

مطالعه آپوپتوز در بافت اپی دیدیم پس از کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش صحرایی بالغ

میر هادی خیاط نوری^۱، سید اسماعیل صفوی^۲

^۱ استادیار، گروه فیزیولوژی- فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز
^۲ استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

چکیده

سابقه و هدف: در گونه‌های مختلف پستانداران، درجه حرارت بیضه پایین‌تر از حرارت محوطه بطنی می‌باشد و نشان داده‌اند که این دمای پایین برای روند اسپرماتوژنز و باروری اسپرم ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی آپوپتوز پس از کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش صحرایی بالغ در بافت اپی دیدیم می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی بالغ نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) به ۱۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. با ثابت کردن بیضه‌های راست به دیواره شکم، در هفت گروه کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه ایجاد گردید. در گروه‌های اول تا هفتم بترتیب ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از عمل، حیوانات کالبد گشایی شده و اپی دیدیم آنها در سه قسمت سر، بدنه و دم مورد مطالعه قرار گرفت. در گروه هشتم تا چهاردهم به عنوان گروه شم پس از برش، بیضه‌ها از کیسه بیضه به داخل محوطه بطنی جابجا شده و سپس به کیسه بیضه بازگردانده شدند. در گروه پانزدهم به عنوان گروه شاهد هیچ گونه عملی صورت نگرفت. پس از نمونه برداری از بافت اپی دیدیم و ثبوت در فرمالین ۱۰ درصد نمکی، پاساژ بافتی و تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی با روش تانل، اپی دیدیم از نظر آپوپتوز در گروه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: رنگ‌آمیزی تانل مشخص ساخت که کریپتورکیدیسم تجربی موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های پوششی اپی دیدیم می‌شود. اوج سلول‌های آپوپتوتیک در روزهای سوم و ششم پس از عمل مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های شم و شاهد وجود نداشت. **نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه ما نشان داد که کریپتورکیدیسم تجربی موجب القاء آپوپتوز می‌شود و این اثر احتمالاً به دلیل استرس حرارتی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های بافت پوششی اپی دیدیم است.

واژگان کلیدی: کریپتورکیدیسم، آپوپتوز، اپی دیدیم، موش صحرایی بالغ.

مقدمه

فقدان اسپرم (آزواسپرمی)، فاکتور ایجاد کننده کریپتورکیدیسم است (۱). در گونه‌های مختلف پستانداران درجه حرارت نسبتاً پایین برای روند طبیعی اسپرماتوژنز و باروری اسپرم مورد نیاز است. مطالعات مشخص کرده که درجه حرارت کیسه بیضه در اغلب پستانداران ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد از حرارت داخل محوطه بطنی پایین‌تر است. اختلال در روند اسپرماتوژنز متعاقب کریپتورکیدیسم، به دنبال قرار گرفتن بیضه‌ها در درجه حرارت بالا در محوطه بطنی ایجاد می‌شود. گزارش کرده‌اند که با سرد کردن بیضه‌ها در

کریپتورکیدیسم یا نهان‌بیضگی به دنبال نقص در پایین آمدن بیضه‌ها به داخل کیسه بیضه در زمان تولد حاصل می‌شود و یکی از علل ناباروری در انسان و بسیاری از گونه‌های حیوانی می‌باشد. در ۳ تا ۸ درصد مردان نابارور و ۲۰ درصد مردان با

