنیک شرکت می کنند. سلولهای سرتولی، پروتئین هایی تولید می کنند که تنظیم و پاسخ به ترشح هورمونهای هیپوفیزی را بر عهده دارند که فعالیت میتوزی اسپرماتوگونی را تحت تأثیر قرار می دهند. همچنین این سلولها تولید کننده پروتئین متصل به آندروژن، ترانسفرین و اینهیبین نیز می باشند و سیگنالهای پاراکرین آنها فعالیت سلولهای آندوکرینی بینابینی مجاور را وساطت می کند (Johnson et al., 2008).

معلوم شده است که در موش سوری و رت، سلولهای سرتولی در حالت نرمال لیگاند Fas را بیان می کنند. باند شدن لیگاند Fas به Fas، سلول را به روش آپوپتوز از بین می برد. بنابراین سلولهای جنسی که دارای گیرنده های مرگ Fas هستند از طریق سیگنال سرتولی از بین می روند و جمعیت آنها محدود به تعدادی می شود که سرتولی توانایی حمایت از آنها را داشته باشد (Rodriguez et al., 1997).

به دنبال هر گونه آسیبی، بیان لیگاند Fas توسط سلولهای سرتولی افزایش می یابد تا بین کاهش توان حمایتی سلول های سرتولی که دچار اختلال عمل شده اند و تعداد سلول های جنسی تعادل ایجاد شود. بنابراین تحریک Fas در سلولهای جنسی به عنوان یک روند حذف خود به خودی سلول هایی است که به دلیل حمایت ناکافی به سوی مرگ می روند(Sakkas et al., 1999).

8-2-2- اسپرماتوژنز

اسپرماتوژنز فرآیندی تمایزی با برنامه ریزی دقیق شامل تنظیم تکوینی بیان ژن ها در مرحله خاص و متغیرهای ترجمه ژن می باشد. اسپرماتوژنز که با شروع بلوغ جنسی آغاز می شود شامل یک سلسله مراحل تمایزی است که طی آن اسپرماتوگونی ها متحمل تقسیمات و تغییراتی گشته و سرانجام به اسپرماتوزوئید تبدیل می گردند. این فرآیند خود شامل سه مرحله اسپرماتوسیتوژنز، تقسیم میوزی و اسپرمیوژنز می باشد. در مرحله اسپرماتوسیتوژنز سلولهای اجدادی جنسی در مرحله اسپرماتوگونی تکثیر می یابند و متحمل خود تجدیدی به صورت اسپرماتوگونی نوع A می شوند. اسپرماتوگونی نوع A به اسپرماتوگونی I و B ودر نهایت به اسپرماتوسیتهای اولیه پری لپتوتن تمایز می یابد که متعاقباً وارد تقسیم میوز می شوند. قبل از اولین تقسیم میوزی، DNA مربوط به کروموزومهای اسپرماتوسیت های اولیه دو برابر می شود. ویژگی بارز میوز اول، نوترکیبی ژنتیکی است. در این مرحله یک کمپلکس سیناپتونمال حاوی توده های نوترکیب در اسپرماتوسیت های مرحله پاکی تن تشکیل می شود. بلافاصله بعد از میوز (حدود 8 ساعت در مورد انسان) اسپرماتوسیتهای ثانویه، اسپرماتیدهای هاپلوئید را تولید می کنند. همه این سلولها بوسیله پل های سیتوپلاسمی به هم مرتبط هستند. این پل ها صدها سلول زایا را که از یک سلول اجدادی واحد مشتق

می شوند، تا مدت کوتاهی قبل از اسپرمیشن به هم متصل می کنند و یک سنسیتیوم وسیع را ایجاد مـی کننـد. ضخامت پل های متصل کننده اسپرماتوگونی ها در موش سوری و موش صحرائی تقریبـا 1 میلـی میکرومتـر گزارش شـده اسـت و ایـن ضـخامت تـا حـدود 1/5 میلـی میکرومتـر در مـورد اسپرماتوسـیت هـا و 3-2 میلی میکرومتر در اسپرماتید ها افزایش می یابد (Toshimori, 2009).

