

بررسی اثر الکلیسم تجربی بر ساختار بیضه و تأثیر آن بر کیفیت منی در مدل موش سوری بالغ

عباس احمدی^۱، شهرزاد شجاع زاده^۲

تاریخ دریافت 1393/10/17 تاریخ پذیرش 1393/12/15

چکیده

پیش زمینه و هدف: مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات تجویز الکل بر روی کیفیت اسپرم و پاتوژنز بافت بیضه طراحی و اجرا شد. **روش کار:** ۲۰ قطعه موش سوری نر بالغ بارور به دو گروه کنترل (نرمال سالین) و تست (الکل اتانول به میزان ۳g/kg وزن بدن) تقسیم شدند. حیوانات روزانه و به مدت ۴۵ روز الکل و نرمال سالین را به روش گاواژ دریافت کردند. بعد از ۴۵ روز تمام حیوانات بعد از بی‌هوشی و جابجایی گردن کشته شده و بافت بیضه جدا و تحت مطالعات هیستوپاتولوژیک قرار گرفت. به منظور ارزیابی پارامترهای اسپرم، نمونه‌های اسپرم از قسمت دمی اپیدیدیم جمع‌آوری شد ($P < 0.05$). **یافته‌ها:** درصد لوله‌های منی‌ساز با TDI، SPI و RI مثبت، تعداد سلول‌های لیدیک در میلی‌متر مربع از بافت بینابینی بیضه و تعداد سلول‌های سرتولی به ازای مقطع هر لوله، در گروه الکلی به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. آنالیز پارامترهای اسپرم با میکروسکوپ نوری نشان داد که تحرک، قدرت زنده‌مانی و تعداد اسپرم‌ها در گروه الکلی به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. همچنین درصد اسپرم‌هایی با DNA آسیب‌دیده، نابالغ و با مورفولوژی غیرطبیعی به طور معنی‌داری در گروه الکلی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود ($P < 0.05$). **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد اتانول پروسه اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز را دچار آسیب کرده و با کاهش کیفیت سمن و اختلال در بافت بیضه باعث ایجاد مشکلات باروری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: الکلیسم، بیضه، اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرم، موش سوری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره دوم، ص 120-112، اردیبهشت 1394

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، بخش علوم تشریح، صندوق پستی ۵۷۱۵۳-۱۱۷۷، تلفن: ۰۹۱۴۱۴۹۸۵۲۴

Email: abbasahmadi60@yahoo.com

مقدمه

سلول‌های مرده در لومن لوله‌های منی ساز افراد الکلی موردتوجه قرار گرفته است. Evenson و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که متراکم شدن کروماتین اسپرم پروسه پیچیده‌ای است که ارتباط مستقیمی با توانایی اسپرم در بارور کردن اووسیت دارد (۶). مطالعات نشان می‌دهد که مصرف اتانول موجب اختلال در عملکرد RNA پیامبر و DNA گشته (۷) و باعث اختلال در تکثیر سلول‌های جنسی در موش‌های نر بالغ می‌شود (۸). همچنین خاصیت ضداسپرماتوژنی و کاهش دهنده‌گی حرکات سلول‌های جنسی مورد تأیید قرار گرفته است (۹). کاهش تعداد اسپرم، اختلال در قابلیت حرکت اسپرم، مورفولوژی ناقص اسپرم و افزایش تعداد اسپرم ناهنجار از جمله عوارض مصرف مزمن نوشیدنی‌های الکلی است (۱۰) مانس و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که مصرف الکل سبب کاهش در تحرک و غلظت اسپرم می‌شود (۱۱)

ناباروری مشکلی است که تمام جوامع بشری با آن روبرو هستند. این مسئله پیامدهای روانی-اجتماعی فراوانی به دنبال دارد (۱) و در حدود ۸-۱۲ درصد زوجها را درگیر می‌کند (۲). در ۵۰ درصد از موارد جنس مذکر به نحوی در ناباروری دخیل است. مصرف اتانول بیشترین گستردگی را در جوامع بشری داشته و سوءمصرف آن به عنوان یک مسئله مهم موردبحث هست. مطالعات مختلف اثرات مخرب اتانول بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی را نشان دادند (۳). این ماده با تأثیر بر سلول‌های لیدیک که ترشح‌کننده هورمون تستوسترون هستند، سطح هورمون تستوسترون در خون را کاهش داده و سبب اختلال در عملکرد سیستم تناسلی و کاهش صفات ثانویه جنسی در جنس مذکر می‌شود (۴). مصرف مزمن الکل اغلب با کاهش میل و توانایی جنسی، تأخیر در انزال یا زود انزالی، ناباروری و آتروفی بیضه همراه است (۵). قطر نامنظم لوله‌های منی ساز و تعداد بالای

^۱ استادیار بخش علوم تشریح، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ فارغ التحصیل دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

داخل پتریدیش ۳ سانتی متری حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت HTF حاوی BSA(Sigma,USA) mg/ml ۴ که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور CO₂ قرار داده شده بود، گذاشته شد و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم برای خروج اسپرم‌ها، در داخل انکوباتور CO₂ قرار گرفت. بیضه نیز از بافت‌های اطراف جدا شده و برای انجام مراحل بافتی در داخل فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. بعد از گذشت نیم ساعت اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش شدند.