داخل محوطه بطنی حیوانات، اسپرما توژنز طبیعی حاصل می‌شود (۲). مطالعات فراوانی در مورد اثرات کریپتورکیدیسم تجربی بر روی بافت بیضه و اپی‌دیدیم در حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است (۴-۲). مطالعات هیستولوژیک در بیضه و اپی‌دیدیم به دنبال ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی هم در موش‌های صحرایی بالغ (۵) و هم در موش‌های صحرایی نابالغ (۶) صورت گرفته است. در تمامی مطالعات انجام شده ارتباط نسبی بین وسعت فعالیت ضداسپرمی و طول دوره کریپتورکیدیسم بیان شده است، ولی در مورد تغییرات بافت اپی‌دیدیم اطلاعات چندانی در دست نمی‌باشد. بنابراین برای بیان بهتر اثرات کریپتورکیدیسم روی بافت اپی‌دیدیم و درک بهتر پاتوفیزیولوژی صدمات وارده، مهم‌ترین راه بررسی تأثیر کریپتورکیدیسم روی بافت اپی‌دیدیم می‌باشد. اپی‌دیدیم وظیفه تغلیظ، بلوغ، انتقال و ذخیره اسپرم را بر عهده دارد. اپی‌دیدیم به سه قسمت سر، بدنه و دم تقسیم می‌شود. نقش بخش ابتدایی اپی‌دیدیم در بلوغ اسپرم می‌باشد، در حالی که قسمت انتهایی نقش ذخیره اسپرم را بر عهده دارد. نشان داده‌اند که آندروژن‌ها بیان ژن‌های اختصاصی را در اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم تنظیم می‌کنند و باعث تغییراتی در الگوی ترشح پروتئین در بسیاری از قسمت‌های اپی‌دیدیم می‌شوند. همچنین مشخص شده است که رشد و نمو اپی‌دیدیم و غدد ضمیمه جنسی تحت کنترل آندروژنهاست (۷). محققین دریافته‌اند که افزایش درجه حرارت بیضه باعث کاهش میزان تستوسترون سرم خون شده و این افزایش دما در بافت اپی‌دیدیم موجب تغییراتی در ساختار پروتئین سلول‌های پوششی اپی‌دیدیم می‌شود (۸). در یک بررسی، پس از ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش‌های صحرایی نابالغ تغییرات معنی‌داری در وزن، قطر لوله‌ها و ضخامت اپی‌دیدیم پس از عمل کریپتورکیدیسم مشاهده شد (۹). درجه حرارت از فاکتورهای بسیار مهم در عملکرد فیزیولوژیک اپی‌دیدیم می‌باشد. مشخص شده است که درجه حرارت، ذخیره اسپرم را در ناحیه دم اپی‌دیدیم در موش صحرایی و خرگوش تنظیم می‌کند. عمل ذخیره اسپرم در دم اپی‌دیدیم و توانایی آن در حفظ بقاء اسپرم شدیداً وابسته به درجه حرارت اسکروتوم بوده و با افزایش دما دچار اختلال می‌شود (۷). مشخص شده است که با ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی از طریق بستن کانال اینگوئینال و کریپتورکیدیسم مادرزادی، الگوی رشد طبیعی مجاری آوران و اپی‌دیدیم دچار تغییر می‌شود (۸، ۱۰). در تحقیقی پس از ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی دو طرفه در موش‌های صحرایی بالغ، کاهش درصد تحرک و میزان اسپرم‌ها

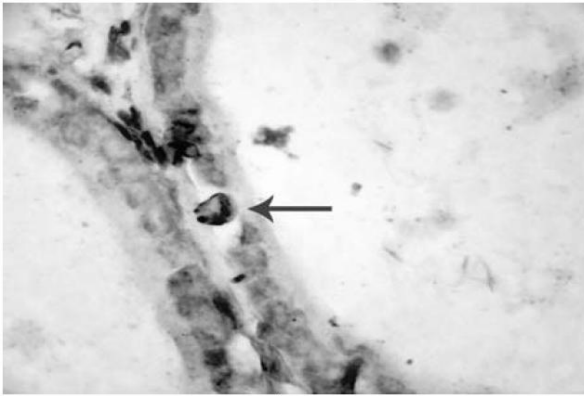
در اپی‌دیدیم در روز سوم و پنجم پس از عمل گزارش شد (۳). برخی محققین نیز پس از ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی یک‌طرفه کاهش معنی‌داری را در درصد غلظت و میزان تحرک اسپرم‌ها در اپی‌دیدیم در هفته دهم پس از عمل گزارش نمودند (۱۱). مطالعه مشابه دیگری در سگ‌های کریپتورکید، آزواسپرمی (عدم وجود اسپرم)، کاهش درصد تحرک، کاهش میزان کل اسپرم و کاهش میزان اسپرم‌های نرمال را نشان داد (۱۲). متعاقب کریپتورکیدیسم عمل ذخیره اسپرم در اپی‌دیدیم و همچنین توانایی حفظ حیات اسپرم‌ها در درجه حرارت داخل شکمی شدیداً دچار اختلال می‌گردد و افزایش دمای اپی‌دیدیم با تغییراتی در ساختار پروتئینی مایع ترشحی از اپی‌دیدیم، و همچنین تغییر ترشح آب و یون‌ها از اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم همراه است (۳). میزان طبیعی تستوسترون داخل بیضوی و داخل اپی‌دیدیمی که توسط سلول‌های لیدیگ ترشح می‌شود و میزان طبیعی پروتئین متصل به آندروژن (ABP)، که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود، برای فعال شدن و تداوم اسپرما توژنز و مراحل بلوغ اسپرم در داخل اپی‌دیدیم ضروری است. کاهش میزان تستوسترون داخل بیضه، افزایش درجه حرارت و استرس اکسیداتیو بدنبال کریپتورکیدیسم، حیات سلولی، بلوغ اسپرماتیدها و عملکرد طبیعی سلول‌های اپی‌دیدیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳). با توجه به این که تمامی مطالعات انجام گرفته قبلی بیشتر در زمینه تغییرات بافتی بر پایه رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین است و اطلاعات محدودی در مورد پدیده آپوپتوز متعاقب کریپتورکیدیسم تجربی وجود دارد، تحقیق در این مورد امری ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روشها

