بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم – گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری

عنوان:

اثر ویتامین E روی پارامترهای اسپرمی رت های بالغ تیمار شده با سدیم ارسنیت

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر شهربانو عریان

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر حمید رضا مومنی

دانشجو:

نجمه اسکندری

بهمن ۱۳۸۹

تقدیر و تشکر

"ستایشگر معلمی، هستم که به من اندیشیدن را آموخت نه اندیشه ها را"

در مسیر انجام این پژوهش و گذر روزهای به یادماندنی شاگردی استاد عزیز و شایسته ام،

سرکار خانم دکتر شهربانو عریان

مجموعه ای از برترین ارزش های علمی و اخلاقی را فرا گرفتم که به پاس تمامی آموخته هایم تا همیشه قدردان و سپاسگزار ایشان خواهم بود. باشد که در پناه الطاف باری تعالی روزگار را به سلامتی و سربلندی سپری نمایند.

از زحمات و تلاش های بی دریغ استاد بزرگوارم،

جناب آقای دکتر حمیدرضا مومنی

که افتخار شاگردی در محضر پربار علمی و اخلاقی ایشان تا آخر عمر برای اینجانب مایه ی سرافرازی خواهد بود، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم و امیدوارم سلامتی و موفقیت چاشنی همیشگی زندگیشان باشد.

در این مسیر فرصت بهره مندی از محضر استاد ارزشمند **جناب آقای دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی** ریاست محترم دانشگاه اراک را یافتم و به واسطه ی پشتیبانی و حمایت های همیشگی، به حق از ایشان سپاسگزارم.

همچنین از سرکار خانم محمودی و جناب آقای فراهانی، کارشناسان محترم آزمایشگاه تشکرم.

و نهایت سپاسم را تقدیم می دارم به همراهان همیشگی ام، خانواده ی عزیز و دوست داشتنی ام.

"چکیده"

اثر ویتامین E روی پارامترهای اسپرمی رت های بالغ تیمار شده با سدیم ارسنیت

ارسنیک از فراوان ترین و بالقوه ترین عناصر سرطان زا است. سدیم ارسنیت قادر است با القای استرس اکسیداتیو ناهنجاریهای تولید مثلی در جنس نر بوجود آورد. ویتامین E آنتی اکسیدانت اصلی در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت سلول می باشد و اصلی ترین نقش زیستی آن حفاظت از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAs: Polyunsaturated Fatty Acids) و دیگر ترکیبات غشای سلول و لیپوپروتئین های کم چگال در برابر اکسیداسیون توسط رادیکال های آزاد است.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات زیان آور سدیم ارسنیت روی پارامترهای اسپرمی و بافت بیضه رت های بالغ و تاثیر ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی بر روی این تغییرات بود.

رت ها به ۴ گروه (n=۶) کنترل، ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day)، سدیم ارسنیت (۸ mg/kg/day) و سدیم ارسنیت+ ویتامین E تقسیم شدند. تیمار به صورت خوراکی و توسط گاواژ، روزانه به مدت ۸ هفته صورت گرفت. پس از پایان دوره تیمار و تعیین وزن بدن رت ها، ناحیه دمی اپیدیدیم چپ جهت آنالیز تعداد، قابلیت حیات، قابلیت تحرک و ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم و بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی های ویژه هسته و همین طور بیضه چپ به منظور تعیین وزن، بررسی ماده ژنتیکی سلول های اسپرماتوگونی، بررسی وقوع اپوپتوزیس در بافت بیضه، بررسی ساختار بافت بیضه از نظر مورفولوژیکی و اندازه گیری قطر لوله سمی نیفر، قطر لومن و قطر هسته اسپرماتوگونی، خارج و بعد از طی مراحل آماده سازی مورد بررسی قرار گرفت. داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز و تفاوت میانگین ها در حد P <۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج نشان دادکه میانگین وزن بدن و بیضه رت ها بین هیچ یک از گروه های چهارگانه اختلاف معنی داری نداشت (p>۰/۰۵). با این حال میانگین تعداد، قابلیت حیات، قابلیت تحرک، مورفولوژی طبیعی اسپرم و قطر لوله های سمی نیفر در گروه سدیم ارسنیت نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱). میانگین قطر لومن لوله های سمی نیفر در گروه سدیم ارسنیت نسبت به کنترل افزایش معنی داری داشت (p<۰/۰۰۱). در این مطالعه سدیم ارسنیت فاقد اثر روی دناتوره شدن DNA ی اسپرم، جایگزینی هیستون با پروتامین در هسته طی فرایند بلوغ اسپرم و میانگین قطر هسته اسپرماتوگونی ها بود (p>۰/۰۵). ویتامین E در گروه سدیم ارسنیت + ویتامین E توانست اثرات مخرب سدیم ارسنیت را در خصوص میانگین تعداد، قابلیت حیات، قابلیت تحرک، مورفولوژی طبیعی اسپرم، قطر لوله های سمی نیفر و قطر لومن لوله ها در مقایسه با گروه سدیم ارسنیت به طور معنی داری جبران نماید. علاوه بر آن تیمار رت ها با ویتامین E به تنهایی موجب افزایش معنی داری در قابلیت تحرک، قابلیت حیات اسپرم، قطر لوله های سمی نیفر و کاهش قطر لومن لوله ها در این گروه نسبت به سه گروه کنترل، سدیم ارسنیت و سدیم ارسنیت + ویتامین E شد.

نتیجه قابل ملاحظه در این مطالعه این است که ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی توانست اثرات زیان آور سدیم ارسنیت روی اسپرم و بافت بیضه رت بالغ را تا حدودی جبران نماید.