به بیان ژنی اسپرماتیدها، بیـان ژنـی پـس میـوزی مـی گوینـد. ایـن مرحلـه توسـط چهـار رویـداد اصـلی اسپرماتوژنز دنبال می شود که شامل تغییرات هسته، تشکیل آکروزوم، حـذف سیتوپلاسـم اضـافی و تشـکیل تاژک می باشد. سه رویداد اول در تشکیل سر دخیل هستند. تشکیل سر اسپرم با شروع پیدایش آکـروزوم در طی اسپرمیوژنز تحریک می شود. به طور کلی اسپرمیوژنز چهار مرحله را در بردارد:

1- مرحله گلژی: دانه های کوچکی موسوم به دانه های پیش آکروزومـی در داخـل وزیکـول هـای دسـتگاه گلژی ظاهر می شود. این دانه ها به هم پیوسته و تبدیل به یک دانه بزرگ واحد به نام آکـروزوم مـی گردنـد که درون یک وزیکول آکروزومی قرار دارد. وزیکول حاوی آکروزوم بـه طـرف هسـته مهـاجرت مـی کنـد. همزمان با آن سانتریول ها به محیط سلول در قطب مخالف آکروزوم مهاجرت می کنند. از یکـی از سـانتریول ها که عمود بر سطح سلول است تاژکی منشأ می گیرد و دم اسپرماتوزوئید را تشکیل مـی دهـد و سـانتریول دوم یقه ای را در اطراف قطعه اولیه دم تشکیل می دهد(Eurell & Frappier, 2006).

2- مرحله تشکیل کلاهک: وزیکول آکروزومال روی غشاء هسته رشد کرده و سـرانجام حـدود $\frac{2}{3}$ قسـمت قدامی هسته را می پوشاند وکلاهکی بنام کلاهک رأسی را برروی هسـته تشـکیل مـی دهـد. آکـروزوم بـین دولایه کلاهک قراردارد وحاوی آنزیمهـای هیـدرولیتیک ازقبیـل هیالورونیـداز، اسیدفسـفاتازو پروتئـازی بـا فعالیت شبیه به تریپسین است. بدین ترتیب آکروزوم به عنوان یک لیزوزوم تخصص عمل یافته فعالیـت مـی کند (Eurell & Frappier, 2006).

اصطلاح جدید آکروپلاکسوم به ساختاری اطلاق می شود که عبارت از یـک حلقـه حاشـیه ای اسـت کـه شامل الیاف کراتین به ضخامت 5 تا 10 نانومتر و اکتین-F است . این مجموعـه صـفحه آکروزومـی[1] نامیـده می شود. حلقه طی دراز شدن سر اسپرماتید ارتباط نزدیکی با لبه برجسـته آکـروزوم (صـفحه آکروزومـی) و پوشش هسته دارد. آکروپلاکسوم، آکروزوم را به هسته متصل نموده و اتصال کلاهک آکروزومـی بـه غشـای هسته در حال کشیده شدن را تضمین می کند. از آنجایی که آکروپلاکسوم نقش مهمی در شـکل گـرفتن سـر در مراحل اولیه دراز شدن اسپرماتید ایفاء می کند، اختلال در تشـکیل آکـروزوم سـبب تولیـد آکروپلاکسـوم

[1] Acrosomal plate

ناقص می شود ودر نهایت اسپرمی با سر بد شکل تولید می شود (مانند حالت تراتوزواسپرمی) (Toshimori, 2009).