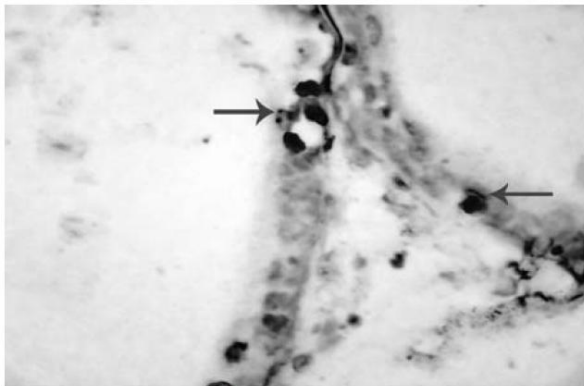
در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی نر بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) نژاد ویستار، از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری شده و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غذا و آب به صورت آزاد در دسترس حیوانات قرار گرفت. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۱۵ گروه هشت تایی تقسیم شدند، به طوری که ۷ گروه تحت عمل جراحی کریپتورکیدیسم یک طرفه، ۷ گروه به عنوان گروه شم و یک گروه شاهد در نظر گرفته شد. برای ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی ابتدا داروی رامپون (Alfasan، هلند) با دوز ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن

یافته‌ها

مطالعه مقاطع بافتی گروه‌های مختلف نشان داد که آپوپتوز در سلول‌های بافت پوششی اپی‌دیدیم مشاهده می‌شود (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- مقطع بافت لوله اپی‌دیدیم در ناحیه بدنه در روز سوم پس از عمل. سلول آپوپتوتیک به رنگ تیره در اپی‌تلیوم لوله‌ها دیده می‌شود (↑). رنگ آمیزی تانل. درشت نمایی X ۴۰۰.



شکل ۲- مقطع بافت لوله اپی‌دیدیم در ناحیه بدنه در روز ششم پس از عمل. تعدادی سلول آپوپتوتیک به رنگ تیره در اپی‌تلیوم لوله‌ها دیده می‌شود (↑). تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در مقایسه با روز سوم بیشتر است. رنگ آمیزی تانل. درشت نمایی X ۴۰۰.

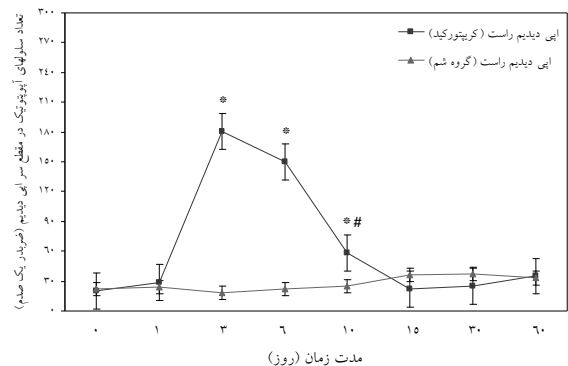
آنالیز آماری سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که بین گروه شاهد و گروه ششم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، بنابراین ارقام مربوط به گروه شاهد ذکر نشده است. میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک یک روز پس از عمل کریپتورکیدیسم، در قسمت سر اپی‌دیدیم راست (داخل شکمی) برابر با $1.0 \times 10^{-2} \pm 3/63$ بود که در مقایسه با گروه ششم یک روزه ($2.4/18 \pm 3/18 \times 10^{-2}$) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی در روزهای سوم، ششم و دهم پس از عمل، به ترتیب $1.0 \times 10^{-2} \pm 9/75$ ، $1.8 \times 10^{-2} \pm 5/48$ و $1.5 \times 10^{-2} \pm 7/25$ بود که در