کلمات کلیدی: سدیم ارسنیت، ویتامین E، پارامترهای اسپرمی، بیضه، رت بالغ

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- تولید مثل جنسی در پستانداران و اهمیت بیضه ها ۲
۱-۲- دستگاه تولید مثل نر در پستانداران ۲
۱-۲-۱- ساختار فیزیولوژیک اندام های جنسی نر ۲
۱-۲-۲- اسپرماتوژنز ۵
۱-۲-۳- بلوغ اسپرم در اپیدیدیم ۸
۱-۲-۴- عوامل هورمونی محرک اسپرماتوژنز ۸
۱-۳- ارسنیک ۹
۱-۳-۱- تاریخچه ۹
۱-۳-۲- تاثیر ارسنیک بر سیستم تولید مثل ۱۰
۱-۳-۳- متابولیسم ارسنیک در انسان و رت ۱۱
۱-۳-۴- مکانیسم عمل ارسنیک ۱۲
۱-۳-۵- نگاهی اجمالی به تاریخچه کاربردهای درمانی ارسنیک ۱۵
۱-۳-۶- مرگ سلولی ۱۶
۱-۳-۶-۱- خصوصیات مورفولوژیکی اپوپتوزیس ۱۶
۱-۳-۶-۲- خصوصیات مورفولوژیکی نکروزیس ۱۶
۱-۳-۶-۳- مکانیسم اپوپتوزیس ۱۸
۱-۳-۷- اپوپتوزیس و ارسنیک ۱۹
۱-۳-۸- تشخیص مرگ سلولی ۲۰
۱-۳-۸-۱- رنگ فلورسنت هوخست(Hoechst) ۲۰

۱-۳-۸-۲- تکنیک تانل (TUNEL) ۲۱
۱-۴- ویتامین E ۲۲
۱-۴-۱- تاریخچه ۲۲
۱-۴-۲- انواع ویتامین E ۲۲
۱-۴-۳- نقش زیستی ویتامین E ۲۳
۱-۴-۴- منابع ویتامین E ۲۵
۱-۴-۵- مکانیسم عمل ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت ۲۵
۱-۴-۶- اپوپتوزیس و ویتامین E ۲۶
۱-۵- مروری بر مطالعات انجام شده ۲۷
۱-۵-۱- اثر ارسنیک بر تولید مثل جنس نر ۲۷
۱-۵-۲- اثر ویتامین E بر تولید مثل جنس نر ۳۰
۱-۵-۳- نقش ویتامین E در جلوگیری از آسیب های ایجاد شده در بیضه توسط آلاینده های زیست محیطی ۳۱
۱-۵-۴- نقش ویتامین E در جلوگیری از آسیب های ایجاد شده در بیضه توسط سدیم ارسنیت ۳۵
۱-۶- هدف از مطالعه ۳۵

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- حیوانات ۳۷
۲-۲- روش تیمار ۳۷
۲-۳- طول مدت تیمار ۳۸
۲-۴- تشریح رت ها و برداشتن بیضه چپ ۳۸
۲-۵- روش آماده کردن نمونه جهت بررسی پارامترهای اسپرمی ۳۹
۲-۶- بررسی تعداد اسپرم (Sperm count) ۳۹
۲-۷- بررسی قابلیت حیات اسپرم (Sperm viability) ۳۹

۲-۸- بررسی قابلیت تحرک اسپرم (Sperm motility) ۴۰
۲-۹- بررسی ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم ۴۰
۲-۱۰- بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی های ویژه هسته ۴۰
۲-۱۰-۱- رنگ آمیزی اکریدین اورانژ (Acridine orange) ۴۱
۲-۱۰-۲- رنگ آمیزی آنیلین بلو (Anilin blue) ۴۱
۲-۱۱- آماده سازی نمونه جهت بررسی بافت بیضه ۴۲
۲-۱۲- رنگ آمیزی فلورسنت مقاطع بافتی با هوخست (Hoechst) ۴۳
۲-۱۳- بررسی وقوع اپوپتوزیس در بافت بیضه به روش نشان دار کردن با آنزیم باند شونده به DNA (تکنیک تانل TUNEL) ۴۳
۲-۱۴- رنگ آمیزی مقاطع بافتی به روش هایدن هاین آزان (Heiden Hain Azan) به منظور بررسی ساختار بافت بیضه از نظر مورفولوژیکی ۴۳
۲-۱۵- اندازه گیری قطر لوله سمی نیفر- قطر لومن و قطر هسته اسپرماتوگونی با استفاده از نرم افزار موتیک (Motic) ۴۴
۲-۱۶- روش آماری آنالیز داده ها ۴۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱- وزن بدن و بیضه ۴۷
۳-۲- آنالیز پارامترهای اسپرمی ۴۷
۳-۲-۱- تعداد اسپرم ۴۷
۳-۲-۲- قابلیت حیات اسپرم ۴۸
۳-۲-۳- ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم ۴۸
۳-۲-۴- قابلیت تحرک اسپرم ۴۹
۳-۲-۵- بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی های ویژه هسته ۵۰
۳-۲-۵-۱- تغییر در ساختمان دو رشته ای DNA (رنگ آمیزی اکریدین اورانژ) ۵۰

۳-۲-۵-۲- تغییرات هیستون طی فرایند بلوغ اسپرم (رنگ آمیزی آنیلین بلو) ۵۱
۳-۳- آنالیز و بررسی تغییرات ایجاد شده در بافت بیضه ۵۲
۳-۳-۱- بررسی وقوع اپوپتوزیس ۵۲
۳-۳-۱-۱- بررسی ماده ژنتیکی سلول های اسپرماتوگونی (رنگ آمیزی فلورسنت مقاطع بافتی با هوخست)..... ۵۲
۳-۳-۱-۲- بررسی وقوع اپوپتوزیس در بافت بیضه به روش نشان دار کردن با آنزیم باند شونده به DNA (تکنیک تانل TUNEL) ۵۳
۳-۳-۲- تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه (رنگ آمیزی هایدن هاین آزان)..... ۵۳
۳-۳-۳- قطر لوله های سمی نیفر و قطر لومن ۵۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- وزن رت ۵۷
۴-۲- وزن بیضه ۵۸
۴-۳- تعداد اسپرم ۵۸
۴-۴- قابلیت تحرک و حیات اسپرم ۶۱
۴-۵- ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم..... ۶۳
۴-۶- تغییر در ساختمان دو رشته ای DNA (رنگ آمیزی اکریدین اورانژ) ۶۵
۴-۷- تغییرات هیستون طی فرایند بلوغ اسپرم (رنگ آمیزی آنیلین بلو)..... ۶۵
۴-۸- بررسی وقوع اپوپتوزیس در سلول های اسپرماتوگونی بیضه از طریق رنگ آمیزی با هوخست و تانل..... ۶۵
۴-۹- تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه به همراه تغییرات قطر لوله های سمی نیفر و قطر لومن ۶۶
۴-۱۰- نتیجه گیری ۷۱
۴-۱۱- پیشنهادات برای تحقیقات آینده ۷۲