بررسی کیفیت اسپرم: برای شمارش اسپرم‌ها رقت ۱ به ۲۰ از اسپرم مذکور تهیه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از این محلول بر روی لام نئوبار ریخته شد. بدین ترتیب شمارش تعداد اسپرم‌ها انجام شد. برای سنجش وضعیت تحرک اسپرم یک قطره از محیط کشت حاوی اسپرم موردنظر بر روی لام نئوبار گذاشته شد و درصد تحرک اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰x بررسی گردید.

بررسی قدرت زنده مانی اسپرم: به منظور ارزیابی قدرت زنده مانی اسپرم از تست اتوزین-تگروژین استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم موردنظر، روی یک لام تمیز با ۲۰ میکرولیتر از محلول اتوزین ترکیب شده و پس از ۲۰ الی ۳۰ ثانیه ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی نگرزین به آن اضافه شد. بعد از تهیه اسمیر و خشک شدن لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰x درصد اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) و مرده (رنگ گرفته) مورد شمارش قرار گرفت.

بررسی وضعیت بلوغ هسته اسپرم: پروتئین هیستون دارای مقدار زیادی اسید آمینه لیزین می‌باشد که با رنگ‌های اسیدی همانند آنیلین‌بلو واکنش نشان می‌دهد و آبی‌رنگ می‌شود. بنابراین اسپرم‌هایی که پس از ایجاد تراکم در کروماتین خود دارای هیستون‌های اضافی باشند، با این رنگ‌آمیزی مشخص می‌شوند. پس از تهیه اسمیر از هر نمونه حیوانی و خشک شدن آن‌ها مرحله فیکس شدن نمونه‌ها توسط فیکساتیو گلو تار آل‌دئید ۳ درصد در بافر فسفات به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط آنیلین‌بلو (Sigma,USA) به مدت ۵-۷ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با آب مقطر لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰x مورد بررسی قرار گرفته و درصد اسپرم‌های بالغ (بی‌رنگ) و نابالغ (آبی‌رنگ) تعیین گردید (۱۷).

بررسی مورفولوژی اسپرم: به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم از روش رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد.

بررسی میزان آسیب DNA اسپرم: برای بررسی میزان آسیب DNA اسپرم از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده شد. این رنگ فلورسنت جهت تمایز DNA دورشته‌ای سالم از DNA

مصرف حاد و مزمن الکلی باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. تولید رادیکال‌های آزاد در میتوکندری موش ثابت شده است (۱۲). بیشتر اختلالات اسپرم در اثر وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن که با تغییرات میتوکندریایی، بلاک سلول‌های جنینی، نقصان ATP و آپوپتوز همراه است، ایجاد می‌شود (۱۳). دیواره سلولی و مولکول DNA به عنوان مهم‌ترین اهداف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم و سایر سلول‌های بدن هستند. ارتباط مستقیمی بین میزان ROS و آپوپتوز اسپرم‌ها وجود دارد. در کسانی که الکلی مصرف می‌کنند مورفولوژی غیرنرمال هسته و آپوپتوز اسپرم مورد انتظار است. پراکسیداسیون چربی موجب ناهنجاری در قطعه میانی اسپرم و از دست دادن ظرفیت آکروزوم در لقاح می‌شود (۱۴). گزارشات متعددی گویای این نکته هستند که در صورت بروز هرگونه اختلال در فرایند بلوغی داخل اپیدیدیمی اسپرم‌ها، این سلول‌ها در توان باروری دچار مشکل می‌شوند (۱۵). می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که الکلی در بلوغ داخل اپیدیدیمی اسپرم‌ها اختلال ایجاد می‌کند لذا اسپرم‌های نابالغ افزایش یافته و در نهایت توان باروری کاهش می‌یابد. مصرف اتانول در جوامع بشری به عنوان مشکلی در حال گسترش مورد توجه است لذا مطالعه حاضر باهدف بررسی اثرات مصرف الکلی بر هیستولوژی بافت بیضه و اثرات آن بر سلول‌های جنسی موش نر طراحی و اجرا شد.