بدن به عنوان داروی پیش‌بیهوشی و پس از ده دقیقه داروی کتامین (Alfasan، هلند) با دوز ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق شد تا بیهوشی کامل و عمیق حاصل گردد. سپس با ایجاد یک برش طولی روی خط میانی شکم، پوست و عضلات دیواره بطنی و صفاق برش داده شد. بیضه راست از ناحیه کیسه بیضه به داخل محوطه بطنی کشیده شده و با استفاده از نخ بخیه شماره چهار صفر نایلونی (SUPA، ایران)، از ناحیه دمی به دیواره عضلانی محوطه بطنی بخیه زده شد. برای جلوگیری از بازگشت بیضه به کیسه بیضه، گوبرناکولوم قطع گردید. روی بیضه چپ هیچ گونه عملی صورت نگرفت. در ادامه عضلات دیواره بطنی با استفاده از نخ بخیه کات‌گوت سه‌صفر (SUPA، ایران)، به صورت سرتاسری و پوست با استفاده از نخ بخیه سیلک شماره سه صفر (SUPA، ایران) به صورت تشکی افقی بخیه زده شد. در گروه ششم پس از بیهوشی و ایجاد برش، بیضه‌ها داخل محوطه بطنی کشیده و دوباره به داخل کیسه بیضه بازگردانده شده و عضلات و پوست به روش قبلی بخیه زده شد. در گروه شاهد هیچ گونه عملی روی حیوان صورت نگرفت.

حیوانات گروه‌های اول تا هفتم بترتیب ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از عمل کریپتورکیدیسم، کالبدگشایی شده و نمونه اپی‌دیدیم برای تهیه مقاطع هیستولوژیک به محلول فرمالین نمکی ۱۰ درصد (Merck، آلمان) منتقل گردید. پس از فیکس شدن مراحل مختلف پاساژ بافت بر روی نمونه‌ها انجام شده و پس از قالب‌گیری با پارافین از آنها مقاطع سریال با ضخامت ۳ میکرومتر تهیه گردید. مقاطع مذکور به روش تانل با استفاده از کیت استاندارد شرکت Roche و طبق روش کارخانه سازنده کیت، رنگ‌آمیزی گردید. همچنین برای رنگ‌آمیزی زمینه بافت، از روش تولوئیدین بلو (Merck، آلمان) استفاده شد. در ادامه سلول‌های آپوپتوتیک که به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شدند، در قسمت‌های مختلف بافت اپی‌دیدیم (سر، بدنه و دم) مورد مطالعه قرار گرفتند. از میان مقاطع عرضی لوله‌های اپی‌دیدیم، ۲۰ لوله به صورت تصادفی انتخاب شده و میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در آنها ثبت گردید.

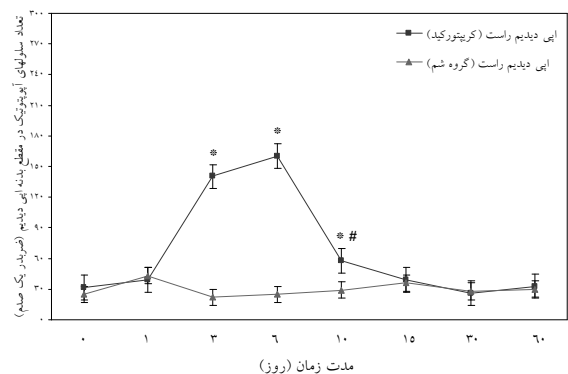
داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی جهت تحلیل داده‌ها استفاده گردید. $p < 0.05$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

مقایسه با گروه ششم مشابه افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱- میانگین تعداد سلول‌های آپوتوتیک در مقطع سر اپی‌دیدیم در زمانهای مختلف پس از عمل کریپتورکیدیسم.
 $p < 0.05$ در مقایسه با گروه ششم مشابه و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه روز ۳ و ۶ هستند.