فصل پنجم: ضمیمه

۵-۱- روش تهیه محلول فیکساتیو MDF (Modified Davidson's Fluid) ۷۴

۵-۲- روش تهیه محلول های رنگ آمیزی هایدن هاین آزان (Heiden Hain Azan).... ۷۴

۵-۳- روش تهیه محلول نرمال سالین ۷۵

۵-۴- روش تهیه فسفات بافر سالین (PBS)..... ۷۵

۵-۵- روش تهیه محلول های لازم جهت رنگ آمیزی اکریدین اورانژ ۷۵

۵-۶- روش تهیه محلول های لازم جهت رنگ آمیزی آنیلین بلو ۷۶

جداول ضمیمه

جدول ۵-۱- وزن رت ها قبل و بعد دوره تیمار و وزن بیضه رت ها ۷۷

جدول ۵-۲- پارامترهای اسپرم (تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم)..... ۷۸

جدول ۵-۳- پارامترهای اسپرم (قابلیت تحرک اسپرم) ۷۹

جدول ۵-۴- قطر لوله سمی نیفر، لومن و هسته اسپرماتوگونی ها..... ۸۰

فهرست منابع..... ۸۲

خلاصه انگلیسی..... ۹۶

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- تفاوت های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی اپوپتوزیس و نکروزیس ۱۸
جدول ۳-۱- مقایسه میانگین وزن بدن و بیضه رت در گروه های مختلف ۴۷
جدول ۳-۲- مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی (تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم) در گروه های مختلف ۴۹
جدول ۳-۳- مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم در گروه های مختلف ۵۰
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین قطر هسته اسپرماتوگونی ها در گروه های مختلف ۵۲
جدول ۳-۵- مقایسه میانگین قطر لوله های سمی نیفر و قطر لومن در گروه های مختلف.. ۵۵
جداول ضمیمه
جدول ۵-۱- وزن رت ها قبل و بعد دوره تیمار و وزن بیضه رت ها ۷۷
جدول ۵-۲- پارامترهای اسپرم (تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم)..... ۷۸
جدول ۵-۳- پارامترهای اسپرم (قابلیت تحرک اسپرم) ۷۹
جدول ۵-۴- قطر لوله سمی نیفر، لومن و هسته اسپرماتوگونی ها..... ۸۰

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱- مقطع طولی بیضه با پوشش های اطراف آن، اپیدیدیم و مجرای آوران ۳
شکل ۱-۲- اپیدیدیم و مجرای دفران ۴
شکل ۱-۳- Tunica vaginalis ۵
شکل ۱-۴- مراحل اسپرماتوژنز در توبول های سمی نیفر پستانداران ۷
شکل ۱-۵- اسپرماتوزوئید رت ۸
شکل ۱-۶- تفاوت های مورفولوژیک اپوپتوزیس و نکروزیس ۱۷
شکل ۱-۷- مکانیسم اپوپتوزیس ۱۹
شکل ۱-۸- اتصال نوکلئوتید نشاندار شده به انتهای ۳´-OH نواحی شکسته شده DNA ... ۲۱
شکل ۱-۹- ساختار شیمیایی اعضای خانواده ۸ همولوگی ویتامین E ۲۳
شکل ۱-۱۰- مکانیسم عمل ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت ۲۶
شکل ۲-۱- تیمار دهانی رت از طریق گاواژ ۳۷
شکل ۲-۲- تشریح رت و برداشتن بیضه ۳۹
شکل ۲-۳- سنجش قابلیت حیات اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین- نکروزین ۴۰
شکل ۲-۴- دستگاه Cryostat ۴۲
شکل ۲-۵- میکروسکوپ مدل Olympus BX41TE مجهز به دوربین عکس برداری .. ۴۴
شکل ۳-۱- برخی ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم درگروه تیمار با سدیم ارسنیت..... ۴۸
شکل ۳-۲- اسپرم های رنگ آمیزی شده با اکریدین اورانژ ۵۱
شکل ۳-۳- اسپرم های رنگ آمیزی شده با آنیلین بلو ۵۱
شکل ۳-۴- رنگ فلورسنت مقاطع بافتی با هوخست و بررسی سلول های اسپرماتوگونی..... ۵۲
شکل ۳-۵- مقطع بافت بیضه رنگ آمیزی شده توسط تکنیک تانل ۵۳
شکل ۳-۶- تصاویر میکروسکوپی از لوله های سمی نیفر بافت بیضه رت بالغ در گروه های مختلف (رنگ آمیزی هایدن هاین آزان)..... ۵۴

فصل اول:

مقدمه

۱-۱- تولید مثل جنسی در پستانداران و اهمیت بیضه ها

گامت ها و سلولهای پیش ساز آنها جمعا سلولهای جنسی نامیده می شوند و برای عمل تولید مثل تخصیص داده شده اند. دیگر سلولهای بدن همگی سلولهای سوماتیک نام دارند. این جداسازی سلولهای سوماتیک و جنسی اغلب یکی از تمایزهای اولیه ای است که در حین تکوین جانور رخ می دهد. سلولهای جنسی سرانجام به گنادها مهاجرت کرده و به گامت تمایز می یابند. تکوین گامت ها گامتوژنزیس (gametogenesis) نامیده می شود و معمولا این فرایند تا وقتی موجود زنده به طور فیزیکی بالغ نشده کامل نمی گردد. پس از بلوغ و در تولید مثل جنسی، گامت ها آزاد شده و برای آغاز حیات یک جنین تازه در لقاح شرکت می کنند (Gilbert 2000) .

