بسم الله

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه ی دکتری حرفه ای رشته ی دامپزشکی

اثر استرس حرارتی در بیان ژن connexin- 43 درکشت سلول سرتولی گوسفند

استاد راهنما:

دکتر حسین حسن پور

استادان مشاور:

دکتر پژمان میرشکرایی

دکتر علی کدیور

پژوهشگر:

مریم بدیع الصنایع

مهر ماه ۱۳۹۲

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم پایه

پایان نامه **خانم مریم بدیع الصنایع** جهت اخذ درجه دکتری رشته دامپزشکی با عنوان **اثر استرس حرارتی در بیان ژن connexin- 43 درکشت سلول سرتولی گوسفند** در تاریخ **۱۳۹۲/۷/۳۰** با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه / نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه

دکتر حسین حسن پور با مرتبه علمی دانشیار **امضاء**

۲. استادان مشاور پایان نامه

دکتر پژمان میرشکرایی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

دکتر علی کدیور با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

۳. استادان داور پایان نامه

دکتر ابوالفضل شیرازی با مرتبه علمی دانشیار **امضاء**

دکترعلی پرچمی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

مسؤولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسؤولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

دکتر سعید حبیبیان دهکردی **دکتر ناصر شمس اسفندآبادی**

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی **رئیس دانشکده دامپزشکی**

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست. سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.

با تشکر و سپاس از استاد دانشمند و پرمایه ام جناب **آقای دکتر حسن پور** که از محضر پر فیض تدریسشان، بهره ها برده امواز راهنمایی های ارزنده ایشان برای به نتیجه رسیدن این پایان نامه سپاسگزارم و همواره بهترین ها را برای ایشان آرزومندم.

با سپاس و تشکر فراوان از **جناب آقای دکتر میرشکرایی** که استادی را در حق من به معنی واقعی کلمه معنا کردند. چگونه سپاس گویم تأثیر علم آموزی شما را که چراغ روشن هدایت را بر کلبه ی محقر وجودم فروزان ساخته است. آری در مقابل این همه بزرگواری مرا نه توان سپاس است و نه کلام وصف.

از **جناب آقای دکتر کدیور** بخاطر همه ی تلاشهای شبانه روزیشان جهت پیشبرد این پایان نامه سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر نظری و سرکار خانم افضلی که مرا در هرچه پربارتر کردن این پایان نامه یاری نمودند، سپاسگزارم.

با سپاس فراوان از جناب آقای دکتر شیرازی و جناب آقای دکتر پرچمی که زحمت داوری این پایان نامه بر عهده ایشان است. مایه افتخار است که در طول دوران تحصیل سعادت شاگردی ایشان را داشته ام.

با تشکر فراوان از تمامی اساتید محترم دانشگاه شهرکرد که هرچه در این شش سال تحصیلم آموختم، از زحمات ایشان است. و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

از تمامی همکلاسی های عزیزم به ویژه دوست و همراه همیشگی ام شبنم که خاطرات خوشی را در لحظات سخت برایم رقم زد، صمیمانه تشکر می کنم.

تقدیم به...

عزیزانی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این عزیزان دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند نه میتوانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای خسته ی شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. پس خداوندا توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند. به خاطر بودنتان ممنونم.