3- مرحله آکروزومی: هسته و جسم سلول شروع به طویل شدن می کند و اسپرماتید طوری قرار می گیرد که دم آن به طرف لومن و سر به طرف حاشیه لوله منی ساز باشد. اسپرماتیدها که قبلاً به وسیله زوائد جانبی سلولهای سرتولی جدا می شدند در گودی رأسی این سلولها قرار می گیرند. در لبه خلفی کلاهک رأسی، استوانه ای از میکروتوبولها موسوم به مانشت[1] تشکیل می شود و همزمان با آن، اسپرماتید طویل می گردد. در این مرحله با شروع طویل شدن هسته، هیستون های هسته ای با پروتئین های بازی پروتامین جایگزین می شوند. میتوکندری ها به دور بخش ابتدایی تاژک تجمع یافته و ناحیه ضخیمی موسوم به غلاف میتوکندری را به وجود می آورند (Eurell & Frappier, 2006).

4-مرحله بلوغ: مازاد سیتوپلاسم از سلول جدا شده و تنها لایه نازکی از سیتوپلاسم به صورت پوششی روی هسته، قطعه میانی و قطعه دمی اسپرماتوزوآی آینده باقی می ماند (Eurell & Frappier, 2006).

اسپرماتوزوئید بالغ، سلول هاپلوئید بسیار تمایز یافته‌ای است که دارای سر و تاژک (دم) می باشد. با اینکه شکل سر اسپرم در گونه های مختلف متفاوت است، اسپرم ها را از نظر شکلی می توان در دو گروه اصلی طبقه بندی کرد:

1- سر داسی شکل که در جوندگان مشاهده می شود.

2- سر پارویی شکل (بادبزن مانند) که در بیشتر گونه ها از جمله انسان مشاهده می شود.

سر اسپرم از یک هسته، یک آکروزوم و حجم کوچکی از سیتوپلاسم به شکل لایه های سیتوپلاسمی تشکیل شده است. هسته حاوی ژنوم پدری بوده که حاوی DNA بسیار فشرده ای است که جنینی با نصف کروموزوم های خود ایجاد می کند و جنسیت جنین را تعیین می نماید. قطب قدامی هسته بوسیله کلاهک آکروزومی پوشیده می شود که دارای غشاء آکروزومی داخلی و خارجی است که در انتهای خلفی به هم جوش می خورند. غشاء های آکروزومی داخلی و خارجی از غشاء گرانول پیش آکروزومی که از دستگاه گلژی منشأ گرفته است، متمایز شده اند. به نظر می رسد که این تمایز در مرحله انتهایی طویل شدن اسپرماتیدها اتفاق می افتد. ناحیه آکروزومی شامل دو زیر دامنه است: آکروزوم قدامی و آکروزوم خلفی یا ES[2]. آکروزوم قدامی در واکنش آکروزومی که منجر به آزاد سازی آنزیم های آکروزومی هیدرولیتیک و پروتئولیتیک می شود دخالت دارد. از نظر ساختاری غشاء پلاسمایی اسپرم تمامی سطح سر و دم اسپرم را قبل از واکنش آکروزومی می پوشاند. غشاء پلاسمایی اطراف آکروزومی می تواند با غشاء خارجی آکروزوم،

[1] Manchette
[2] Equatorial Segment

هنگام واکنش آکروزومی ترکیب شود ولی غشاء آکروزومی خارجی ناحیه استوایی، درگیر واکنش آکروزومی نبوده و به طور محکمی به غشاء آکروزومی داخلی به واسطه پل های عرضی متصل است. غشاء پلاسمایی ناحیه استوایی می تواند با غشای اووسیت، هنگام تلفیق غشای گامت ها ترکیب شود(Toshimori, 2009).

قسمت قاعده هسته با یک غلاف پس آکروزومی که محتوی پروتئین های فیبروزی غنی از سولفور است احاطه شده است. در اسپرماتوزوئیدهای مرده این غلاف با رنگ های خاص مانند ائوزین یا برومونفل بلو رنگ می گیرد. غشای پلاسمایی ناحیه پس آکروزومی محتوی رسپتورهای مورد نیاز برای تشخیص اووسیت هومولوگ می باشد. از نظر ساختاری غشاء پلاسمایی پس آکروزومی در سطح خود ماده ای شبیه به گلیکو کالیس را نمایان می سازد (Eurell & Frappier, 2006).