گامت نر اسپرم یا اسپرماتوزوئید نام دارد. نقش نرها در تولید مثل نقش زودگذری است (ماده ها اغلب سرمایه گذاری بیشتری در ایجاد فرزند انجام می دهند ولی به هرحال اسپرم نیمی از ژنهای لازم برای تولید یک فرد کامل را به همراه می آورد تا پس از امتزاج دو گامت هاپلوئید یک تخم دیپلوئید حاصل شود). از نقطه نظر بارداری نرها نه تنها به تولید اسپرم بلکه به تولید مایع سمنی (یعنی اجزاء مایع semen به جز اسپرم ها) نیز احتیاج دارند که برای تغذیه اسپرم و کمک به زنده ماندن آن در واژن ضروری است.

در انسان هر انزال معمولی به طور میانگین شامل ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلیون اسپرم می باشد. شاید این مقدار اسپرم بسیار زیاد به نظر برسد اما تنها حدود ۱۵۰ عدد از آنها به تخمک می رسند. آنزیمهای سر اسپرم برای تخریب زوناپلاسیدا و نفوذ به آن ضروری هستند و بعید است که یک اسپرم به تنهایی بتواند این کار را انجام دهد پس کاملا واضح است که مقادیر بالای اسپرم اهمیت زیادی دارد و برای مقادیرکم، ایجاد بارداری سخت تر می گردد (Lazaroff 2004).

با توجه به توضیحات داده شده اهمیت بیضه در تولید تعداد زیاد اسپرم و همچنین اهمیت ضمایم دستگاه تناسلی در کمک به تغذیه و زنده ماندن اسپرم می باشد تا عمل لقاح با موفقیت صورت گیرد و در نهایت به بقای نسل موجود زنده بیانجامد.

۱-۲- دستگاه تولید مثل نر در پستانداران

۱-۲-۱- ساختار فیزیولوژیک اندام های جنسی نر

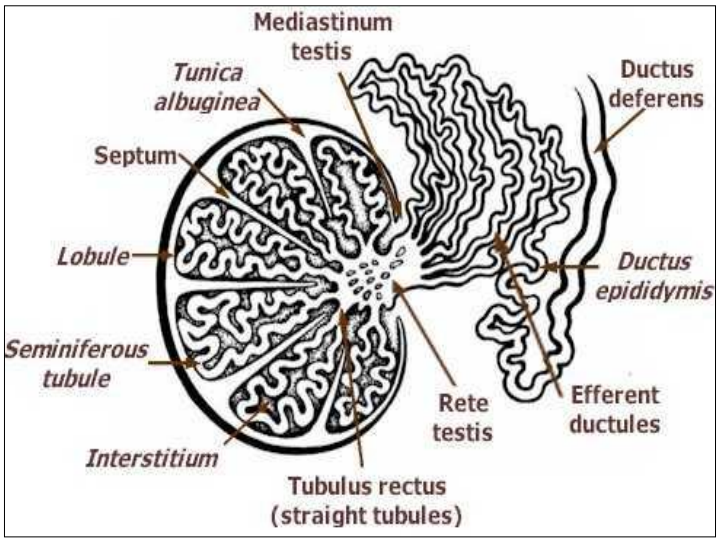
دستگاه تولید مثل نر متشکل از یک جفت بیضه testes (مفرد : testis) ، مجاری ، غدد ضمیمه و آلت تناسلی است که در اینجا به شرح بخشی از آن (بیضه و اپیدیدیم) می پردازیم.

بیضه ها یک جفت اندام غده ای (یا ترشحی) و آنالوگ تخمدان ها هستند که به عنوان غدد برون ریز برای تولید اسپرماتوزوئیدها (گامت نر) و غدد درون ریز به منظور تولید هورمونهای جنسی سازمان دهی شده اند. اطراف بیضه را کپسول ضخیمی از جنس بافت همبند متراکم به نام سفید پرده (Tunica albuginea) احاطه می کند. سطح داخلی کپسول را بافت همبند پر عروقی پوشانده که به طبقه عروقی (Tranica vasculosa) موسوم است.

در حاشیه خلفی بیضه ، تونیکا آلبوژینا ضخیم شده و جسم هیگمور (Corpus highmori) یا میان پرده بیضه (Mediastinum testis) نامیده می شود . این ناحیه به منزله ناف بیضه است که از آن اعصاب ، رگ ها و مجرای وابران بیضه عبور می نماید.

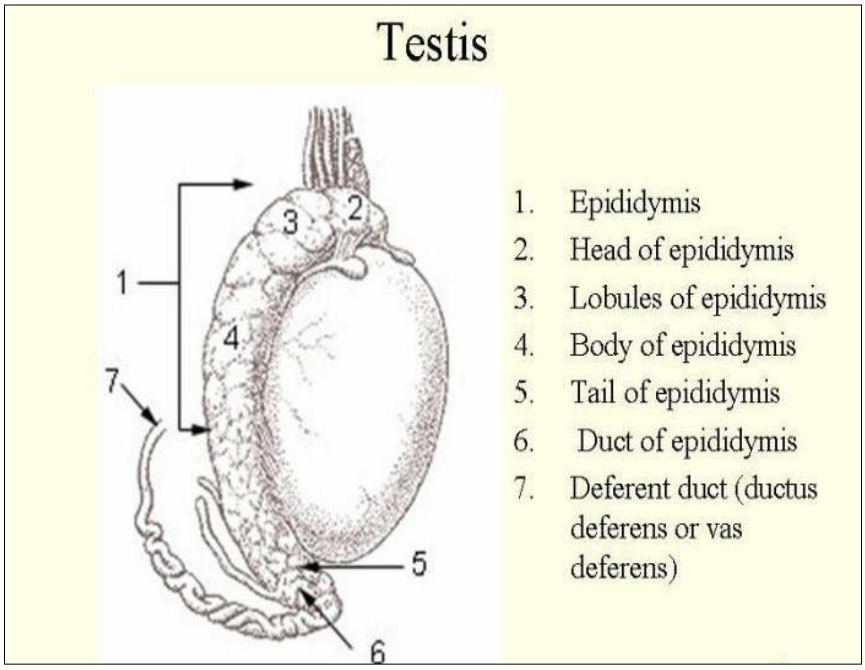
از میان پرده بیضه ، پرده های ظریفی به نام تیغه های بیضه (Septula testis) اشعه وار جدا شده و به داخل بیضه امتداد پیدا می کنند با این حال به تونیکا آلبوژینای مقابل متصل نمی گردند. این تیغه ها بیضه را به لوبول های هرمی شکل تقسیم می کنند که در آن راس هرم ها متوجه ناف می باشد. داخل هر لوبول لوله های پیچ و خم داری به نام لوله های سمی نیفر (Seminifercus tubules) دیده می شود (Krstic 2004).