حاصل بهترین سال های زندگی ام را تقدیم می کنم

به مادرم

دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

چکیده

سلول‌های سرتولی از دسته گروه های سلولی هستند که در لوله‌های اسپرم‌ساز برای سلول‌های اسپرماتوژنیک نقش حمایتی و تغذیه‌ای دارند این سلول‌ها از طریق اتصالات منفذداری که بین آنها قرار دارد، وظیفه حمایتی خود را انجام می دهند. در این مطالعه بیان ژن کانکسین۴۳ که فراوان‌ترین پروتئین بیان شده در اتصالات منفذدار در سلول‌های بیضه است، بررسی شده است. در این مطالعه بیان این ژن در سلول های رده سرتولی گوسفند تحت استرس حرارتی خفیف و شدید با روش real time quantitative PCR اندازه گیری شد. سلولهای رده سرتولی از بافت بیضه ۱۰ رأس بره جدا شد. بعد از کشت و۳ بار پاساژ دادن این سلول‌ها به سه دسته تقسیم شدند گروه کنترل که در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد، گروه دوم متاثر با استرس حرارتی ملایم (۳۹ درجه سانتی گراد) و گروه سوم متاثر با استرس حرارتی شدید (۴۲ درجه سانتی گراد) به مدت ۶ ساعت نگهداری شد. نتایج نشان داد که کاهش معنی‌دار در درصد سلول‌های زنده تحت استرس حرارتی شدید نسبت به گروه کنترل (دمای ۳۲ درجه سانتی گراد) وجود دارد. ($p<۰/۰۵$) و در مقابل، در تجزیه و تحلیل کمی نسبی، رونوشت کانکسین۴۳ در استرس گرمایی شدید نسبت به گروه کنترل بصورت معنی‌داری افزایش یافته است (۴/۱برابر) ($p<۰/۰۵$). از این نتایج چنین می توان استنباط کرد که به چالش کشیدن سلول‌های رده سرتولی با حرارت ۴۲ درجه سانتی‌گراد بقای سلول را به خطر می-اندازد و به نظر می‌رسد که بیان بیش از حد کانکسین۴۳ در فیزیوپاتولوژی استرس گرمایی نقش مهمی در سلول های سرتولی گوسفند داشته باشد. به هر حال یافته های این پژوهش می تواند شروعی در جهت تعیین مکانیسم های مولکولی دخیل در اثرات نامطلوب تنش گرمایی در تولید مثل جنس نر باشد.

واژگان کلیدی : استرس حرارتی، سلول سرتولی، کانکسین۴۳، گوسفند

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول- مقدمه	۵
فصل دوم –کلیات	۷
۲-۱- اجزاء دستگاه تناسلی نر	۷
۲-۱-۱- عملکرد بیضه در پستانداران	۸
۲-۱-۲- کنترل درجه حرارت در بیضه‌ها	۹
۲-۱-۳- مشخصات بیضه در گوسفند (قوچ)	۱۰
۲-۱-۴- سلول‌های سرتولی پستانداران	۱۰
۲-۱-۵- ارتباط‌های بین سلولی در سلول‌های سرتولی	۱۳
۲-۱-۶- اهمیت نقش سلول‌های سرتولی در اسپرماتوژنز	۱۴
۲-۲- تنش‌های محیطی و اثر آن‌ها بر روی تولید مثل	۱۵
۲-۲-۱- تنش گرمایی و اثر آن بر روی تولید مثل	۱۵
۲-۲-۲- استرس حرارتی و اثر آن بر روی بیضه	۱۵
۲-۳- ارتباطات سلولی	۱۶
۲-۳-۱- ارتباطات منفذدار	۱۷
۲-۳-۲- کانکسین‌ها	۲۰
۲-۳-۳- ساختار کانکسین	۲۱
۲-۳-۴- انواع کانکسین در بیضه	۲۲
۲-۳-۵- کانکسین ۴۳	۲۲
۲-۳-۶- نقش کانکسین در حیات سلول	۲۳
فصل سوم - مواد و روش کار	۲۵
۳-۱- کشت سلول سرتولی	۲۵
۳-۱-۱- محیط‌های مورد استفاده	۲۵
۳-۱-۲- مراحل انجام کار	۲۶
۳-۱-۲-۱- پاساژ سلولی	۲۷
۳-۱-۲-۲- رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی vimentin جهت تائید سلول‌های سرتولی	۲۷
۳-۱-۳- تیمار کشت سلولی با تنش‌های دمایی	۲۸
۳-۱-۴- رنگ‌آمیزی به‌منظور شمارش سلول‌های مرده و زنده	۲۸

۳-۲- استخراج و خالص‌سازی RNA از سلول‌های سرتولی ۲۸
۳-۳- تولید cDNA ۲۹
۳-۴- طراحی و توالی پرایمرهای مورد استفاده ۳۰
۳-۵- Real_time PCR ۳۱
۳-۵-۱- تنظیم و بهینه‌سازی غلظت پرایمرها ۳۲
۳-۵-۲- پرایمر دایمر ۳۲
۳-۵-۳- تنظیمات و بهینه‌سازی دستگاه Real – Time PCR ۳۳
۳-۵-۴- تنظیم و بهینه‌سازی دما و زمان ۳۳
۳-۵-۵- منحنی تکثیر ۳۴
۳-۶- آنالیز داده‌های کمی ۳۵
۳-۶-۱- ارزیابی نسبی داده‌ها ۳۵
۳-۶-۱-۱- آنالیز کمی نسبی داده‌ها ۳۵
۳-۷- مراحل عملی واکنش qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) ۳۶
۳-۸- محاسبات آماری ۳۶