احتمالاً این ماده حاوی مولکول های ناشناخته مختلفی است که در وقایع مربوط به ظرفیت یابی و واکنش آکروزومی تا تلفیق اسپرم باغشای اووسیت دخالت دارد.

DNA اسپرم و ماتریکس هسته ای مربوطه کاملاً داخل پوشش هسته قرار گرفته و مستقیماً در معرض سیتوپلاسم قرار ندارند. بر خلاف این، ژنوم مادری، داخل پوشش هسته ای محصور نبوده و به طور مستقیم با سیتوپلاسم در ارتباط است. رشته های DNA کروماتین اسپرم علیرغم اینکه با پوشش سفتی محافظت می شوند، احتمال دارد در اثر فرآیند طولانی اسپرماتوژنز صدمه ببینند. همچنین در این مرحله وقوع آپوپتوز باعث قطعه قطعه شدن DNA می شود. از طرفی قطعه قطعه شدن DNA در طی مسیر طولانی اسپرم برای رسیدن به تخمک نیز رخ می دهد. این نوع قطعه قطعه شدن DNA می تواند منجر به کاهش باروری و رشد جنینی، افت میزان لانه گزینی و آبستنی موفق گردد. در طول اسپرماتوژنز، کروماتین اسپرم ضرورتاً تغییر وضعیت داده و متراکم تر می شود.DNA ژنومیک از حالت نوکلئوزوم متصل به هیستون به ساختار مارپیچی غنی از پروتامین (شبیه به شیرینی های حلقه ای) تغییر شکل می دهد. اگر چه این ساختارهای حلقه مانند، به عوامل خارجی مانند توکسین های محیطی، عوامل جهش زای ژنتیکی، تنش اکسیداتیو و دود دخانیات بسیار مقاوم هستند اماDNA هنوز تا حد زیادی به استرس اکسیداتیو حساس است. رشته های DNA نه تنها با مکانیسم های فشرده شدن کروماتین بلکه طی روند فرار از آپوپتوز در طول اسپرماتوژنز به آسانی آسیب می بینند. علاوه بر این DNA اسپرم ممکن است به وسیله گونه های فعال اکسیژن (ROS)[1] که به صورت خود بخودی در اسپرم تولید می شوند یا در اثر تنش اکسیداتیو در زمان انزال آسیب ببینند (Toshimori, 2006).

[1] Reactive Oxygen Species

دم اسپرماتوزوئید به چهار بخش عمده تقسیم می شود که شامل گردن، قطعه میانی، قطعه اصلی و قطعه انتهایی می باشد. گردن دارای ساختمانی پیچیده است. صفحه پایه، باقیمانده غشاء هسته ای، دو تا سه میتوکندری(میتوکندری گردنی) و یک قطعه ارتباطی (دارای کاپیتولوم، سنتروزوم و قطعات استوانه ای متصل به الیاف متراکم) اجزای اصلی آن هستند. سنتروزوم ها شامل سانتریول قدامی و انواع پروتئین های زمینه ای اطراف سانتریول هستند. قطعه میانی حاوی هسته تاژکی مرکزی با الگوی 2+9 اکسونم، الیاف متراکم و میتوکندری های سازماندهی شده به صورت مارپیچی می باشد (Toshimori, 2006).

قطعه اصلی حاوی هسته تاژکی مرکزی با الگوی 2+9 میکروتوبول، الیاف متراکم که در این قطعه خاتمه یافته و غلاف فیبروزی در برگیرنده الیاف متراکم، می باشد. قطعه انتهایی حاوی میکروتوبول های تاژکی است اما زوج های میکروتوبولی به صورت میکروتوبولهای تکی درمی آیند و غلاف فیبروزی ناپدید می گردد. وظیفه اسپرماتوزوآی پستانداران فقط انتقال ژنوم پدری نیست بلکه اووسیت متوقف شده در مرحله متافاز میوز 2 را نیز فعال می کند (Eurell & Frappier, 2006).