پیچ و تاب این لوله ها در راس لوبول کمتر شده و برای تشکیل مجرای بزرگ تری به نام Tubuli recti به یکدیگر می پیوندند. این لوله ها وارد ضخامت میان پرده ی بیضه شده و درآنجا شبکه بسته ای از لوله های به هم پیوسته به نام شبکه ی بیضه (Rete testis) را تشکیل می دهند. شبکه ی بیضه از طریق مجرای وابران (Ductuli efferentes) به اپیدیدیم متصل می گردد و از این طریق اسپرم تولید شده، از لوله های سمی نیفر به اپیدیدیم انتقال می یابد (Allen , et al 2004) (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: مقطع طولی بیضه با پوشش های اطراف آن و اپیدیدیم و مسیری که اسپرم ها تا انتهای مجرای آوران (deferens ductus) طی می کنند (Velsundar 2008).

اسپرم ها در اپیدیدیم تغلیظ شده و بالغ و متحرک می گردند. اپیدیدیم یک لوله پیچ خورده گاما شکل است و شامل یک سر (caput) یک تنه (corpus) و یک دم (Cauda) می باشد که توسط مجرای ناقل یا مجرای آوران (vas deferens یا ducuts deferens) ادامه می یابد. اندام هلالی شکل اپیدیدیم در سطوح عقبی و فوقانی بیضه قرار گرفته است (شکل ۱-۲).

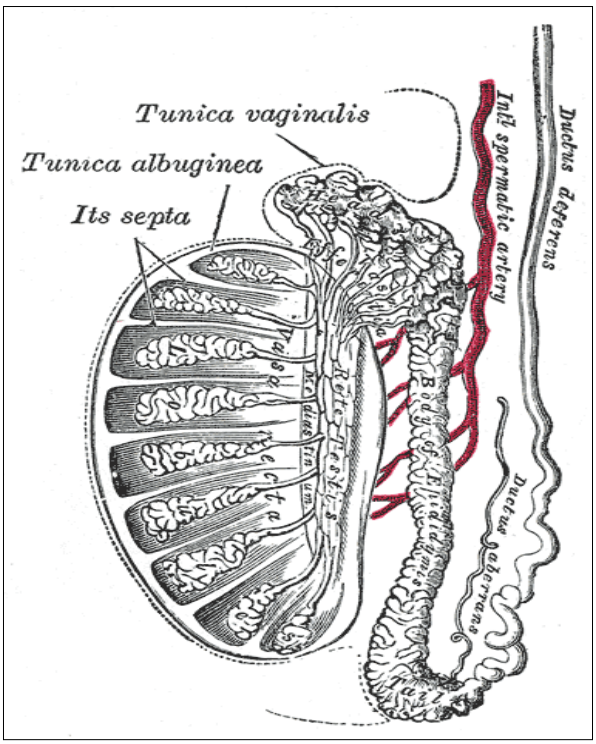


شکل ۱-۲ : اپیدیدیم و مجرای دفران (Kahn 2007).

بیضه و اپیدیدیم در یک کیسه پوستی عضلانی به نام اسکروتوم (Scrotum) قرار گرفته اند که عضله صاف این کیسه دارتوس (Dartus) نامیده می شود. اسکروتوم به هنگام سرما منقبض و جمع گشته و در موقع گرما سست و آویزان می شود و به این وسیله در تنظیم درجه حرارت بیضه (Thermo-regulating function) دخالت می نماید. اهمیت این عمل بدان جهت است که اسپرم زایی طبیعی در بیضه فقط زمانی رخ می دهد که دمای بیضه از حفره شکمی پایینتر باشد (تقریبا ۳ درجه سانتیگراد) زیرا سلولهای جنسی نسبت به ازدیاد حرارت درونی بدن حساس و آسیب پذیرند (Snell 2003).

بیضه در مرحله جنینی در پشت پرده صفاق و مجاور دیوار خلفی حفره شکمی رشد می کند و بعدا در حالیکه کیسه دولایه ای از پرده ی صفاق آن را احاطه کرده به اسکروتوم منتقل می گردد. این کیسه صفاقی به Tunica vaginalis موسوم است که لایه احشایی آن (epiorchium) به سفید پرده بیضه و لایه جداری آن (periorchium) سطح درونی اسکروتوم را می پوشاند (شکل ۱-۳). فضای فضای بین دولایه Tunica

vaginalis، Vaginal cavity نامیده می شود که حاوی مقدار اندکی مایع به منظور حرکت آزادانه بیضه در اسکروتوم می باشد (Krstic , 2004).



شکل ۱-۳: Tunica vaginalis (Velsundar 2008).

بین لوله ها در بیضه جایگاه سلول های واجد گرانول های لیپیدی، معروف به سلول های بینابینی لیدیگ است، که هورمون تستوسترون را به داخل جریان خون ترشح می کنند. دیواره لوله های سمی نیفر توسط سلول های زایشی اولیه و سلول های سرتولی (سلول های بزرگ، پیچیده و حاوی گلیکوژن که از غشای پایه ای لوله تا لومن کشیده شده اند)، مفروش می شود (گانونگ ۲۰۰۱).