فصل چهارم - نتایج ۳۷

۴-۱- رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی vimentin جهت تائید سلول‌های سرتولی ۳۸
۴-۲- شمارش سلول‌های زنده ۳۸
۴-۳- منحنی تفکیک (منحنی ذوب) ۳۹

فصل پنجم – بحث ۴۳

منابع ۴۶

فهرست شکل‌ها

عنوان	شماره صفحه
شکل۲-۱- آناتومی دستگاه تناسلی نر	۸
شکل۲-۲- تنظیم درجه حرارت در بیضه	۱۰
شکل۲-۳- ساختار بافت شناسی لوله‌های اسپرم‌ساز	۱۳
شکل۲-۴- ساختار اتصالات منفذدار در بین دو سلول	۱۹
شکل۲-۵- ساختار فضایی کانکسین	۲۱
شکل۳-۱- مقایسه منحنی پرایمر دایمر و محصولات تکثیر یافته	۳۳
شکل۳-۲- نمونه ای از منحنی تکثیر ایده‌آل که فازهای منحنی تکثیر را نشان می دهد	۳۴
شکل ۴-۱- سلول‌های سرتولی در روز کشت	۳۷
شکل۴-۲ -تائید سلول‌های سرتولی توسط شناساگر ویمنتین	۳۸
نمودار۴-۱- میانگین میزان درصد سلول‌های زنده در دماهای متفاوت ذکر شده	۳۹
نمودار۴-۲- نتایج حاصل از الکتروفورز آزمایش محصولات PCR نمونه‌ها با پرایمر کانکسین ۴۳	۴۰
نمودار۴-۳- نتایج حاصل از الکتروفورز آزمایش محصولات PCR نمونه‌ها با پرایمر گلیسرآلدهید تری فسفات دهیدروژناز (GAPDH)	۴۱
نمودار۴-۴-. بیان نسبی ژن کانکسین ۴۳ درگروههای مختلف سلول‌های سرتولی متاثر با استرس حرارتی	۴۲

فهرست جدول‌ها

جدول ۳-۱- توالی پرایمرهای طراحی شده ۳۱

فصل اول

مقدمه

مدت‌ها است که تاثیر فصل بر جنبه‌های مختلف عملکرد دام مشخص شده است؛ و با توجه به اینکه بیشترین تراکم جمعیت جهان و دام‌های اهلی در مناطقی است که عوامل استرس زای فصلی به میزان زیادی توان تولیدی آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد، اهمیت این موضوع باید مد نظر قرار داده شود، که نه تنها از راه افت تولید وافت کیفیت شیر بر درآمد تولید کننده اثر منفی می‌گذارد بلکه سبب بروز مشکلاتی بر راندمان تولیدمثل، برنامه‌های مدیریت و سلامت دام از جمله لنگش می‌شود [۴،۹]. به عنوان مثال در مطالعه‌ای در آمریکا زیان اقتصادی ناشی از استرس گرمایی در صنعت گاو شیری سالیانه ۹۰۰ میلیون دلار تخمین زده شده است که اهمیت این موضوع را پررنگ تر می‌کند [۹] .

در پستانداران اسپرماتوژنز طبیعی نمی تواند در دمای بدن رخ دهد بلکه در دمایی حدود ۳۷ درجه سانتیگراد رخ می‌دهد که این دمای پایین هنگام مهاجرت بیضه‌ها به داخل اسکروتوم به دست می‌آید. البته در برخی پستانداران نیز بیضه در بدن باقی می‌مانند و تنها در محدوده زمانی تولید مثل این مهاجرت موقتی رخ می-دهد. بنابراین حساسیت اسپرماتوژنز(Spermatogenesis) در پستانداران نسبت به حرارت کاملاً واضح است [۱۴].