روش کار

۲۰ قطعه موش سوری نر بالغ به ۲ گروه کنترل و الکلیسم تقسیم شدند. این حیوانات در محل پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، تحت شرایط دمایی ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار می‌گرفت. ۲ هفته بعد از آداپته شدن حیوانات با محیط، موش‌های گروه الکلیسم تجربی، روزانه ۳gr/kg وزن بدن الکلی ۲۵ درجه را به صورت گاواژ دریافت کردند. دز مذکور بر اساس دانسیته (۰/۷۹۰mg/ml) الکلی مورد استفاده (الکل ریدل، آلمان) محاسبه شد (۱۶). گروه کنترل نرمال سالیان را روزانه به مدت ۴۵ روز و از طریق گاواژ دریافت کردند. بعد از ۴۵ روز مطالعات بر روی عملکرد دستگاه تناسلی صورت گرفت.

نحوه تهیه اسپرم: ابتدا موش‌های سوری نر با تزریق ترکیب زایلانزین و کتامین به صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند. بعد از کشتن حیوان، پوست ناحیه شکمی را با اتانول ۷۰ درصد استریل کرده و سپس یک برش در ناحیه شکمی ایجاد شد. بعد از جدا کردن بافت همبندی اطراف دم اپیدیدیم از بیضه جدا شده و در

کنترل مشاهده نشد. نکته قابل توجه اینکه لوله‌های منی‌ساز نزدیک به کپسول (حاشیه‌ای) بیشترین میزان آسیب را در اتصال سلول‌های ژرمینال به همدیگر، انسجام و تخلیه لوله‌های منی‌ساز در گروه الکلی را نشان دادند (تصویر شماره ۱، C).

نتایج حاصل از بررسی ضرایب اسپرماتوژنز:

مقایسه ضریب تمایز لوله‌ای در گروه الکلی و کنترل نشان داد که TDI در گروه دریافت کننده الکلی $72 \pm 2/19$ درصد بوده که در مقایسه با گروه کنترل ($91/25 \pm 1/75$ درصد) کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۱، B).

درصد ضریب RI در موش‌های گروه الکلی ($61/5 \pm 1/2$ درصد) در مقایسه با موش‌های گروه کنترل ($75 \pm 0/4$ درصد) کاهش معنی‌داری یافته است. مقایسه ضریب اسپرمیونز (SPI) در گروه الکلی و کنترل نشان داد که گروه الکلی ضریب اسپرمیونز پائین‌تری ($81/25 \pm 1/03$ درصد) نسبت به گروه کنترل ($91 \pm 1/08$ درصد) داشتند که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

مقایسه قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه‌ها نشان داد که میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه الکلی ($146/8 \pm 4/5 \mu m$) نسبت به گروه کنترل ($202 \pm 0/07 \mu m$) کاهش معنی‌داری یافته بود.

سلول‌های لیدیک در گروه الکلی دچار هیپرتروفی شده بودند و سیتوپلاسم آن‌ها حالت واکوئل و هسته آن‌ها به‌صورت تغییر شکل یافته مشاهده شد. این سلول‌ها در گروه الکلی به‌صورت مجتمع و نزدیک به عروق مشاهده می‌شدند. تعداد سلول‌های لیدیک در یک میلی‌متر مربع از بافت بینابینی در گروه الکلی ($63/5 \pm 2/6$) در مقایسه با گروه کنترل ($77/4 \pm 1/07$) در سطح معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۱-D). میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در دیواره مقطع عرضی لوله‌های منی‌ساز بافت بیضه موش‌های الکلی ($15/75 \pm 0/05$) در مقایسه با موش‌های گروه کنترل ($22 \pm 0/09$) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$).

تغییرات مربوط به پارامترهای اسپرم:

شمارش تعداد اسپرم‌ها به ازای دم اپیدیدیم نشان دهنده این است که کاهش معنی‌داری بین دو گروه کنترل و الکلی وجود دارد ($P < 0.05$).

مطالعه قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین نگرزین نشان داد که قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها در گروه الکلی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($P < 0.05$).

بررسی میزان تحرک اسپرم نشان داد که درصد اسپرم‌های متحرک در موش‌های گروه الکلی در مقایسه با گروه کنترل به

تک‌رشته‌ای ناسالم و دنا توره بکار می‌رود. DNA دورشته‌ای سالم زیر میکروسکوپ فلورسنت سبز رنگ و DNA تک‌رشته‌ای دنا توره زرد تا قرمز رنگ دیده می‌شود. پس از تهیه اسمیر از هر نمونه و خشک شدن آن‌ها فیکس شدن آن‌ها توسط محلول کارنوی به مدت حداقل ۲ ساعت صورت گرفت. سپس لام‌ها به مدت ۷ دقیقه توسط رنگ آکریدین اورنج (Sigma, USA) رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو توسط آب جاری لام‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر nm460 بررسی شدند (۱۸).