9-2-2- لوله های بیضه ای مستقیم[1]

مجاری تناسلی داخل بیضه ای شامل لوله های مستقیم، شبکه بیضه یا رته تستیس و مجاری وابران است. این مجاری، اسپرماتوزوئید و مایع را از لوله های منی ساز به مجرای اپی دیدیم منتقل می کنند. لوله های منی ساز به وسیله ساختمان هایی به نام لوله های مستقیم به شبکه بیضه می پیوندند. این لوله ها کوتاه بوده و دارای مسیر مستقیمی هستند. قطعه انتهایی لوله های منی ساز از سلولهای پشتیبان تغییر یافته تشکیل شده که حفره لوله ای را مسدود می کنند و رأس آنها به داخل قسمت ابتدایی و فنجانی شکل لوله های مستقیم پیش می رود. اسپرم ها باید از شکاف های باریک بین سلول های سرتولی تغییر یافته برای رسیدن به لوله های مستقیم عبور کنند. قطعه انتهایی به عنوان دریچه‌ای عمل می کند که از جریان برگشتی مایع رته تستیس به لوله های منی ساز جلوگیری می کند. اپی تلیوم لوله های مستقیم از سنگفرشی ساده تا استوانه ای است که شامل ماکروفاژهای متعدد و لنفوسیت است که قادر به فاگوسیت اسپرماتوزوآ می باشند (Eurell & Frappier, 2006).

10-2-2- شبکه بیضه[2]

کانال های آناستوموزی نامنظم که بوسیله بافت هم بند سست احاطه شده رته تستیس را شکل می دهند. اپی تلیوم آن سنگفرشی ساده تا استوانه ای ساده است. رشته های الاستیک و سلولهای انقباضی زیر اپی

[1] Straight Testicular Tubules
[2] Rete Testis

تلیوم وجود دارند. بیشتر مایع بیضه ای که در سر اپی دیدیم باز جذب می شود در رته تستیس تولید می شود. ترکیب مایع بیضه ای شامل مایع لوله های منی ساز، لنف بیضه ای و پلاسمای خون است (Eurell & Frappier, 2006).

3-2- اپی دیدیم

اپی دیدیم یک ارگان جنسی ضمیمه دینامیک است که حفظ حالت تمایز یافته اپی تلیوم آن به آندروژنهای بیضه ای بستگی دارد. از 8 تا 25 مجرای وابران و یک مجرای اپی دیدیم طویل و پیچ در پیچ تشکیل شده است. از نظر ماکروسکوپی اپی دیدیم به سه قسمت سر، جسم و دم تقسیم می شود و به وسیله تونیکا آلبوژینای ضخیمی از جنس بافت هم بند متراکم نامنظم احاطه شده که آن هم به وسیله لایه احشایی تونیکا واژینالیس پوشیده می شود(Eurell & Frappier, 2006).

3-2-1- مجرای وابران

بین 25-8 مجرای وابران، از رته تستیس خارج گشته و به قسمت سر اپی دیدیم ملحق می گردد. اپی تلیوم مجرای وابران استوانه ای ساده است و شامل سلولهای اصلی مژه دار یا بدون مژه می باشد. سلول های تک هسته ای پراکنده که ناحیه اپی تلیوم قاعده ای را مورد هجوم قرار داده اند به اشتباه تحت عنوان تیپ سوم سلولهای اصلی نام گذاری شده اند. سلولهای مژه دار به حرکت اسپرماتوزوآ به سمت اپی دیدیم کمک می کنند. سلولهای بدون مژه، دارای رأس مسواکی از میکروویلی ها بوده و خصوصیات مورفولوژیک اندوسیتوز فاز مایع مانند تو رفتگی های پینوسیتوتیک پوشش دار، وزیکولهای انتقالی و پوشش دار و اندوزوم ها را نشان می دهند. بسیاری از سلولهای بدون مژه در روند بازجذب دخیل هستند و پس از بازجذب و هضم مایع و ماکرومولکولهای مجرا ممکن است محتوی اجسام باقیمانده و گلبولی PAS[1]مثبت باشند. بقیه سلولها احتمالاً فعالیت ترشحی داشته باشند.گاهی شکل حد واسط سلولهای اپی تلیالی مژه دار و بدون مژه مشاهده می شود. نسبت بین سلولهای مژه دار و بدون مژه در طول مجرا متفاوت است ولی تعداد سلولهای مژه دار به طرف اپی دیدیم افزایش می یابد. اپی تلیوم مجرا بوسیله 3 تا 6 لایه از میوفیبروبلاستها و بافت هم بند احاطه شده است. مجرای وابران و قسمت ابتدایی مجرای اپی دیدیم، سر اپی دیدیم را تشکیل می دهد(Eurell & Frappier, 2006).