۱-۲-۲- اسپرماتوژنز

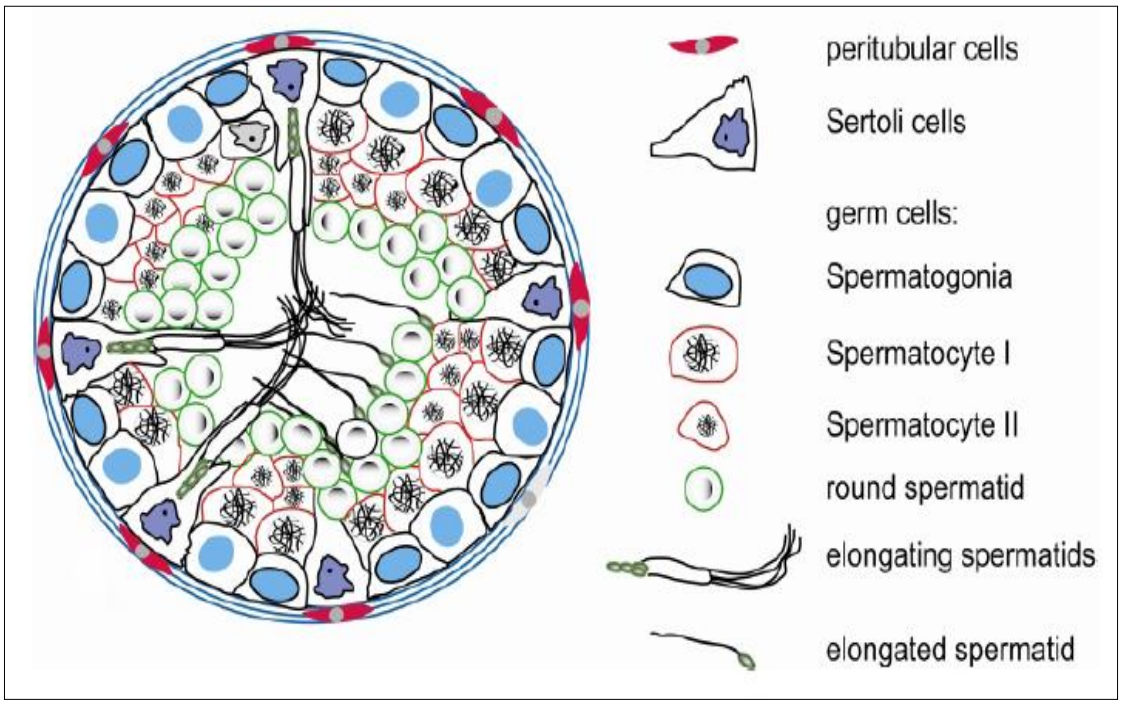
اسپرماتوژنز به فرایند تولید گامت نر در بیضه ها اطلاق می شود. به طور خلاصه اسپرماتوژنز وقایعی است که طی آن اسپرماتوگونی های اولیه به اسپرماتوزوئیدهای بالغ تخصص یافته درون بیضه تبدیل می گردند. سلول های زایشی اولیه (primordial germ cells) را می توان در مراحل ابتدایی اونتوژنز به علت تفاوت های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی موجود بین سلول های زایشی و سوماتیک تشخیص داد. در موش سلول های زایشی اولیه در کیسه زرده واقع شده و تقریبا بعد از شکل گیری دیگر بافت های اصلی جنین، شروع به مهاجرت به داخل منطقه شیار تناسلی یا برآمدگی تناسلی (genital ridge) می کنند (McLaren 2003). سلول های

زایشی بعد از مهاجرت به داخل گنادهای تمایز نیافته به پیش سازهای سلول های زایشی نر یا ماده تبدیل می شوند که این امر بستگی به تمایز جنسی گناد دارد (Capel 2000).

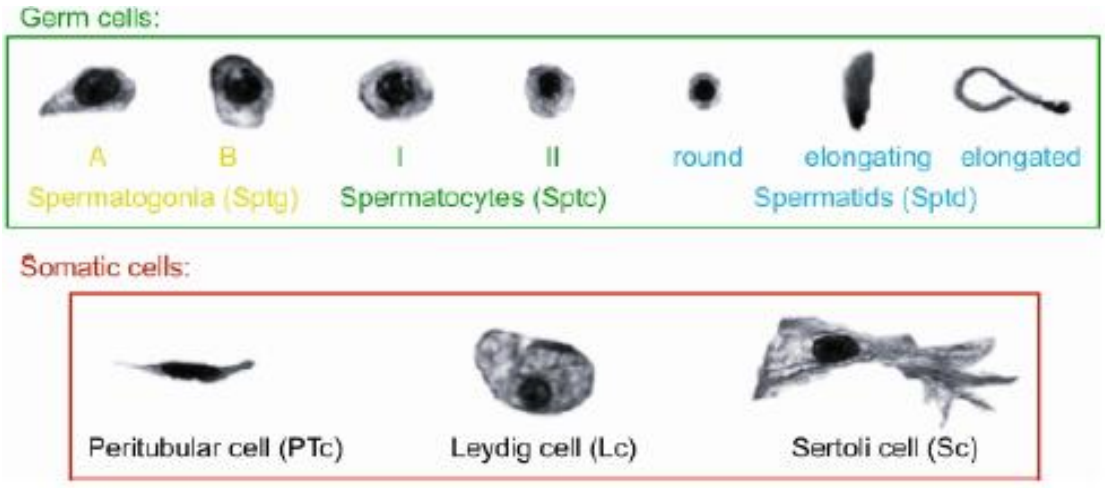
اسپرماتوگونی ها از سلول های زایشی اولیه (PGCs) مشتق می شوند که بعد از ورود به بیضه به گونوسیت ها توسعه می یابند. در بیضه سلول های زایشی در توبول هایی که بخش داخلی آنها توسط اپیتلیوم سمی نیفر پوشانده شده و محتوی سلول های سرتولی سوماتیک هستند (این سلول ها تغذیه و پشتیبانی سلول های زایشی را به عهده دارند) قرار گرفته اند. قبل از اینکه گامت بیضه را ترک کند باید چندین مرحله بلوغ را طی کند این مراحل شامل: تکثیر میتوزی و افزایش سلول های اسپرماتوگونی بنیادی (SSCs)، نوترکیبی (recombination) میوزی مواد ژنتیکی و بلوغ بیضه ای اسپرماتوزوئیدها می باشد (Ehmcke et al 2006).