نمونه‌برداری موش‌های نر جهت بررسی‌های بافتی: نمونه‌های بیضه گرفته شده جهت فیکسه شدن به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در محلول ثبوتی فرمالین- سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. پس از تهیه نمونه‌های بافتی و برش برای رنگ‌آمیزی برش‌های بافتی از متد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین استفاده شد.

مطالعه هیستومورفومتری بافت بیضه: در مطالعه هیستومورفومتری پس از تهیه مقاطع هیستولوژیک، قطر لوله‌های منی‌ساز با استفاده از عدسی مدرج در گروه‌های الکلیک و کنترل اندازه‌گیری و با هم مقایسه شدند. برای شمارش تعداد سلول‌های لیدیک از عدسی مشبک استفاده شد. تعداد سلول‌های سرتولی به ازاء هر لوله سمینی فر شمارش و مقایسه شد.

به‌منظور ارزیابی اسپرماتوژنز در لوله‌های منی‌ساز، از ضریب تمایز لوله‌ای (TDI)، ضریب اسپرمیونز (SPI) و ضریب جایگزینی مجدد اسپرماتوگونی‌های فعال (RI) استفاده شد. برای بررسی TDI درصد لوله‌های منی‌ساز که شامل چهار یا بیش از چهار ردیف از سلول‌های تمایز یافته از اسپرماتوگونی A می‌باشد، محاسبه شد برای این منظور در هر بیضه تعداد ۱۰۰ لوله منی‌ساز در ۱۰۰ مقطع عرضی از بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور بررسی RI نسبت سلول‌های اسپرماتوگونی فعال به غیرفعال در لوله‌های منی‌ساز و برای بررسی SPI نیز درصد لوله‌های منی‌ساز حاوی اسپرم به لوله‌های فاقد اسپرم محاسبه شد بنابراین ۱۰۰ لوله در ۱۰۰ مقطع عرضی مورد شمارش قرار گرفت (۱۹).

آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS شماره ۱۶ و روش آماری T test و $P < 0.05$ مورد مقایسه قرار گرفته و میانگین و انحراف معیار آن‌ها به دست آمد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به تغییرات بافت‌شناسی بیضه:

در بررسی بافت‌شناسی مقاطع عرضی بیضه در دو گروه آدم زیرکپسولی و آدم در بافت بینابینی بیضه در موش‌های گروه الکلی مشاهده شد. هیچ گونه ادمی در نواحی مربوطه در موش‌های گروه

گروه کنترل افزایش قابل توجه و معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$).

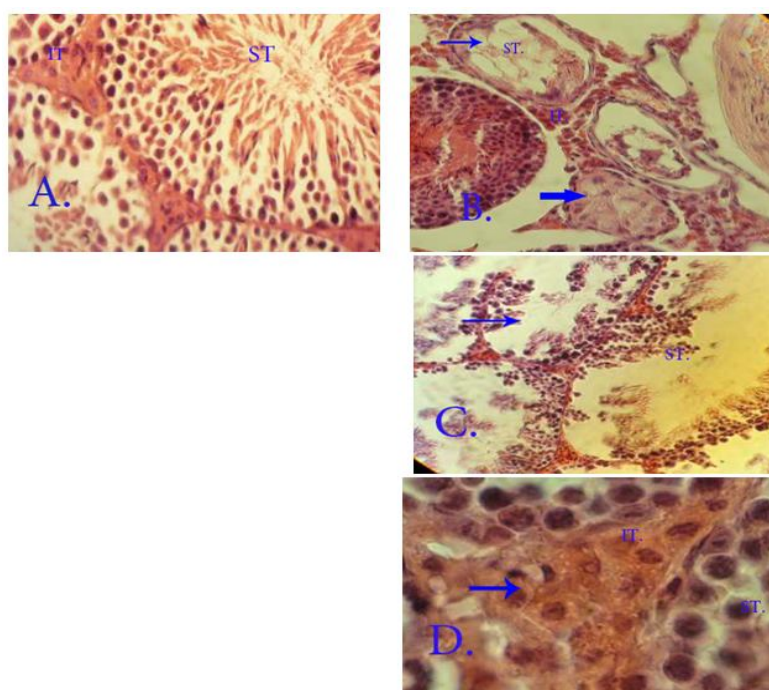
بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها با رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو نشان دهنده افزایش درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی در گروه الکلی در مقایسه با گروه کنترل بود که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$).