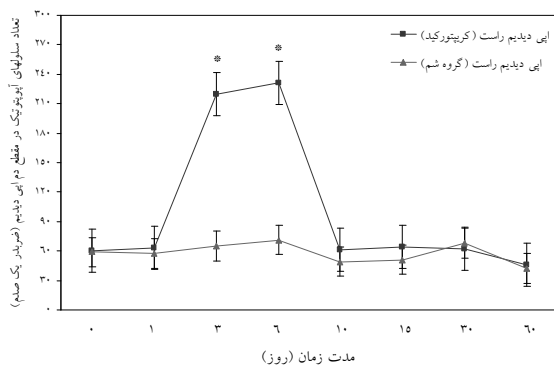
در قسمت بدنه اپی‌دیدیم راست، میانگین تعداد سلول‌های آپوتوتیک در روز اول پس از عمل برابر با $39/41 \pm 4/26 \times 10^{-2}$ بود که در مقایسه با گروه ششم یک روزه ($42/17 \pm 3/27 \times 10^{-2}$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میانگین سلول‌های آپوتوتیک در بدنه اپی‌دیدیم راست در روزهای سوم، ششم و دهم پس از عمل به ترتیب $140/27 \pm 11/65 \times 10^{-2}$ ، $160/55 \pm 12/91 \times 10^{-2}$ و $58/69 \pm 4/85 \times 10^{-2}$ بود که افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه ششم داشت ($p < 0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۲- میانگین تعداد سلول‌های آپوتوتیک در مقطع بدنه اپی‌دیدیم در زمانهای مختلف پس از عمل کریپتورکیدیسم.
 $p < 0.05$ در مقایسه با گروه ششم مشابه و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه روز ۳ و ۶ هستند.

میانگین سلول‌های آپوتوتیک در ناحیه دم اپی‌دیدیم راست در روز اول پس از عمل برابر با $62/71 \pm 7/28 \times 10^{-2}$ بود که در

مقایسه با گروه ششم مشابه ($59/34 \pm 6/17 \times 10^{-2}$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید، ولی در روزهای سوم و ششم پس از عمل، میانگین سلول‌های آپوتوتیک به ترتیب $220/11 \pm 15/94 \times 10^{-2}$ و $230/85 \pm 12/36 \times 10^{-2}$ بود که در مقایسه با گروه ششم افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). نتایج مقایسه تعداد سلول‌های آپوتوتیک در روزهای مختلف، در قسمت‌های مختلف اپی‌دیدیم (سر، بدنه و دم) نشان داد که فقط در قسمت سر و بدنه اپی‌دیدیم، تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) بین روز دهم در مقایسه با روزهای سوم و ششم بعد از عمل کریپتورکیدیسم وجود دارد (نمودار ۱ و ۲). در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ پس از عمل کاهش تعداد سلول‌های آپوتوتیک در هر سه قسمت سر، بدنه و دم اپی‌دیدیم مشاهده گردید که در مقایسه با گروه ششم مشابه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱ و ۲ و ۳).



نمودار ۳- میانگین تعداد سلول‌های آپوتوتیک در مقطع دم اپی‌دیدیم در زمانهای مختلف پس از عمل کریپتورکیدیسم.
 $p < 0.05$ در مقایسه با گروه ششم مشابه هستند.

بحث

در مطالعه حاضر، پدیده آپوتوز پس از ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی یک‌طرفه در موش‌های صحرایی بالغ در قسمت‌های مختلف بافت اپی‌دیدیم شامل سر، بدنه و دم ارزیابی شد. برای مشاهده و شمارش سلول‌های آپوتوتیک در بافت بیضه از روش رنگ‌آمیزی تانل استفاده شد که در این روش ارزیابی کمی و کیفی آپوتوز امکان‌پذیر است. فراگمانتاسیون اینترنوکلتوزومی DNA به عنوان یکی از وقایع اختصاصی آپوتوز مطرح است و در هیچ نوع مرگ سلولی دیگر مشاهده نمی‌شود. بنابراین روش تانل که بر پایه و اساس فراگمانتاسیون DNA انجام می‌شود، از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌ها است. انتهای 3'OH تکه‌های شکسته شده DNA هدف این