مراحل تکامل سلول های زایشی مشخص شده که رویداد اصلی، هاپلوئیدسازی ژنوم (تقسیم میوز) می باشد. در تکامل کامل بیضه پستانداران اکثریت سلول های تمایز نیافته خط زایشی اسپرماتوگونی های نوع A و همین طور SSCs هستند که از مهم ترین سلول ها برای اسپرماتوژنز می باشند زیرا وظیفه آنها خود تجدیدی (self renewal) SSCs و اسپرماتوگونی های نوع B است که تمایز یافته و به طور میتوزی تقسیم می شوند به این ترتیب اسپرماتوگونی نوع B تمایز یافته به اسپرماتوسیت اولیه تکامل یافته و تحت میوز با کاهش محتوای ژنومیک باعث ایجاد اسپرماتوسیت های ثانویه می شوند. مرحله کاهش ژنومیک بعدی منجر به تشکیل اسپرماتیدهای هاپلوئید می گردد و در ادامه اسپرمیوژنز رخ می دهد (de Rooji and Russell 2000).

طی اسپرمیوژنز، شکل و حجم اسپرماتیدها به شدت دستخوش تغییر می شود. در این فرایند محتوی سیتوپلاسمی کاهش یافته و DNA متراکم می گردد. اسپرماتیدها تشکیل آکروزم (ارگانلی که وجود آن برای برهم کنش با غشای تخم طی فرایند لقاح ضروری است) می دهند. علاوه بر این شکل سلول های زایشی از حالت نسبتا مدور به سلول های دوکی شکل کوچک (دراز و باریک) تغییر می یابد. بعد از طویل شدن اسپرماتیدها، فرم تیپیکال اسپرماتوزوئیدها حاصل می گردد که شامل: یک سر حاوی هسته، آکروزوم، یک قسمت میانی که انرژی متابولیکی مورد نیاز را توسط میتوکندری ها فراهم می کند و یک تاژک برای حرکت رو به جلو در سیستم تناسلی جنس ماده می باشد. در بین پستانداران فرایندهای پایه اسپرماتوژنز که منجر به تولید گامت نر می شوند بسیار مشابه است. این فرایندها نیازمند سازماندهی و تنظیم ژنومیک و اندوکرینی پیچیده ای می باشد و توسط انواع سلول های سوماتیک، سلول های سرتولی در توبول ها، سلول های میوئید پری توبولار و سلول های لیدیگ موجود در حفره بیضه ای پشتیبانی و میانجگری می گردد (شکل ۱-۴) (Wistuba et al. 2007).

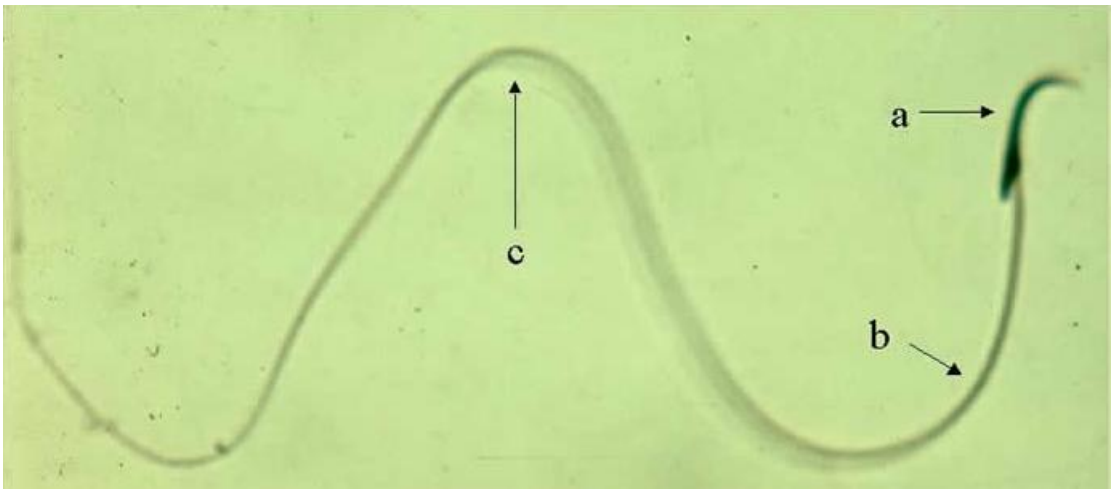


شکل ۱-۴ : مراحل اسپرماتوژنز در توبول های سمی نیفر پستانداران (Wistuba et al. 2007).



سلول های زایشی در مراحل مختلف و انواع سلول های سوماتیک بیضه ای در پستانداران (Wistuba et al. 2007).

سر اسپرم رت تقریبا ۲/۵ µm طول دارد و قلاب مانند (hook) است. سر محتوی یک هسته متراکم و نوکی با تراکم کمتر (آکروزوم) می باشد. قطعه میانی شامل سانتریول ها و مارپیچ مواد میتوکندریایی است. دم از یک فیلامنت محوری طویل تشکیل شده که در اسپرماتوزوئید بالغ برای یک دوره کوتاه مرتعش می شود (شکل ۱-۵) (IRDG , 2000).



شکل ۱-۵ : اسپرماتوزوئید رت. a: سر قلاب مانند – b: قطعه میانی – c: دم (Smith 2006).