شکل قابل توجهی کاهش یافته است. شکستگی در ساختار DNA به وسیله رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج ارزیابی شد. میزان شکستگی در ساختار DNA در گروه دریافت کننده الک نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد که این افزایش معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). بررسی بلوغ هسته اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو نشان داد که درصد اسپرم‌های نابالغ در گروه الکلی در مقایسه با

جدول (۱): مقایسه فاکتورهای مختلف کیفیت اسپرم در دو گروه کنترل و الکلیسم تجربی

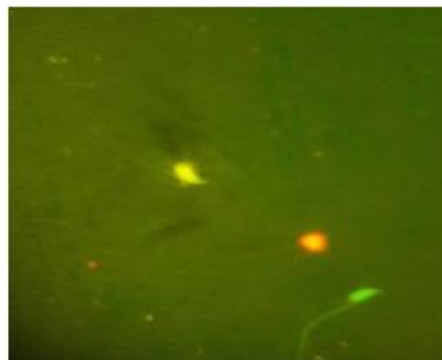
گروه الکلیسم تجربی	گروه کنترل	
* $15/12 \pm 3/3$	$31/5 \pm 0/9$	تعداد اسپرم (10^6)
* $44/8 \pm 4/0.2$	$64/75 \pm 1/93$	قدرت زنده مانی (%)
* $30/6 \pm 3/93$	$62/5 \pm 1/93$	تحرك (/)
* $45/4 \pm 0/48$	$5/5 \pm 1/0.4$	مورفولوژی غیرطبیعی (%)
* $40/2 \pm 3/63$	$1/75 \pm 0/85$	(%) DNA آسیب
* $23/6 \pm 1/8$	$2/75 \pm 0/85$	هسته نابالغ (/)

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو گروه کنترل و تجربی. ($P < 0.05$). (Mean $\pm$ SD)



تصویر (۱): نمایی از بافت بیضه در گروه‌های کنترل و تجربی

A. نمایی از بافت بیضه در گروه کنترل که در آن بخشی از لوله‌های منی‌ساز (ST) و بافت بینابینی (IT) حاوی سلول‌های لیدینگ طبیعی مابین آنها دیده می‌شود. حالت گسیختگی در سلول‌های رده اسپرماتوزن وجود ندارد. B. نمایی از برش بیضه در بافت الکلی که نشان می‌دهد بافت بیضه انسجام طبیعی خود را از دست داده، فاصله بین لوله‌های منی‌ساز افزایش یافته، قطر لوله‌های منی‌ساز کاهش یافته و بافت بینابینی اطراف لوله‌ها کاهش یافته است. ضریب تمایز لوله‌ای منفی و تخلیه سلول‌های لایه ژرمینال ($\rightarrow$) دیده می‌شود. C. نمایی از برش عرضی بافت بیضه در گروه الکلیسم تجربی که نشان می‌دهد نظم سلول‌های رده اسپرماتوزن بهم خورده و حالت گسیختگی را نشان می‌دهد. ریزش سلول‌ها به داخل لوله‌های منی‌ساز دیده می‌شود. رنگ‌آمیزی H&E، درشت نمایی $400 \times$ D. برش عرضی بافت بیضه در گروه الکلی که نشان دهنده سلول‌های لیدینگ بزرگ شده با سیتوپلاسم واکوئله است. رنگ‌آمیزی H&E، درشت نمایی $1000 \times$



تصویر (2): تصویر سمت چپ: اسپرم‌ها با رنگ‌آمیزی آنیلین بلو که اسپرم‌های با کروماتین بالغ و دارای پروتئین مناسب در هسته دارای هسته‌ای به رنگ آبی روشن و اسپرم‌های با کروماتین نابالغ و دارای پروتئین کم و بالطبع دارای هیستون زیاد در هسته دارای هسته‌ای به رنگ آبی تیره تا خاکستری مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی آنیلین بلو درشت نمایی $\times 1000$ تصویر سمت راست: اسپرم‌ها با رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج که اسپرم، با DNA آسیب‌دیده سر اسپرم به رنگ زرد و اسپرم سالم، سر اسپرم به رنگ سبز دیده می‌شود. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج درشت نمایی $\times 1000$