بطور دقیق‌تر می توان ذکر کرد که اثرات افزایش دما برای انواع گونه‌ها از جمله موش، گاو، قوچ و انسان بررسی شده است. دناتوره شدن پروتئین‌ها (Protein denaturation) در واقع اولین روندی است که در طی افزایش دما مشاهده می‌شود، در حالی که اگر استرس وارد شده به سلول از نوع تابش فرابنفش باشد این روند، تغییر در سنتز DNA نیز خواهد بود [۵۰]. البته گروهی از ژن‌ها نیز هستند که در زمان استرس گرمایی القاء

می‌شوند، از جمله‌ی این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های شوک گرمایی نظیرHSP اشاره کرد.گزارش شده است که استرس گرمایی می‌تواند نوکلئوتیدها از جمله RNA و DNA را آسیب بزند، روند سنتز پروتئین‌ها را مختل کند و موجب دناتوره شدن پروتئین‌ها شود همچنین مانع از بسته‌بندی طبیعی کروماتین می‌شود و باعث کاهش تمامیتDNA می‌شود [۳۱]. همچنین وجود ارتباط‌های سلول-سلول برای دادن پاسخ کافی به استرس-های وارده به سلول ضروری است یکسری ارتباطات بین‌سلولی هستند که برای بر قراری هموستاز سلول ضروری هستند نظیر اتصالات منفذدار (Gap junctions) که این ارتباطات سلولی در سلول‌های سرتولی نیز وجود دارند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این ارتباطات سلولی به اشعه ماوراء بنفش و هیدروژن پروکسید هم واکنش نشان می‌دهند به هر حال پاسخ آن نسبت به استرس حرارتی هنوز واضح نیست [۲۱].

اتصالات منفذدار مهره‌داران از کانکسین‌ها (خانواده ای از پروتئین‌های گذار غشایی مرتبط که وزن مولکولی میان ۲۶۰۰۰ و ۶۰۰۰۰ دارند) تشکیل شده‌اند [۳]. از آنجایی که بیشترین کانکسین بیان شده در بیضه کانکسین۴۳ است به احتمال زیاد این کانکسین نقش کلیدی را در رشد بیضه و پس از آن در روند اسپرماتوژنز ایفا می‌کند [۵۳]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که کانکسین‌های بیضه‌ای می‌توانند برای اثار مخرب سموم زیست‌محیطی مولکولی هدف قرار بگیرند [۴۱].

به‌دلیل آسیب‌های سلولی که استرس حرارتی می‌تواند داشته باشد و نیز به‌خاطر اهمیت دستگاه تولیدمثل اثر استرس حرارتی بر روی سلول‌های سرتولی، به‌عنوان مدلی مناسب برای دستگاه تولید مثل بررسی گردید. به این دلیل که سلول‌های سرتولی پستانداران (گوسفند) در محیط درون‌آزمایشگاهی قادرند به‌طور فعالی تکثیر یابند و تا چندین بار قابل پاساژ هستند و نیز به علت فریز کردن آسان این سلول‌ها در ازت مایع، این سلول‌ها به‌عنوان مدلی مناسب برای بررسی اثرات استرس حرارتی در آزمایشگاه مورداستفاده قرارمی‌گیرد تا تغییرات مربوط به mRNA ژن کانکسین۴۳مطالعه شود.