۱-۲-۳- بلوغ اسپرم در اپیدیدیم

اسپرماتوزوئیدهای پستانداران تغییراتی را در طول گذر از اپیدیدیم متحمل می گردند که مجموعا بلوغ اسپرم نامیده می شود. بعد از اسپرماتوژنز، اسپرماتوزوئیدهای غیرمتحرک و نابالغ از بیضه آزاد شده و قابلیت تحرک پیشرونده، توانایی بارورسازی تخم ها و در نتیجه انتقال اطلاعات ژنومیک پدری به نسل بعد را در طی عبور از مجرای طویل و پیچ خورده اپیدیدیم بدست می آورند(Rajalakshmi 1985).

تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکردی در سلول اسپرم در طول گردش اپیدیدیمی گزارش شده است. یکی از این فرایندها، اجتماع اسپرم (sperm association) بوده که در چندین پستاندار گزارش شده است. اسپرم موش و رت درون اپیدیدیم دمی به هم پیوسته و تشکیل Rosette را می دهند. این ساختارها توسط اتصال سر اسپرم های زنده ایجاد شده و به حالت ساکن(خاموش) ذخیره می شوند. این پدیده در انتهای گذر اپیدیدیمی دیده شده و در مناطق ابتدایی اندام رخ نمی دهد. قابل ذکر است که وقتی محتویات اپیدیدیم دمی با ایجاد سوراخ در محیط کشت مناسب در $37^{\circ}C$ آزاد می شود، اسپرم ها قابلیت تحرک پیدا کرده و تدریجا اجتماع آنها تجزیه و تفکیک می گردد (Fornes et al. 1994- Monclus et al. 2007).

۱-۲-۴- عوامل هورمونی محرک اسپرماتوژنز

در این قسمت نقش اساسی چند هورمون را در اسپرماتوژنز بیان می کنیم.

اعمال دوگانه بیضه های بالغ یعنی تولید اسپرماتوزوئیدها (باروری) و ترشح تستوسترون (مردانگی virility) هر دو وابسته به تحریک توسط گنادوتروپین های هیپوفیزی می باشند، follicle-stimulating hormone (FSH) و luteinizing hormone (LH) در پاسخ به ترشح ضربانی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین

هیپوتالاموسی (GnRH) از هیپوفیز ترشح می شوند (Gromoll et al. 2003- Luetjens et al. 2005). حضورتستوسترون برای ترویج و کمک به اسپرماتوژنز ضروری است و توسط سلول های لیدیگ بالغ در اثر تحریک LH ترشح شده و از طریق رسپتورهای اندروژن (ARs) روی سلول های سرتولی، لیدیگ و پری توبولار عمل می کند. این تستوسترون اثرات خود را بیشتر روی سلول های سوماتیک اعمال می کند تا سلول های زایشی! (Nieschlag and Behre 2004- Johnston et al. 2001).

FSH از طریق رسپتورهای سطحی جفت شده با G- پروتئین موجود روی سلول های سرتولی فعالیت می کند.با این حال FSH نقش کلیدی در رشد و نمو بیضه نابالغ دارد (به خصوص توسط کنترل تکثیر سلول های سرتولی) (Ramesh Babu et al. 2004 و Luetjens et al. 2007).

هورمون هایی مثل تستوسترون، FSH و LH سرنوشت سلول های زایشی را تحت تاثیر قرار می دهند و حذف آنها باعث آپوپتوزیس سلول های زایشی می شود. پروتئین های خانواده Bcl-2 یک مسیر سیگنال دهی را ایجاد کرده که برای هومئوستازی سلول زایشی نر ضروری است. سوماتوستاتین نیز یک پپتید تنظیمی است که در تنظیم تکثیر گامت های نر نقش دارد (Sofikitis et al. 2008).

۱-۳- ارسنیک

۱-۳-۱- تاریخچه

ارسنیک یک عنصر همه جا حاضر در محیط است که میزان آن ppm ۲- ۱/۵ در پوسته زمین می باشد. این عنصر در طبیعت به دو فرم آلی و غیرآلی یافت می شود. ارسنیک در زغال سنگ، سرب، روی، طلا و مس به فرم چندین ماده کانی، به اسامی زیر نامیده می شود: Arsenopyrite (FeAsS) ، Orpiment ($As_2 S_3$) ، Realgar (AsS)، Arsenolite ($As_2 O_3$) و Lollingite ($FeAs_2$) (IPCS 2001). به طور رایج ارسنیک در آب های زیرزمینی در ۲ فرم ارسنیت (As III)، حالت کاهیده ارسنیک غیرآلی و ارسنات (As V)، حالت اکسید شده ارسنیک غیرآلی یافت می شود (Joshi 2003). سمیت ارسنیک و ترکیبات آن بسیار متغییر است. به نظر می رسد که اشکال آلی نسبت به اشکال غیرآلی سمیت کمتری داشته باشند و در بین اشکال غیرآلی ارسنیت ها سمیت مزمن بیشتری نسبت به ارسنات ها دارند (Kingston et al. 1993).

در حال حاضر ارسنیک یکی از مهم ترین سموم محیطی جهانی محسوب می گردد. این عنصر به طور طبیعی در پوسته زمین واقع شده و می تواند منابع آب آشامیدنی را از طریق شستشو، فرسایش و استخراج معدن آلوده کند. غلظت بالای ارسنیک در آب های زیرزمینی چندین کشور شامل: آرژانتین، بنگلادش، شیلی، چین، هند، ژاپن، مکزیک، مغولستان، لهستان، تایوان، ویتنام، Hungary و بخش هایی از ایالات متحده آمریکا گزارش شده است (Ayotte et al. - Karagas et al. 2002- National Research Council 1999, 2001 2003- Ahmed et al. 2008). حبوبات و سبزیجاتی که در خاک آلوده به ارسنیک رشد می کنند یا با آب آلوده آبیاری می شوند، ارسنیک را در بافت های خود ذخیره می کنند. ارسنیک در ساخت شیشه، آفت کش ها،