3-2-2- مجرای اپی دیدیم

[1]Periodic acid – Schiff

مجرای اپی دیدیم، مجرایی منفرد و پیچ خورده است که طول آن در بین گونه های مختلف متفاوت است و در انسان حدود 4 تا 6 متر می باشد. این مجرا توسط بافت پوششی استوانه ای مطبق کاذب مفروش شده است که بر روی غشاء پایه تکیه دارد و پیرامون آن را سلولهای عضلانی صاف که انقباضات دودی آنها به حرکت اسپرم در طول مجرا کمک می کند و بافت همبند غنی از مویرگهای خونی احاطه کرده است. دو نوع سلول در اپی تلیوم اپی دیدیم وجود دارد که شامل سلولهای اصلی استوانه ای و سلولهای چند وجهی قاعده ای است. تیپ های سلولی دیگری مانند سلولهای رأسی و سلولهای روشن و همچنین ماکروفاژ و لنفوسیت نیز در داخل اپی تلیوم وجود دارند. سلولهای اصلی در سر اپی دیدیم بلندتر از بقیه قسمتهای اپی دیدیم می باشند. سطوح رأسی این سلولهای استوانه ای حاوی میکروویلی های بلند و گاهی منشعب بنام مژه ثابت[1] است که بتدریج به طرف دم کوتاه تر می شوند. ایجاد فرورفتگی های پینوسیتوزی در قاعده میکروویلی و وجود وزیکولهای پوشش دار و اجسام چند وزیکولی در سیتوپلاسم رأسی نشان می دهد که اپی تلیوم اپی دیدیم توانایی بازجذب بالایی دارد. بیشتر از 90 % مایعی که از بیضه خارج می شود در مجرای وابران و قسمت فوقانی مجرای اپی دیدیم بازجذب می شود. پروتئین متصل شونده به آندروژن و اینهیبین تولید شده بوسیله سلولهای سرتولی نیز در قسمت ابتدایی مجرای اپی دیدیم باز جذب می شود (Eurell & Frappier, 2006).

ترشح مواد مختلفی مانند گلیسرو فسفوریل کولین و گلیکو پروتئینهایی مانند فسفاتاز و گلیکوزیداز نیز در اپی دیدیم صورت می گیرد. بر اساس معیارهای هیستولوژیکی، هیستوشیمیایی و فوق ریز بینی، اپی دیدیم به چند بخش تقسیم می شود. به طور کلی بخش فوقانی مجرا (سر و جسم) در روند بلوغ اسپرماتوزوآ نقش دارد. دم اپی دیدیم به عنوان محل اصلی ذخیره اسپرم عمل می کند. اسپرم هایی که بیضه را ترک می کنند هم نابارور و هم غیر متحرک می باشند در حالی که اسپرم های اپی دیدیم، بارور و متحرک هستند. اسپرم ها طی عبور از مجرای اپی دیدیم در معرض یکسری تغییرات عملکردی و مورفولوژیکی قرار می گیرند که منجر به بارور شدن آنها در زمان رسیدن به دم اپی دیدیم می گردد. تغییرات اسپرم شامل ایجاد تحرک پیش رونده، تغییر متابولیسم، تغییر ویژگیهای سطح غشاء پلاسمایی (فعال شدن مولکولهای متصل به غشاء که برای روند شناسایی طی لقاح ضروری می باشند)، ثبات غشاء پلاسمایی از طریق اکسیداسیون گروههای سولفیدریل و از بین رفتن باقیمانده سیتوپلاسم اسپرماتید، می باشد. اسپرم هایی که دارای باقیمانده سیتوپلاسمی هستند قادر به بارور کردن تخمک نمی باشند. ذخیره اسپرماتوزوآ در دم اپی دیدیم پس از بلوغ کامل آن صورت می گیرد و به مدت طولانی تر از زمانی که با دمای مشابه در in vitro نگهداری شود