بحث و نتیجه‌گیری

مصرف نوشیدنی‌های الکلی یکی از مشکلات جدی است که سلامت جامعه بشری را به مخاطره می‌اندازد. نتایج مطالعات نشان دهنده نقش این مواد در بروز نارسایی‌های سیستم تولیدمثلی است (۲۰). این ماده با تأثیر بر روی سلول‌های لیدیک سطح هورمون تستوسترون را در خون کاهش داده و باعث کاهش عملکرد سیستم تناسلی و کاهش صفات ثانویه جنسی در نر می‌شود (۶). مطالعات جدید نشان دهنده افزایش سطح پرولاکتین در افراد الکلی است (۲۱). پرولاکتین نقش کلیدی در تنظیم رفتار و فعالیت جنسی و تولیدمثلی ایفا می‌کند (۲۲). مطالعات نشان می‌دهد که مصرف زیاد و مزمن الکل در مردان با هورمون‌های دخیل در باروری که برای بلوغ جنسی، بلوغ اسپرم و باروری مورد نیاز است تداخل ایجاد می‌کند. این امر با افزایش پرولاکتین و متعاقب آن کاهش ترشح ضربانی LH و FSH از هیپوفیز پیشین همراه است. کاهش هورمون‌های هیپوفیزی باعث کاهش اثرات آن‌ها بر سلول‌های لیدیک و سرتولی می‌شود. کاهش LH با کاهش ترشح تستوسترون از سلول‌های لیدیک همراه است. تستوسترون برای تولید اسپرم و تکمیل و افزایش خصوصیات ثانویه جنسی و رفتار طبیعی جنسی الزامی است. FSH روی سلول‌های سرتولی اثر کرده و تبدیل اسپرماتید به اسپرماتوزوئید را تسهیل می‌نماید. نیز شروع مراحل بلوغ اسپرماتوگونی را تسریع می‌کند. (۲۳) هورمون‌های LH و FSH در فرایند اسپرماتوژنز دخالت کرده و نقش مهمی در تحریک بافت بیضه‌ای برای تولید اسپرماتوزوایفا می‌کنند. کاهش هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در مطالعه حاضر نشان دهنده اثر الکل بر ترشحات غده هیپوفیز و متعاقب آن

کاهش میزان تستوسترون و کاهش میزان اسپرم تولیدی است. لذا می‌توان کاهش روند اسپرماتوژنز را که از نتایج این تحقیق است، از طریق مکانیسم هورمونی توجیه کرد. برای بررسی روند اسپرماتوژنز و تأثیر اثر هورمون‌ها بر آن، ضرایب TDI، SPI و RI در دو گروه الکلی و کنترل مقایسه شد و نتایج نشان داد که این ضرایب به‌صورت معنی‌داری در گروه الکلی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است که خود دلیلی بر کاهش میزان اسپرم تولیدی می‌باشد.

با توجه به اینکه الکل باعث کاهش اسید سیالیک می‌شود (۲۴) می‌توان اختلال در روند اسپرماتوژنز ناشی از مصرف الکل و همچنین کاهش میزان تستوسترون سرم را توجیه کرد. از جمله وظایف سلول‌های سرتولی حفظ یکپارچگی سلول‌های رده اسپرماتوژنز، بلوغ سلول‌های جنسی و اسپرمیشن می‌باشد. نیز در اتصالی سلول‌های ژرمینال به همدیگر کنترل فرایند اسپرماتوژنز در بافت بیضه دخالت دارند. کاهش تستوسترون و ریزش سلول‌های جنسی نابالغ و آسیب سلول‌های سرتولی باعث اختلال در روند اسپرمیوژنز می‌شود که با یافته‌های این مطالعه مبنی بر کاهش سلول‌های سرتولی و لیدیک در گروه الکلی مطابقت دارد. بررسی‌های بافت شناسی نشان داد که کاهش معنی‌دار سلول‌های سرتولی همراه با از هم گسیختگی قابل توجه سلول‌های ژرمینال در گروه الکلی بوده است. بنابراین کاهش ضریب تمایز لوله‌ای و ضریب جایگزینی سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه دریافت کننده الکل در مقایسه با گروه کنترل قابل توجیه است. استرس اکسیداتیو ناشی از الکل می‌تواند باعث آسیب سلول‌های لیدیک و آپوپتوز بافت بیضه گردد. سلول‌های لیدیک در این مطالعه بعد از

تجویز الکل به طور معنی داری کاهش یافت. دژنره و واکوئله شدن سلول های لیدیک به دنبال تجویز الکل منجر به کاهش سطح سرمی تستوسترون گشته و کاهش تستوسترون باعث دژنره شدن سلول های سرتولی و متعاقباً عدم یکپارچگی اپیتلیوم زایگر می گردد.