فصل دوم

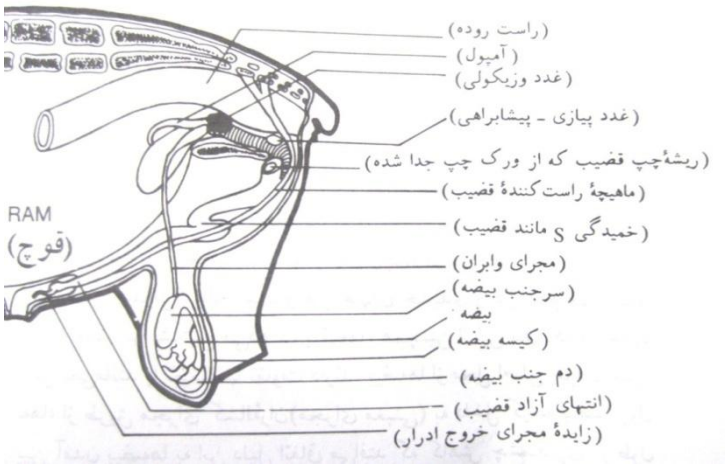
کلیات

۲-۱- اجزاء دستگاه تناسلی حیوان نر

دستگاه تولید مثل حیوان نر شامل کیسه بیضه، بند بیضه، بیضه‌ها، غدد ضمیمه، قضیب،غلاف قضیب و سیستم مجاری حیوان نر می‌باشد. سیتم مجاری شامل مجاری آوران در داخل بیضه‌ها، مجاری جنب بیضه و مجاری وابران است. مجاری خروج ادرار (میزراه) در خارج از بیضه‌ها است که در شکل ۲-۱ مشخص است. منشأ جنینی بیضه‌ها طناب‌های جنسی اولیه برآمدگی تناسلی می‌باشد، در حالی که مجاری تناسلی حیوان نر از مجاری ولفین (Wolffian Duct) منشأ می‌گیرند.

همان طور که در حیوان ماده تخمدان‌ها اندام‌های اولیه تولیدمثل هستند، بیضه‌ها نیز اندام‌های اولیه تولیدمثل در حیوان نر می‌باشند. بیضه‌ها به این دلیل اندام‌های اولیه تولیدمثل هستند که سلول‌های جنسی نر (اسپرم‌ها) و هورمون‌های جنسی نر (آندوژن‌ها) را تولید می‌کنند. بیضه‌ها از این جهت با تخمدان‌ها تفاوت دارند که در آنها تمام سلول‌های جنسی بالقوه در هنگام تولد موجود نیست. سلول‌های زاینده‌ی موجود در مجاری اسپرم‌ساز دستخوش تقسیمات سلولی مداوم شده و اسپرم‌های جدیدی را در تمام طول عمر تولیدمثل طبیعی حیوان نر تشکیل می‌دهند. بیضه‌ها، همچنین از این نظر که در حفره داخلی بدن باقی نمی‌مانند با تخمدان‌ها تفاوت دارند.بیضه‌ها از محل اصلی خود، یعنی، نزدیک کلیه‌ها، از طریق مجرای کشاله ران (مجرای-مغابنی) (Inguinal Canal) به داخل کیسه بیضه نزول می‌کنند. پایین آمدن بیضه‌ها به این دلیل اتفاق می-افتد که کاهش چشمگیری در طول رباطی که از ناحیه مغابنی امتداد یافته و به دم جنب بیضه متصل می-

شود، بوجود می‌آید. کوتاه شدن به این دلیل اتفاق می‌افتد که سرعت رشد این رباط به اندازه سرعت رشد دیواره بدن نیست. بیضه نزدیک مجرای مغابنی کشیده شده و فشار داخل شکمی به عبور آنها از طریق این مجرا و ورود آن‌ها به داخل کیسه بیضه کمک می کند. پایین آمدن بیضه‌ها تحت کنترل هورمون‌های گنادوتروپیک و آندروژن‌ها می‌باشد.



***شکل۲-۱- آناتومی دستگاه تناسلی نر* [۲].**

درتمام گونه‌ها بیضه‌ها بوسیله یک لایه سروزی به نام غشای مهبلی پوشیده شده‌اند. این لایه در واقع ادامه‌ی پرده صفاق است که در هنگام نزول بیضه‌ها به داخل کیسه بیضه کشیده شده و در امتداد خط جنب بیضه قرار می گیرد. لایه خارجی بیضه‌ها غشایی سفید و نازک از بافت همبند قابل ارتجاع است به نام غشاء آلبوژینه بیضه (Tunica Albuginea) که بلافاصله در سطح زیر آن رگ‌های خونی زیادی وجود دارد. زیر لایه خارجی بیضه، لایه پارانشیمی قراردارد‌که زرد رنگ بوده و توسط دیواره ناقصی از جنس بافت همبند به بخش‌هایی تقسیم شده است. مجاری موجود د ر داخل این بخش‌ها لوله‌های اسپرم‌ساز نامیده می‌شوند. لوله‌های اسپرم-ساز از طناب‌های اولیه‌ی جنسی بوجود آمده و حاوی سلول‌های زاینده و سلول‌های سرتولی می‌باشند سلول-های سرتولی بزرگ‌تر بود و تعدادشان خیلی کمتر از سلول‌های زاینده است. با تحریک سلول‌های سرتولی توسط هورمون FSH، این سلول‌ها می‌توانند پروتئین جاذب آندوژن و هورمون Inhibin تولید کنند [۲].