نیست. از طرف دیگر نشان داده اند که کریپتورکیدیسم تجربی در موش های صحرایی بالغ منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی ها و غیرفعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدان می شود. پراکسیداسیون چربی ها و ایجاد رادیکال های آزاد اضافی، می تواند موجب آسیب پروتئین ها، DNA و القاء آپوپتوز در سلول های بافت بیضه و اپی دیدیم گردد (۲۰). در یک بررسی انجام شده در موش صحرایی، کریپتورکیدیسم تجربی منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی های سلولی گردید که به عنوان نشانه ای از بروز استرس اکسیداتیو می باشد. رادیکال های آزاد در طی متابولیسم طبیعی سلول های بدن تولید می شوند و تولید رادیکال های آزاد بیش از ظرفیت تدافعی آنتی اکسیدان ها، موجب بروز استرس اکسیداتیو و پاسخ های غیر قابل برگشت مانند آپوپتوز یا نکروز در سلول های زنده می شود (۲۰). آنزیم گزانتین اکسیداز که به طور وسیع در بافت های بدن بخصوص در آندوتلیوم عروق کوچک دیده می شود باعث تبدیل هیپوگزانتین به گزانتین و گزانتین به اسید اوریک شده و به همراه آن سوپراکسیدها تولید می شوند. فعالیت این آنزیم در بیضه انسان و موش صحرایی تشخیص داده شده و به دلیل ایجاد آسیب های بیضوی القاء شده به خصوص به دنبال ایسکمی بافتی مورد توجه قرار گرفته است (۲۱). در یک بررسی با استفاده از مهارکننده های گزانتین اکسیداز (مثل آلپورینول) در موش های صحرایی که تحت عمل کریپتورکیدیسم تجربی قرار گرفته بودند، محققین دریافتند که آپوپتوز سلول ها به صورت معنی داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش می یابد (۲۱). بنابراین مطالعات فوق مؤید آن است که استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال های آزاد ممکن است در القاء آپوپتوز تحت شرایط استرس حرارتی نقش مهمی داشته باشند.

نتایج حاصل از شمارش سلول های آپوپتوتیک پس از ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش های بالغ در روزهای مختلف پس از عمل نشان داد که در روز اول پس از عمل، تغییر معنی داری در تعداد سلول های آپوپتوتیک در مقایسه با گروه شم ایجاد نگردید. در روز سوم پس از عمل تعداد سلول های آپوپتوتیک سریعاً افزایش یافته و در مقایسه با روز اول و گروه شم افزایش معنی داری نشان داد. نقطه اوج تعداد سلول های آپوپتوتیک در روزهای سوم و ششم بوده و روند کاهش تدریجی این سلولها پس از روز سوم و ششم شروع شد. نتایج مطالعه بارکاوی و ترومر در سال ۲۰۰۴ روی آپوپتوز سلول های بافت بیضه پس از کریپتورکیدیسم تجربی نشان داد که اوج تعداد سلول های آپوپتوتیک در روز چهارم پس از عمل