متابولیسم اتانول باعث افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) و کاهش مقدار آنتی اکسیدانت ها می گردد. این اثرات باعث آسیب بیومولکولی از جمله آسیب به پروتئین ها، چربی ها و DNA می شود. افزایش مقدار ROS باعث کاهش حرکت اسپرم و ایجاد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم می گردد (۲۵). در بررسی میزان اسپرم هایی با مورفولوژی غیرطبیعی مشاهدات حاکی از افزایش معنی دار درصد اسپرم های غیرنرمال در گروه مصرف کننده الکل است. با بالا رفتن میزان اسپرم های غیرطبیعی، نفوذ لوکوسیت های پراکسیداز مثبت به بافت بینابینی بیضه به منظور پراکسیده کردن غشاء پلاسمایی آن ها افزایش می یابد و افزایش لوکوسیت ها و اسپرم های غیرنرمال باعث افزایش ROS می گردد (۲۳). افزایش ROS با کاهش مستمر تعداد سلول های اسپرم زنده و فعال همراه است. این روند افزایش سلول های مرده را به همراه خواهد داشت که دلیلی بر افزایش معنی دار درصد سلول های مرده و کاهش در قدرت زندهمانی اسپرم ها در گروه الکلی در مقایسه با گروه کنترل در این مطالعه است. در این مطالعه مشاهده افزایش قابل توجه میزان اسپرم هایی با DNA آسیب دیده در گروه الکلی نسبت به گروه کنترل به دلیل اختلال در سلول های سرتولی و متعاقب آن کاهش میزان پروتئینه شدن هسته قابل توجه است. کاهش پروتئینه شدن باعث اختلال در روند فشردگی هسته شده و احتمال تماس عوامل مضر خارجی از قبیل رادیکال های آزاد با DNA سلولی اسپرم را افزایش می دهد (۲۳). با افزایش میزان

فراگمنته شدن DNA، درصد اسپرم های دارای تحرک و مورفولوژی طبیعی نیز کاهش می یابد. در مطالعه ای که توسط طالبی و همکاران صورت گرفت نشان دادند مصرف الکل ۵ درصد به صورت محلول در آب آشامیدنی، ۶۵ درصد از اسپرم های رت هایی که الکل مصرف کرده بودند دچار ناهنجاری هایی در سر و دم همانند کروماتین تمایز نیافته هسته، وجود انکلوژیون ها یا شکل های متفاوت در داخل سلول، نقص کلاهیک آکروزومی و وجود قطرات سیتوپلاسمی بودند و همچنین سبب کاهش تحرک اسپرم های اپیدیدی در رت شده و همچنین نشان دادند الکل سبب تحت تأثیر قرار گرفتن پروسه تراکم کروماتین اسپرم می گردد (۲۶). در مطالعات ما افزایش معنی داری در تعداد اسپرم های نابالغ و اسپرم های بد شکل در گروه الکلی و همچنین کاهش معنی داری در تعداد اسپرم های متحرک در گروه الکلی مشاهده گردید که با توجه به توضیحات ذکر شده قابل توجه می باشد.

براساس نتایج حاصل از این مطالعه می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که مصرف الکل سبب ایجاد تغییرات بافتی در بیضه شده و ناهنجاری های اسپرمی از جمله کاهش بلوغ اسپرم، آسیب به DNA اسپرم، کاهش قدرت زنده مانی و تحرک اسپرم می گردد. همچنین باعث افزایش در تعداد اسپرم های بد شکل می شود. نیز از طریق تأثیری که بر روی سلول های لیدیک در بافت بینابینی بیضه می گذارد باعث کاهش سطح سرمی هورمون تستوسترون می شود. کاهش تستوسترون باعث اختلال در عملکرد سلول های سرتولی شده و فرایندهای اسپرماتوزن و اسپرمیوزن را تحت تأثیر قرار می دهد. همه این عوامل می توانند در اثر ایجاد رادیکال های آزاد اکسیژن توسط الکل ایجاد شده و باعث ایجاد ناباروری در جنس نر گردد.

References:

- Vahidi S, Ardalan A, Mohammad K. The study of primary infertility in Islamic Republic of Iran on 2003-2004. *Fertility Sterility* 2005;7(28): 243-51.
- Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod. Biol Endocrinol* 2010;6: 8-21.
- Walimaki M. and Ylikahri R H. Endocrine effects of alcohol. In: *Progress in alcohol research*. Netherlands:1995. P. 265-286
- Emanuele MA, Emanuele N V. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res World* 1998;22: 195-201.
- Boyden TW, Pamentor RW. Effects of ethanol on the male hypothalamic-pituitary- gonadal axis. *Endocr Rev* 1983; 4: 389-95.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14: 1039-49.