۲-۱-۱- عملکرد بیضه در پستانداران

بیضه‌ها گامت‌های نر و هورمون‌های نر (آندروژن‌ها) را تولید می‌کنند [۳۷].فعالیت بیضه‌ها هم از طریق ژنتیک و هم از طریق هورمون‌ها کنترل می‌شود و شرایط محیطی هم می‌تواند روی عملکرد بیضه موثر باشد [۴۴]. اسپرماتوژنز نیز فرایند مهمی است که در بیضه رخ می‌دهد. واژه اسپرماتوژنز فرایندی را توضیح می‌دهد که شامل همه فرایندهای درگیر در تولید گامت‌ها است در حالی که استروئیدوژنز شامل واکنش‌های آنزیمی است که منجر به تولید هورمون استروئیدی نر می‌شود. اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز از نظر ریخت‌شناسی و عملکردی متمایز می‌شوند [۳۷]. در اسپرماتوژنز، اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوآ تمایز می‌یابد و در طول این روند پیچیده میتوز میوز و تمایز سلولی رخ می‌دهد [۴۴].

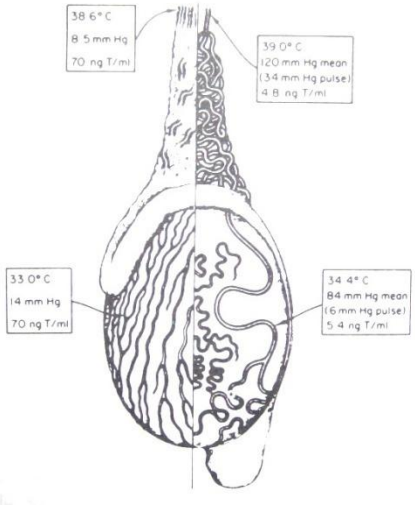
البته اسپرماتوژنز به عملکرد بهینه سلول‌های سرتولی بستگی دارد. تعداد سلول‌های سرتولی از روی تعداد سلول‌های بنیادی تعیین می‌شود و هر سلول سرتولی می‌تواند با حدود ۵۰-۳۰ سلول بنیادی مختلف که هر کدام در مرحله متفاوتی از اسپرماتوژنز است درتعامل باشد[۶].

۲-۱-۲-کنترل درجه حرارت در بیضه‌ها

برای تشریح اهمیت کنترل درجه حرارت بیضه‌ها می توان مثالی ارائه نمود، اگر کیسه بیضه یک قوچ با مواد عایق پوشانده شود یا بیضه‌ها به شکم بسته شوند، حیوان عقیم خواهد شد. درجه حرارت بیشتر باعث تحلیل سلول‌های لایه داخلی دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود. اگر قبل ازتحلیل کامل ، بیضه‌ها و کیسه بیضه به حالت طبیعی بر گردد. باروری مجددا به حالت اول می‌رسد. البته چند هفته طول می‌کشد تا منی مجدداً دارای خاصیت بارورکنندگی شود. در تابستان تولید منی نابارور در چندین گونه از حیوانات مزرعه ای مشاهده شده است که مربوط به اختلال در مکانیسم خنک کردن بیضه‌ها است.

شواهدی دال براینکه درجه حرارت پایین محیط باعث پایین آمدن باروری می‌شود، وجودندارد. نقش کیسه بیضه و بند بیضه در کنترل درجه حرارت بیضه‌ها با کشیدن بیضه‌ها به نزدیک بدن به هنگام پایین آمدن درجه حرارت محیط بوده همچنین به هنگام افزایش درجه حرارت محیط رها کردن بیضه‌ها بصورت پاندولی و دورتر از بدن رخ می‌دهد. دو عضله صاف در این عمل دخالت دارند. لایه عضلانی صاف بیضه ،عضله دارتوس (Dartos Muscle) و عضله صاف دیگر بنام کرماستر (Cremaster Muscle) که در اطراف بند بیضه قرار دارد، نسبت به درجه حرارت محیط حساس هستند. در هوای سرد انقباض این عضلات باعث جمع شدن و چروکیدگی کیسه بیضه شده، بند بیضه کوتاه می‌گردد و بیضه‌ها به بدن نزدیک می‌شوند. در هوای گرم این عضلات منبسط شده و باعث کشیدگی کیسه بیضه و طویل شدن بند بیضه می‌شوند و به این ترتیب بیضه‌ها به سمت پایین و دور از بدن آویزان می‌شوند. این عضله‌ها تا نزدیک سن بلوغ نسبت به تغییرات درجه حرارت واکنش نشان نمی‌دهند، زیرا بایستی توسط تستوسترون حساس شوند تابتوانند نسبت به تغییرات درجه حرارت محیط واکنش نشان دهند. خنک شدن واقعی بیضه‌ها بوسیله دو مکانیسم انجام می شود.