روش است. بطوری که نوکلئوتیدهای نشان دار بواسطه آنزیم های درونزا به انتهای 3'OH قطعات چسبانده می شود. در مرحله بعدی قطعات شکسته شده DNA که بواسطه نوکلئوتیدها نشاندار شده است، رهیابی می شود (۱۳). مطالعات فراوانی بر روی بافت بیضه و اپی دیدیم در افرادی که دچار عارضه کریپتورکیدیسم بوده و یا پس از ایجاد تجربی آن به روش جراحی در انسان و حیوانات مختلف، صورت گرفته است (۳-۵، ۱۴، ۱۵). بر خلاف مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر، مرگ برنامه دار سلولی یا آپوپتوز در سلول های بافت اپی دیدیم پس از ایجاد کریپتورکیدیسم تجربی مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال ایجاد استرس حرارتی فعالیت آنزیم های آندونوکلئاز موجب تخریب DNA می گردد. در طی این روند DNA به قطعاتی با طول ۱۸۰-۲۰۰ جفت باز شکسته می شود که این قسمت ها در حقیقت طولی از DNA است که به دور هیستون ها در نوکلئوزوم پیچیده می شود. به عبارت دیگر DNA در نواحی اتصال ما بین نوکلئوزوم ها شروع به شکستن می کند، که به این حالت اصطلاحاً فراگمانتاسیون داخل نوکلئوزومی گفته می شود (۱۶). علاوه بر مکانیسم ذکر شده فوق، مکانیسم های دیگری نیز باعث بروز تغییرات کروماتینی در هسته سلول می شود. غیرفعال شدن آنزیم هایی که در تعمیر DNA نقش دارند، یکی از این موارد است. پلی آدنوزین دی فسفات پلیمرز (PADP) اولین پروتئینی است که در آسیب های DNA وارد عمل شده و با چسبیدن به زنجیر باز شده DNA و تغییر پروتئین های هسته ای باعث تعمیر آسیب های وارد شده به DNA می شود. آنزیم کاسپاز ۳ که به دنبال آپوپتوز فعال می گردد، با شکستن آنزیم PADP عملکرد آن را در تعمیر DNA از بین می برد (۱۷). تغییرات آپوپتوتیک به دنبال ایجاد استرس حرارتی، منحصراً مرتبط با تغییرات هسته سلول های آپوپتوتیک نبوده و میتوکندری ها نیز تحت تأثیر قرار می گیرند. در میتوکندری سلول های آپوپتوتیک، اختلال در پتانسیل انتقال و نفوذپذیری لایه داخلی غشاء قابل تشخیص است، بطوری که این لایه توانایی جلوگیری از نشت برخی مولکول ها را از دست می دهد (۱۶). پروتئین P53 مرتبط با پوشش هسته بوده و در زمان استرس حرارتی به داخل هسته منتقل می گردد و توقف چرخه سلولی و یا خودکشی سلولی با واسطه P53 رخ می دهد (۱۸). مطالعات انجام شده توسط محققین بیانگر وجود میزان فراوان پروتئین P53 در سلول های مختلف بافت بیضه و اپی دیدیم می باشد (۱۹). بنابراین آسیب های DNA به دنبال کریپتورکیدیسم تجربی و استرس حرارتی در این سلول ها به دور از انتظار

بوده و پس از آن روند کاهش تدریجی سلول‌های آپوتوتیک دیده می‌شود. هم‌چنین آنها با بررسی اثرات کریپتورکیدیسم تجربی روی سلول‌های زایگر بافت بیضه موش صحرایی دریافتند که بین وسعت فعالیت آپوتوتیک سلول‌های زایگر و طول دوره کریپتورکیدیسم ارتباط وجود دارد (۲۲). کاهش تدریجی سلول‌های آپوتوتیک پس از سومین و ششمین روز بعد از عمل می‌تواند علل مختلفی داشته باشد و نقش پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) در این امر مشخص شده است. این پروتئین‌ها که تعدادی از آنها در سلول‌های بافت بیضه و اپی‌دیدیم شناسایی شده است، می‌تواند در جلوگیری از بروز آپوتوز در سلول‌های زایا نقش داشته باشد (۲۴،۲۳،۷). این پروتئین‌ها با اتصال به پروتئین P53 از ایجاد آپوتوز جلوگیری می‌کنند. این پروتئین‌ها در مراحل ابتدایی شوک حرارتی افزایش مشخصی نداشته و در جلوگیری از بروز آپوتوز نقش چندانی ندارند و زمانی که در مراحل بعدی شاخص سلول‌های آپوتوتیک بالا می‌رود، پروتئین‌های شوک حرارتی فعال می‌شوند (۲۵). این مطلب می‌تواند کاهش تدریجی سلول‌های آپوتوتیک با افزایش مدت زمان پس از عمل کریپتورکیدیسم تجربی را توجیه نماید. هم‌چنین پس از افزایش سریع سلول‌های آپوتوتیک در روز سوم، فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده می‌تواند موجب کاهش جمعیت

سلول‌های آپوتوتیک گردد. سلول‌های آپوتوتیک به علت ظهور سیگنال‌هایی در سطح خود سریعاً توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده تشخیص داده می‌شوند (۲۶). در سلول‌های پوششی اپی‌دیدیمی که در معرض درجه حرارت بالا و سایر استرس‌های محیطی قرار می‌گیرند، پس از چند روز پروتئین‌های شوک حرارتی ظاهر می‌شوند که پروتئین‌های سلول را در برابر اثرات مخرب استرس حرارتی محافظت می‌کنند. پروتئین‌های شوک حرارتی از دناچوره شدن پروتئین‌ها در طی استرس، نظیر درجه حرارت بالا، رادیکال‌های آزاد، واسطه‌های التهابی و عفونت‌ها جلوگیری می‌کنند (۷).