[1] Stereocilia

می توانند ذخیره شوند. اسپرم های اپی دیدیم با خود آنتی ژنهای قوی حمل می کنند و به راحتی مـی تواننـد پاسخ اتو ایمن را به وسیله آنتی بادیهای آنتی اسپرم تحریک کننـد کـه سـد خـونی –اپـی دیـدیمی مـانع آن می شود(Eurell & Frappier, 2006).

4-2- لقاح

در موش سوری تقریبا 58×10^6 اسپرم در هر انزال به داخل مجرای تناسلی ماده آزاد می شـود. تعـدادی از اسپرم ها طی 5 دقیقه به آمپول می رسند، اما تا حدود یک ساعت آماده لقاح نیستند. این روند بلـوغ تحـت عنوان ظرفیت یابی[1] نامیده می شود. برای رسیدن به سطح اووسیت، اسپرم باید ابتدا توده کومولوسی و سـپس زوناپلوسیدا[2]را سوراخ کنـد. گلیکـوپروتئین ZP3 بـه عنـوان پـروتئین بانـد شـونده اسـپرم در زونـا پلوسـیدا می باشد. در بسیاری از پستانداران این اتصال به شدت مختص گونه هاسـت کـه باعـث ممانعـت از سـوراخ شدن زوناپلوسیدای یک گونه بوسیله اسپرم های سایر گونه ها می شود. همچنین ZP3 واکنش آکروزومـی را تحریک می کند. واکنش آکروزومی، پروسه ای است که در آن آکروزوم با غشاء پلاسمایی سـر اسـپرم پیونـد حاصل کرده که این عمل باعث آزاد شدن آنزیم های هیدرولیتیک متعدد می شـود. در صـورتی کـه واکـنش آکروزومی صورت نگیرد اسپرم قادر به بارور کردن تخمک نیست. اتصال قسمت خلفی سر اسـپرم بـا غشـاء اووسیت آبشار واکنش هایی تحت عنوان لقاح را فعال می کند. اولین رویـداد، تغییراتـی در سـطح اووسـیت است که مانع از اتصال اسپرم اضافی می گردد. رویداد دیگر اگزوسیتوز وابسـته بـه Ca^{++} دانـه هـای قشـری است که زیر غشاء پلاسمایی قرار گرفته اند. این رویداد باعث شروع واکنش زونا می گردد که شـامل اتصـال متقابل[3] گلیکوپروتئین های زوناپلوسیدا و تغییر گلیکوپروتئین ZP3 است. بنابراین باند شدن بیشتر اسـپرم یـا تحریک واکنش آکروزومی صورت نمی گیرد. این رویدادها به ممانعت از پلی اسپرمی کمک می کننـد. طـی لقاح، سر، قطعه میانی و بخش وسیعی از دم اسپرم به سیتوپلاسـم اووسـیت ملحـق مـی شـوند. قطعـه میـانی اسپرم سانتریول و میتوکندری پدری را در اختیارسلول تخم قرار می دهد. لقـاح باعـث تحریـک تقسـیم دوم میوز و آزاد شدن جسم قطبی دوم می گردد. غشاء های هسته ای که شـامل پـروتئین هـای لامـین هسـته ای است، اطراف کروموزوم های مادری و پدری تشکیل مـی گـردد و پرونوکلئـوس هاپلوئیـدی نـر و مـاده بـه صورت جداگانه شکل می گیرد که به طرف مرکز اووسـیت حرکـت مـی کننـد. دوبـاره سـازی DNA طـی مهاجرت اتفاق می افتد. پرونوکلئوس ها به همـدیگر متصـل نمـی شـوند، بلکـه غشـاء هـا شکسـته شـده و کروموزوم ها روی دوک تجمع می یابند و اولین تسهیم بلافاصله اتفـاق مـی افتـد. بـه علـت عـدم همزمـانی