پوست کیسه بیضه دارای غدد عرق و چربی است که این غدد در هوای گرم فعالیت بیشتری دارند تبخیر ترشحات این غدد، کیسه بیضه و بیضه‌ها را خنک می‌کند. قسمت خارجی کیسه بیضه ۵-۲ درجه سانتی گراد خنک‌تر از داخل بیضه‌ها می‌باشد. با انبساط کیسه بیضه در هوای گرم سطح بیشتری برای خنک شدن بیضه-ها از طریق تبخیر فراهم می آید. علاوه بر سرد شدن بوسیله تبخیر، سرد شدن عمده و مهم از طریق تبادل حرارتی که از طریق گردش خون صورت می‌گیرد که در شکل ۲-۲ تنظیم دما از طریق جریان خون مشخص است [۲].



***شکل۲-۲-تنظیم درجه حرارت در بیضه* [۲]**

۲-۱-۳- مشخصات بیضه در گوسفند(قوچ)

قوچ از نظر رفتارهای جنسی و فعالیت هورمونی و تولید گامت و همچنین وزن بیضه و حجم آن دارای نوسانات فصلی است. با این حال تغییرات رفتاری و فیزیولوژیک قوچ نسبت به میش کمتر می‌باشد. در حقیقت زمانی که تخمک گذاری و استروس در میش مشاهده می‌شود فرایند اسپرماتوژنز و فعالیت جنسی در قوچ هرگز متوقف نشده است. بطور کلی می‌توان گفت تمام پارامترهای مذکور در پایان تابستان و پاییز بالا هستند و در پایان زمستان و بهار پایین هستند. طبق گزارشات وزن بیضه نیز می‌تواند متفاوت باشد که این وزن از ۱۹۰-۱۸۰ گرم تا ۳۲۰-۳۰۰ گرم می‌تواند تغییر کند همچنین تولید اسپرم در هر گرم از پارانشیم بیضه می-تواند در محدوده $۱۰^{۶}\times$ ۱۲/۵-۸/۵ باشد که در نتیجه میزان اسپرم تولیدی هر بیضه می‌تواند بین محدوده-ی $۱۰^{۹}\times$ ۴/۸-۱ باشد [۴۶].

۲-۱-۴- سلول‌های سرتولی پستانداران

طناب اولیه جنسی پستانداران متشکل است از سلول‌های حمایتگر، پیش سازهای سلول‌های سرتولی که توسط سلول‌های اولیه زایای جنسی احاطه شده است، بافت بینابینی و سلول های لیدیگ (Leydig Cells) که در طناب جنسی هستند. این نوع مورفولوژی در بیضه تا زمان بعد از تولد بدون تغییر باقی می‌ماند هر چند که فعالیت میتوزی در بیضه در دوران جنینی بسیار حائز اهمیت است [۲۳].