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که کریپتورکیدیسم تجربی باعث القاء آپوتوز در سلول‌های بافت پوششی اپی‌دیدیم می‌شود و تعداد سلول‌های آپوتوتیک در روز سوم و ششم بعد از عمل در حداکثر میزان خود است و با گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد. علت بروز آپوتوز احتمالاً ممکن است در ارتباط با استرس حرارتی و استرس اکسیداتیو باشد. البته نقش کریپتورکیدیسم در القاء آپوتوز سلول‌های بافت پوششی اپی‌دیدیم انسان نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

REFERENCES

1. Montella A, Pirino A. Morphological findings in cryptorchism in the adult male. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990;66:215-22.
2. Gnay Y, Bulut HE, Onarlioglu B, Başimoglu-Koca Y. Comparison of the effects of vasectomy and experimental cryptorchidism in rats: I. Testicular histology. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1998;75:61-69.
3. Ren L, Medan MS, Ozu M, Li C, Watanabe G, Taya K. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility and testicular endocrinology in adult male rats. *J Reprod Dev* 2006;52:219-28.
4. Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Oschry I, Lotan G, Kleen B, et al. Evaluation of damage to the testicular cells of golden hamsters caused by experimental cryptorchidism using flow cytometry and confocal microscopy. *Int J Androl* 2003;26:84-90.
5. Gracia Romero J, Ferrández Longás A, Guallart Labrador A, Moros García M, Alvarez Alegret R, García Julián G. Experimental cryptorchism in the Wistar rat. *Cir Pediatr* 1990;3:97-102.
6. Quinn FM, Crockard AD, Brown S. Secondary changes in the scrotal testis in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 1990;25:402-405.
7. Légaré C, Thabet M, Sullivan R. Expression of heat shock protein 70 in normal and cryptorchid human excurrent duct. *Mol Hum Reprod* 2004;10:197-202.
8. Esponda P, Bedford JM. The influence of body temperature and castration on the protein composition of fluid in the rat cauda epididymidis. *J Reprod Fertil* 1986;78:505-14.
9. Kocak I, Dundar M, Culhaci N. Epididymal changes associated with cryptorchidism in rats. *Asian J Androl* 2001;3:277-80.
10. Bedford JM. Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. *Adv Exp Med Biol* 1991;286:19-32.
11. Kaki T, Sofikitis N. Effects of unilateral cryptorchidism on contralateral epididymal sperm quality, quantity and fertilizing capacity. *Yonago Acta Medica* 1999;42:79-86.

12. Kawakami E, Tsutsui T, Saito S, Kakimoto T, Ogasa A. Changes in peripheral plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations and semen quality in normal and cryptorchid dogs during sexual maturation. *Lab Anim Sci* 1995;45:258-63.
13. Miura M, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T, Fujii J. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. *Fertil Steril* 2002;77:787-93.
14. Pinart E, Sancho S, Briz M, Bonet S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol* 1999;239:225-43.
15. Rossi LM, Pereira LA, de Santis L, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Ortiz V, et al. Sperm retrieval techniques in rats with suppressed spermatogenesis by experimental cryptorchidism. *Hum Reprod* 2005;20:443-47.
16. Royere D, Guérif F, Laurent-Cadoret V, Hochereau de Reviers MT. Apoptosis in testicular germ cell. *Int Congr Ser* 2004;1266:170-76.
17. Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997;18:159-65.
18. Yin Y, Dewolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol Reprod* 1998;58:492-96.
19. Yin Y, Stahl BC, Dewolf WC, Morgentaler A. P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *J Androl* 2002;23:64-70.
20. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999;61:393-99.
21. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, Sato N, Tanaka T. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002;8:118-23.
22. Barqawi A, Trummer H, Meacham R. Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J Androl* 2004;6:47-51.
23. Sarge KD, Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:191-77.
24. Kumagai J, Fukuda J, Kodama H, Murata M, Kawamura K, Itoh H, et al. Germ cell-specific heat shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. *Eur J Biochem* 2000;267:3073-78.
25. Guo CX, Ma J, Zhou XC, Liu YX. Expression of HSP70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testes. *Arch Androl* 2001;46:109-15.
26. Ohta Y, Nishikawa A, Fukazawa Y, Urushitani H, Matsuzawa A, Nishina Y, et al. Apoptosis in adult mouse testis induced by experimental cryptorchidism. *Acta Anat (Basel)* 1996;157:195-204.