[1] Capacitation
[2] Zonapellucida
[3] Cross-linking

تخمک گذاری و لقاح، اولین تسهیم در بیشتراز چند ساعت در یک جمعیت از تخم های بارور شده به صورت طبیعی اتفاق می افتد. همزمانی بیشتر در رشد در باروری in vitro امکان پذیر است. اووسیتهای بارور نشده حدود 12 ساعت و اسپرم ها حدود 6 ساعت زنده باقی می مانند(Nagy et al., 2003).

2-5- تحریک تخمک گذاری

اولین نوزاد بوجود آمده از IVF با استفاده از تخمکی که حاصل یک سیکل طبیعی بود، به دنیا آمد. اما میزان موفقیت این پروتکل خیلی پایین بود. امروزه به منظور آسان کردن تحریک اوولاسیون درIVF و جلوگیری از پدیده های ناخواسته از آنالوگهای GnRH[1] استفاده می شود. آنالوگهای GnRH ترکیباتی از مولکولهای هورمون های آزاد کننده گنادوتروپین بوده که در ابتدا، آزاد شدن گنادوتروپین را از غده هیپوفیزتحریک می کند و ادامه تجویز باعث کاهش ترشح LH و FSH می شود که یک ابزار اساسی برای کنترل یک سیکل تحریکی در طی IVF محسوب می شود (صالح نیا و همکاران 1380).

به منظور انجام آزمایشاتی که نیاز به تعداد زیادی جنین وجود دارد، اغلب برای افزایش تعداد اووسیتهای آزاد شده، قبل از جفت گیری، گنادوتروپین به موشهای ماده تزریق می شود.PMSG[2] به عنوان مقلد FSH در بلوغ اووسیت و hCG[3] به عنوان مقلد LH در القاء تخمک گذاری استفاده می شود. القاء مؤثر سوپراوولاسیون در موش سوری بستگی به فاکتورهای متعدد مانند سن و وزن ماده ها، دوز گنادوتروپین ها، زمان تزریق و نژاد موشهای مورد استفاده دارد. علاوه بر این، تعداد اووسیتهای آزاد شده ای که بارور می شوند بستگی به عملکرد تولید مثلی نرها دارند(Nagy et al., 2003).

2-6- فلوروکینولونها

در دو دهه اخیر فلوروکینولونها به عنوان داروهای بی خطر و با قابلیت تحمل بالا شناخته شده اند. اثرات سوء این داروها ممکن است بالقوه و یا متأثر از تغییرات ساختاری باشد. از زمان معرفی آنها با نالیدیکسیک اسید در سال 1960 این عوامل ضد میکروبی گسترش وسیع سنتتیک و کلینیکی داشته اند که منجر به بهبود فعالیت ضد میکروبی آنها، جنبه های فارماکوکینتیک و پروفایلهای توکسیسیتی گشته است (Sharma et al., 1994; Takayama et al., 1995). پیریدوپیریمیدین و مشتقات سینولین در سال 1970 معرفی شدند که طیف وسیع تری از خواص ضد میکروبی داشتند. مهمترین پیشرفت، گسترش

[1] Gonadotropin Releasing Hormone
[2] Pregnant mare' s serum gonadotropin
[3] Human chorionic gonadotropin