سلول‌های سرتولی و سلول‌های لیدیگ از جمله سلول‌های سوماتیک ماژور هستند که مشخصه ساختار بیضه و عملکرد آن هستند. سلول‌های سرتولی که یکی از ارکان اصلی رشد و گسترش سلول‌های جوان هستند، در محفظه توبولی بیضه محدود شده‌اند در حالی که سلول‌های لیدیگ فضای داخل توبول و فضای بینابینی را پوشش می‌دهند [۲۹]. آن‌ها از نظر ساختاری توبول‌ها را حمایت کرده و درتماس نزدیک هستند و اجتماعاتی همراه با سلول‌های زایا تشکیل می‌دهند [۳۴]. سلول‌های سرتولی دارای گیرنده‌های هورمون LH هستند و در مقابل هم سلول‌های لیدیگ دارای گیرنده FSH در سطح خود هستند و عملکرد این گیرنده‌ها در این سلول‌ها و تحریک شدن این گیرنده‌ها از ملزومات رشد و نگهداری سیستم تولید مثل و اسپرماتوژنز می‌باشد [۲۹]. سلول‌های رده سرتولی سلول‌های ترشحی در بیضه هستند و تنها سلول‌های غیرزایا اپیتلیوم اسپرم‌سازهستند [۳۴]. تنظیم و هماهنگی دقیق اسپرماتوژنز پستانداران به هماهنگی عملکردی سلول‌های سرتولی و دودمان سلول‌های زایا بستگی دارد، مخصوصا در طول توسعه اولیه بیضه پس از تولد زمانی که میزان نهایی جمعیت سلول‌های سرتولی نهاده می‌شود و سری اول از تقسیم‌های اسپرماتوگونیال اتفاق می‌افتد، این هماهنگی مهم‌تر می‌شود [۴۳].

اجتماعات سیناپسی فشرده تشکیل شده بین سلول‌های سرتولی باعث می شود که همانند سدی عمل کنند که اجزای سرم فیلتر شوند [۳۴]. اتصالات محکم شکل گرفته بین سلول‌های سرتولی که با تجمع رشته‌های اکتین رتیکولوم اندوپلاسمیک مرتبط است اجتماعات اکتوپلاسمیک نامیده می‌شود که بصورت سد خونی بیضه‌ای در پایه اپیتلیوم همانند یک فیلتر عمل می‌کند [۳۸]. سلول‌های سرتولی برای فراهم آوردن محیطی منحصرفرد جهت تقسیم و توسعه سلول‌های زایا و تمایز آن‌ها به اسپرم مسئول هستند [۳۴]. بطور دقیق تر در مورد سد خونی بیضه‌ای می‌توان گفت که غشای جانبی سلول‌های مجاور دارای تورفتگی‌های متعدد می‌باشند و در نزدیک قاعده توسط اتصالات محکم به یکدیگر چسبیده‌اند. این امر باعث گردیده که لوله اسپرم ساز به دو قسمت قاعده‌ای (Basal Compartment) و جنب حفره‌ای (Adluminal Compartment) تقسیم گردد. قسمت قاعده‌ای سلول‌های اسپرماتوگونیا را در خود جای داده که مواد غذایی مورد نیاز خود را از خون دریافت می‌دارند. در صورتی که در قسمت جنب حفره‌ای سلول‌های اسپرماتوژنیک تکامل و تمایز می‌یابند و به وسیله سلول‌های سرتولی و اتصال محکم بین آن‌ها از قسمت قاعده‌ای جدا شده‌اند. این نحوه قرارگیری سلول‌های سرتولی سلول‌های در حال تکامل اسپرماتوژنیک را از دسترس عوامل ایمنی و خونی دور نگه می‌دارد [۱].

سلول‌های رده سرتولی دو نقش کارکردی مجزا دارند، اول: آن‌ها درشکل‌گیری و توسعه بیضه درزندگی جنینی و اوایل پس ازتولد ایفای نقش می‌کنند و دوم: در بعد از بلوغ در طول روند اسپرماتوژنز از سلول‌های‌زایا حمایت می‌کنند و شرایط محیطی لازم برای رشد و نگهداری آن‌ها را فراهم می‌کنند. عوض شدن نقش توسعه‌ای سلول‌های سرتولی یه نقش بالغ شدن شامل تمایز نهایی سلول‌های سرتولی است و اینکه با از دست دادن توانایی تکثیر و تغییر آن به عملکردهای متنوع لازم جهت حمایت از اسپرماتوژنز مشخص می‌شود و این فرآیند همان بلوغ سلول‌های سرتولی است.

هنوز مشخص نیست که تا چه حد فعالیت‌های سلول‌های سرتولی بالغ در زمان رشد آن‌ها در زمان قبل از تولد برنامه‌ریزی شده‌است، اما این که تکثیر این سلول‌ها در زمان قبل از تولد یک امر کلیدی در رابطه با