7. Bielawski D M, Zaher F M, Svinarich D M, Abel E L. Paternal alcohol exposure affects sperm cytosine methyltransferase messenger RNA levels. *Alcohol Clin. Exp Res* 2002; 26(3): 347-51.
8. El-Sokkary G H. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration the testis of adult male rats. *Neuro endocrinol Lett* 2001; 22(2): 93-9.
9. Srikanth V, Malini T, Arunakaran J, Govindarajulu P, Balasubramanian K. Effect of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288(2): 509-15.
10. Villalta J, Ballescà JL, Nicolás, JM, Martínez de Osaba MJ, Antúnez E. Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin. Exp. Res* 1997; 21(1): 128-33.
11. Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian. J Physiol Pharmacol* 2006; 50: 291-6.
12. Varnet P, Fulton N, Wallace C, Aitken RJ. Analysis of a plasma membrane redox system in rat epididymalspermatozoa. *Biol Reprod* 2001; 65: 1102-13.
13. Guerin P, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surrounding. *Human Reprod Update* 2001; 7: 175-89.
14. Aitken R J, West K, Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 1994; 15: 343-52.
15. Sena KCM, Pedrosa LFC. Zinc supplementation and its effects on growth, immune system, and diabetes. *Rev Nutrition* 2005; 18: 251-9.
16. Durcan E A, Sorrell J E, Adamantidis A, Rider T, Jandacek R J, Seeley R J, et al. Alcohol drinking in MCH receptor-1- deficient mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31(8): 1325-37.
17. Hammadeh M, Zeginiadov T, Rosenbaum P. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 2001;46: 99-104.
18. Erenpresist J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpresia J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl* 2001;22: 45-53.
19. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Mohammadirad A, Salehnia A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 2008; 27(12): 901-10.
20. Florek, E. & Marszalek, A. An experimental study of the influences of tobacco smoke on fertility and reproduction. *Hum. Exp. Toxicol* 1999;18(4): 272-8.
21. Wilhelm I, Diekelmann S, Molzow I, Ayoub A, Mölle M, Processes of consolidation present during sleep. *J Neuroscience* 2011; 31(5): 1563-9.
22. Clayton A H. Sexual function and dysfunction in women. *Psychiatr Clin North Am* 2003; 26(3): 673-82.
23. Ahmadi A, Saderkhanlou S A, Salami S, Ahmadi A. Evaluation of sperm quality, maturation and DNA integrity in adult mice treated with sulpiride. *Tehran Univ Med J* 2012;70: 205-11.
24. Cameron D F & Muffly K E. Sertoli cell as transplantation facilitator for cell transplantation. *J Cell Sci* 1999;100: 632-3.
25. Kosari Sh, Thompson A, Agarwal A, Plessis S. Free radicals: Their beneficial and detrimental

- effects on sperm function. Indian J Experimen Biology 2010;48: 425-35.
26. Talebi AR, Abbasi Sarcheshmeh A, Khalili MA, Tabibnejad M. Effects of ethanol consumption on, chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol 2010; 45: 403-9.

EVALUATION OF THE EFFECT OF EXPERIMENTAL ALCOHOLISM ON TESTIS TISSUE AND SPERM QUALITY IN ADULT MOUSE MODEL

Abbas Ahmadi^{1*}, Shahrzad Shojazadeh²

Received: 7 Jan, 2015; Accepted: 6 Mar, 2015

Abstract

Back ground & Aims: This study was designed to determine the effects of alcohol administration on sperm quality and testicular tissue pathogenesis.

Materials & Methods: In this study, 20 male adult mice were divided into two groups as control (saline normal) and test (ethanol 3g/kg BW as 25% V/V). The rats were given by gastric intubation, daily for 45 days and then all the animals were sacrificed and testes were dissected out and underwent histopathological studies. Sperm samples were collected from caudal epididymis in order to evaluate sperm parameters.

Results: Percentage of seminiferous tubules with positive TDI, SPI, RI and leydig cells NO/mm² of connective tissue and sertoli cells NO/tubule significantly decreased in alcoholic group. Light microscopic analysis of sperm parameters demonstrated that sperm motility, viability and count remarkably decreased in the test group in comparison with the controls. Moreover, the percentage of sperms with DNA disintegrity, nuclear immaturity and morphologic immaturity significantly increased in the alcoholic group compared with the control ($P < 0.05$).

Conclusion: The results revealed that ethanol damages spermatogenesis and spermiogenesis processes, as well, any decrease in semen quality and testis dysfunction induces fertility problems.

Keywords: Alcoholism, Testis, Spermatogenesis, Sperm, Mouse

Address: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Tel: +989141498524,

Email: abbasahmadi60@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 26(2): 120 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran