

مطالعه تاثیر پیوگلیتازون بر عملکرد بافت بیضه متعاقب القاء شوک حرارتی اسکروتال در موش صحرائی

سعید محمدحسینی^۱، مهرداد نشاط‌قراملکی^{۲*}، سیداسماعیل صفوی^۳

۱- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران.

۳- استادیار گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: dr.neshat@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۹ پذیرش نهایی: ۹۴/۵/۲۶)

چکیده

شوک حرارتی در بیضه حتی برای یک بار و به مدت کوتاه، می‌تواند باعث تخریب بافت بیضه و اختلال در روند اسپرماتوژنز شود. پیوگلیتازون داروی ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان بوده که به‌طور گسترده در بیماران دیابتی استفاده می‌شود. هدف اصلی این مطالعه، ارزیابی تاثیر پیوگلیتازون بر بافت بیضه متعاقب شوک حرارتی اسکروتال می‌باشد. بدین منظور، تعداد ۵۴ سر موش صحرائی نر ویستار به‌صورت تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در ۳ گروه اول، به عنوان شاهد، اسکروتوم حیوانات در آب ۲۳ درجه سلسیوس قرار داده شد. در ۳ گروه دیگر (تیمارهای ۱) اسکروتوم به مدت ۱۵ دقیقه در آب ۴۳ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس حیوانات به مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز سرم فیزیولوژی دریافت کردند. در ۳ گروه بعدی (تیمارهای ۲) نیز پس از القاء شوک حرارتی اسکروتال، پیوگلیتازون به میزان ۲۰ mg/kg به مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز تزریق گردید. پس از اتمام دوره آزمایش، نمونه‌های بافت بیضه جهت مطالعات پاتولوژی و هیستومورفومتری اخذ گردید. نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) مورد تحلیل آماری قرار گرفت و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. در تیمارهای ۱، قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم آن در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار ولی ضخامت بافت بینابینی و کپسول بیضه افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). در تیمارهای ۲، قطر لوله‌های منی‌ساز در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ و ضخامت اپی‌تلیوم، در روزهای ۳۰ و ۶۰ افزایش معنی‌دار داشته و ضخامت بافت بینابینی در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ در مقایسه با تیمارهای ۱، کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). ضخامت کپسول بیضه فقط در روز ۶۰ کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0/01$). نتایج این مطالعه نشان داد که پیوگلیتازون از اثرات مخرب شوک حرارتی بر بافت بیضه کاسته و باعث بهبود شاخص‌های هیستومورفومتری بیضه می‌گردد.

کلید واژه‌ها: شوک حرارتی اسکروتال، پیوگلیتازون، بیضه موش، صحرائی.

مقدمه

قرار گرفتن بیضه در معرض گرما هرچند به مدت کوتاه و حتی برای یک بار به اختلال در روند اسپرماتوزن منجر می‌گردد که ترمیم و بهبودی آن می‌تواند ۶۰-۴۰ روز طول بکشد (Billig and Beumer, 1995). مکانیسم آسیب سلولی که به دنبال استرس حرارتی در بافت بیضه اتفاق می‌افتد، به صورت کامل بیان نشده است هر چند که، تحقیقات انجام شده نقش موثر اکسیژن رادیکال را در آسیب سلول‌های رده اسپرماتوزن پس از القاء شوک حرارتی نشان داده است (Ikeda et al., 1999). مطالعات اولیه نشان داده‌اند که گرما باعث القاء روند مرگ سلولی در بیضه می‌شود به طوری که، مرگ و میر در اسپرماتوسیت‌های اولیه و اسپرماتوگونی‌های میتوتیک قابل مشاهده می‌باشد (Lue et al., 1999). در استرس حرارتی فعالیت آنزیم‌های آندونوکلاز در سلول‌های زایگر، به تقسیم DNA به زنجیره‌های با وزن ملکولی پایین منجر می‌شود که این شکسته شدن داخل نوکلئوزومی DNA به عنوان شاخص آپوپتوز در سلول‌های زایای بافت بیضه به خصوص در اسپرماتوسیت‌های پکی تن و اسپرماتیدها قابل مشاهده است (Royer et al., 2004).

یکی از مکانیسم‌های احتمالی تأثیر شوک حرارتی بر سلول‌های بافت بیضه به واسطه تغییر در پروتئین‌هایی موسوم به پروتئین استرس حرارتی (heat shock proteien; HSP) در این سلول‌ها می‌باشد. در انواع گونه‌های سلولی، HSP در حالت طبیعی وجود دارد اما، میزان آن تحت شرایط استرس حرارتی به طور مشخصی افزایش می‌یابد (Sarge and Cullen, 1997; Danno et al., 2000). میزان پروتئین‌های استرس حرارتی در

مراحل ابتدایی آپوپتوز افزایش قابل ملاحظه‌ای نداشته و نقش چندانی در جلوگیری از بروز آپوپتوز ندارند و تنها در مراحل بعدی که شاخص سلول‌های آپوتوتیک بالا می‌رود، Hsp‌ها فعال‌تر می‌شوند (Guo et al., 2001). داروهای مختلف با مکانیسم‌های متفاوت جهت کاهش اثرات سوء استرس حرارتی بر سلول‌های رده اسپرماتوزن در بافت بیضه مورد استفاده قرار گرفته و در این میان استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها جهت غلبه بر این اثرات سوء بیشتر مد نظر بوده است (kim et al., 2010).

داروی پیوگلیتازون جزو طبقه تیازولیدین دیون می‌باشد. تیازولیدون‌ها کلاس جدیدی از داروهای خوراکی ضد دیابت هستند که به صورت اولیه باعث کاهش مقاومت به انسولین می‌شوند (Smith, 2001). این داروها به صورت انتخابی و گاه‌ا نسبتی باعث تقویت اثر انسولین بر کربوهیدرات‌ها و متابولیسم چربی در بیماران دیابتی می‌شوند (Toshinari et al., 1999). این دارو با کاهش مقاومت سلول‌های محیطی و همچنین کبد نسبت به انسولین قند خون را کاهش می‌دهد (Smith, 2001). داروی پیوگلیتازون بر سلول‌های بتای پانکراس موثر است و فعالیت آنها را بهبود بخشیده، همچنین مانع از وقوع آپوپتوز این سلول‌ها می‌شود (Smith, 2001). تیازولیدون‌ها تمایل بسیار زیادی به لیگاندهای PPAR- γ دارند که عضوی از ابرخانواده گیرنده‌های هسته‌ای است و بروز ژن‌های دخیل در متابولیسم چربی و کربوهیدرات‌های بافت هدف را کنترل می‌کند (Packiavathy and Rmalingam, 2010).

از اثرات دیگر تیازولیدین‌ها که مورد مطالعه واقع شده است، اثرات ضد سرطانی آنها است. گیرنده

ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای حدود 22 ± 2 درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس موش‌ها به صورت تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در گروه‌های اول، دوم و سوم به‌عنوان شاهد اسکروتوم و اندام خلفی در بن‌ماری با درجه حرارت ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد، سپس به ترتیب ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز به حیوانات سالی‌ن نرمال تجویز گردید. در گروه‌های چهارم، پنجم و ششم به‌عنوان تیمار ۱، پس از القاء شوک حرارتی، سالی‌ن نرمال به صورت داخل صفاقی به ترتیب ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز تجویز شد. در گروه‌های هفتم، هشتم و نهم به‌عنوان تیمار ۲، پس از القاء شوک حرارتی، داروی پیوگلیتازون با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (Meistrich *et al.*, 2003) و به ترتیب ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز تجویز شد. برای ایجاد شوک حرارتی، موش‌ها با استفاده از زایلازین به میزان ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن و کتامین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند (Mazzone *et al.*, 2007). اسکروتوم و اندام حرکتی خلفی موش‌ها برای ایجاد شوک حرارتی به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۴۳ درجه سلسیوس غوطه‌ور شدند (Abshenas *et al.*, 2011). پس از اتمام دوره، حیوانات آسان‌کشی شده و نمونه‌های بیضه جهت تهیه مقاطع بافتی به فرمالین بافر ۱۰ درصد منتقل گردید. با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافتی، مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون و رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین-اِئوزین، تهیه و مورد مطالعه هیستومورفومتری قرار گرفت.

برای انجام هیستومورفومتری بیضه، از عدسی چشمی مدرج $10 \times$ میکروسکوب مدل نیکون استفاده شد. این

PPAR- γ که در سلول‌های سرطانی کولون، پانکراس، پستان و خون وجود دارد، باعث ایجاد خاصیت ضد توموری در این داروها به ویژه پیوگلیتازون می‌شود (Gumieniczek *et al.*, 2008). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که این داروها علاوه بر توانایی در مهار کارسینوزن، التهاب و دیس‌لیپیدمی، دارای نقش آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی هستند و در مواقعی که استرس اکسیداتیو وجود دارد، موثر واقع می‌شوند (Ferwana *et al.*, 2013). مکانیسم‌های زیادی در توصیف اثرات آنتی‌اکسیدانی تiazولیدون‌ها مطرح شده است که مهم‌ترین آنها تعدیل بیان تحت واحدهای NADPH اکسیداز، افزایش تولید سوپراکسید دیسموتاز و مهار مسیر سیگنال‌های فاکتور هسته‌ای بتا (NF- κ B) و پروتئین کیناز فعال شده میتوزن (MAPKs) می‌باشد (Gumieniczek *et al.*, 2008).

با توجه به اثرات مفید داروی پیوگلیتازون به خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی آن، در مطالعه حاضر تاثیر مصرف دارو بر افزایش بقای سلول‌های ژرمینال و هم‌چنین تاثیر آن بر تخفیف التهاب و کاهش زمان بهبودی آسیب بیضه متعاقب القاء شوک حرارتی در موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، در زمستان سال ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. تعداد ۵۴ سر موش صحرائی نر با محدوده سنی ۸ هفته و با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم از مرکز تحقیقات رازی خریداری شد. تمامی موش‌ها در شرایط غذایی و مکانی استاندارد واقع شده و تحت چرخه ۱۲

مقایسه روز ۶۰ با روز ۳۰ افزایش معنی داری ($p < 0/05$) مشاهده شد (نمودار ۱، شکل های ۲ و ۴).

قطر لوله های منی ساز در گروه های تیمار ۲، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ پس از مصرف دارو به ترتیب برابر $228/69 \pm 10/89$ ، $297/71 \pm 9/04$ و $261/30 \pm 13/38$ میکرومتر بود. در مقایسه روز ۳۰ با روز ۱۵ کاهش معنی داری ($p < 0/001$) در قطر لوله های منی ساز دیده شد و در مقایسه روز ۶۰ با روز ۳۰، افزایش معنی داری ($p < 0/05$) مشاهده گردید (نمودار ۱، شکل های ۳ و ۵).

در مقایسه بین گروهی نیز در روز ۱۵ پس از القاء شوک حرارتی، تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه وجود نداشت. در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از القاء شوک حرارتی، افزایش معنی داری ($p < 0/001$) در قطر لوله های منی ساز در گروه های تیمار ۲ در مقایسه با گروه های تیمار ۱ وجود داشت و در مقایسه بین گروه های تیمار ۲ با شاهد نیز افزایش معنی داری ($p < 0/001$) در قطر لوله های منی ساز مشاهده شد (نمودار ۱).

ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز در گروه های شاهد در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $95/88 \pm 2/12$ و $93/84 \pm 1/65$ ، $94/35 \pm 1/97$ بود که در مقایسه بین روزهای مختلف تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۲).

ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز در گروه های تیمار ۱، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $87/21 \pm 3/28$ ، $73/65 \pm 5/04$ و $93/07 \pm 2/41$ میکرومتر بود. در مقایسه روز ۳۰ با روز ۱۵ کاهش معنی داری ($p < 0/05$) در ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز دیده

شد. از ۱۰ قسمت بزرگ که هر کدام خود به ده قسمت کوچکتر تقسیم گردیده، تشکیل شده است. به وسیله این عدسی می توان قسمت های مورد نظر را اندازه گیری نمود. سپس عدد حاصله در ضرائب مخصوصی که برای هر عدسی شیئی مورد استفاده متفاوت می باشد، ضرب گردیده و اندازه نهایی برحسب میکرومتر محاسبه می گردد.

در مورفومتری بافت بیضه فاکتورهای نظیر قطر لوله های منی ساز، ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز، ضخامت بافت بینابینی و ضخامت کپسول همبند در سه ناحیه متفاوت به صورت تصادفی در گروه های مختلف اندازه گیری و باهم مقایسه گردید (صفوی و همکاران، ۱۳۸۷)

تحلیل آماری داده ها: نتایج با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفته و p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اندازه قطر لوله های منی ساز در گروه های شاهد در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $285/13 \pm 9/47$ ، $282/27 \pm 10/63$ و $290/13 \pm 11/07$ میکرومتر بود که در مقایسه بین روزهای مختلف تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۱، شکل ۱).

قطر لوله های منی ساز در گروه های تیمار ۱، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $279/87 \pm 13/59$ ، $160/08 \pm 12/04$ و $198/19 \pm 9/44$ میکرومتر بود. در مقایسه روز ۳۰ با روز ۱۵ کاهش معنی داری ($p < 0/001$) در قطر لوله های منی ساز دیده شد و در

شد و در مقایسه روز ۶۰ با روز ۳۰، افزایش معنی‌داری ($p < 0/01$) مشاهده گردید (نمودار ۲).
 ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های تیمار ۲، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $۵۱/۷۶ \pm ۵/۲۹$ و $۲۴/۴۱ \pm ۲/۷۱$ ، $۸۲/۹۹ \pm ۲/۲۶$ میکرومتر بود. در مقایسه روز ۳۰ با روز ۱۵ کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) در ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز دیده شد و در مقایسه روز ۶۰ با روز ۳۰، افزایش معنی‌داری ($p < 0/01$) مشاهده گردید (نمودار ۲).

در مقایسه بین گروهی نیز در روز ۱۵ پس از القاء شوک حرارتی، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار ۱ و تیمار ۲ وجود نداشت. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار ۲ با گروه شاهد برآورد نگردید، ولی ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه تیمار ۱ در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری ($p < 0/01$) را نشان داد. در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از القاء شوک حرارتی، افزایش معنی‌داری ($p < 0/001$) در ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های تیمار ۲ در مقایسه با گروه‌های تیمار ۱ وجود داشت. در مقایسه بین گروه‌های تیمار ۲ با گروه‌های تیمار ۱ با گروه شاهد نیز تفاوت معنی‌دار ($p < 0/001$) مشاهده شد. همچنین، در مقایسه گروه‌های تیمار ۱ با گروه‌های شاهد در روزهای ۳۰ و ۶۰، افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) در ضخامت بافت بینابینی دیده شد (نمودار ۳).

در مقایسه بین گروهی نیز در روز ۱۵ پس از القاء شوک حرارتی، کاهش معنی‌داری ($p < 0/01$) در ضخامت بافت بینابینی در گروه‌های تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۱ وجود داشت. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار ۱ با گروه شاهد ۲ با گروه شاهد مشاهده نشد، ولی ضخامت بافت بینابینی در گروه‌های تیمار ۱ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری ($p < 0/01$) را نشان داد. در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از القاء شوک حرارتی، کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) در ضخامت بافت بینابینی در گروه‌های تیمار ۲ در مقایسه با گروه‌های تیمار ۱ وجود داشت. در مقایسه بین گروه‌های تیمار ۲ با گروه‌های تیمار ۱ شاهد نیز تفاوت معنی‌دار ($p < 0/001$) مشاهده شد. همچنین، در مقایسه گروه‌های تیمار ۱ با گروه‌های شاهد در روزهای ۳۰ و ۶۰، افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) در ضخامت بافت بینابینی دیده شد (نمودار ۳).

ضخامت بافت بینابینی در گروه‌های تیمار ۲، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $۵۱/۷۶ \pm ۵/۲۹$ و $۲۴/۴۱ \pm ۲/۷۱$ ، $۸۲/۹۹ \pm ۲/۲۶$ میکرومتر بود. در مقایسه روز ۳۰ با روز ۱۵ کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) در ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز دیده شد و در مقایسه روز ۶۰ با روز ۳۰، افزایش معنی‌داری ($p < 0/01$) مشاهده گردید (نمودار ۲).

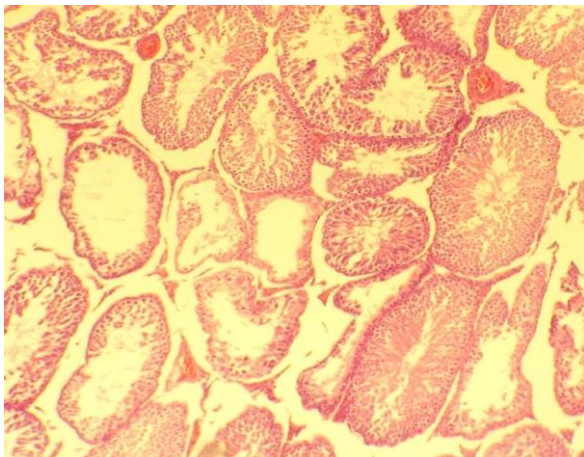
در مقایسه بین گروهی نیز در روز ۱۵ پس از القاء شوک حرارتی، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار ۱ و تیمار ۲ وجود نداشت. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار ۲ با گروه شاهد برآورد نگردید، ولی ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه تیمار ۱ در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری ($p < 0/01$) را نشان داد. در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از القاء شوک حرارتی، افزایش معنی‌داری ($p < 0/001$) در ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های تیمار ۲ در مقایسه با گروه‌های تیمار ۱ وجود داشت. در مقایسه بین گروه‌های تیمار ۲ با گروه‌های تیمار ۱ با گروه شاهد نیز تفاوت معنی‌داری ($p < 0/001$) در ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد (نمودار ۲).

ضخامت بافت بینابینی در گروه‌های تیمار ۲، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $۱۴/۷۹ \pm ۱/۶۵$ ، $۱۳/۲۶ \pm ۱/۰۶$ و $۱۳/۷۷ \pm ۱/۰۹$ میکرومتر بود که در مقایسه بین روزهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳).

ضخامت بافت بینابینی در گروه‌های تیمار ۱، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $۲۰/۹۱ \pm ۱/۱۹$

با روز ۳۰، کاهش معنی داری ($p < 0/01$) در ضخامت کپسول بیضه مشاهده شد (نمودار ۴).

در مقایسه بین گروهی نیز در روزهای ۱۵ پس از القاء شوک حرارتی، تفاوت معنی داری بین گروه‌های تیمار ۱ و تیمار ۲ وجود نداشت. همچنین، تفاوت معنی داری بین گروه‌های تیمار ۲ و تیمار ۱ با گروه شاهد برآورد نشد. در روز ۳۰ پس از القاء شوک حرارتی، تفاوت معنی داری در ضخامت کپسول بیضه در گروه‌های تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۱ وجود نداشت. در مقایسه بین گروه‌های تیمار ۱ و تیمار ۲ با گروه شاهد افزایش معنی داری ($p < 0/05$) مشاهده شد. در مقایسه گروه‌های تیمار ۲ با تیمار ۱ در روز ۶۰ پس از القاء شوک حرارتی، کاهش معنی داری ($p < 0/01$) در ضخامت کپسول بیضه مشاهده شد. در مقایسه گروه‌های تیمار ۲ و تیمار ۱ با شاهد نیز افزایش معنی داری ($p < 0/05$) در ضخامت کپسول بیضه دیده شد (نمودار ۴).

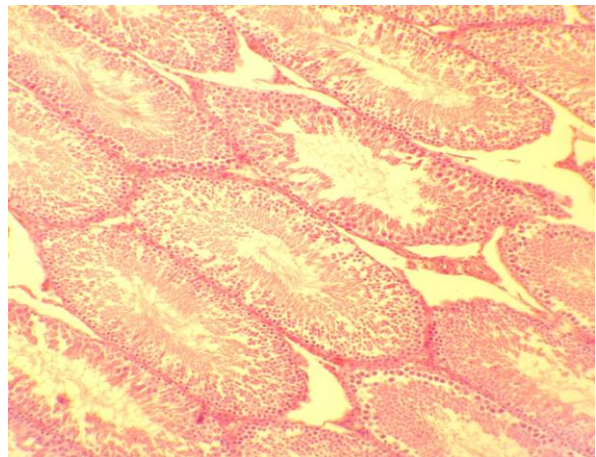


شکل ۲- مقطع بافت بیضه از گروه تیمار ۱ در روز ۳۰ پس از شوک حرارتی. کاهش محسوسی در ضخامت اپی‌تلیوم تعدادی از لوله‌های منی‌ساز مشاهده می‌شود. همچنین افزایش بافت همبند بینابینی نیز قابل ملاحظه است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین، درشت‌نمایی $100\times$).

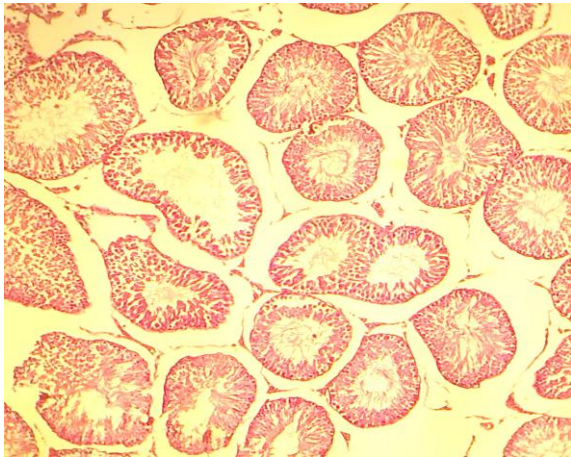
ضخامت کپسول بیضه در گروه‌های شاهد در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $40/29 \pm 1/30$ ، $39/52 \pm 1/27$ و $40/54 \pm 1/34$ میکرومتر بود که در مقایسه بین روزهای مختلف تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۴).

ضخامت کپسول بیضه در گروه‌های تیمار ۱، در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $40/39 \pm 1/46$ ، $62/73 \pm 4/08$ و $66/55 \pm 2/64$ میکرومتر بود. در مقایسه روزهای ۳۰ و ۶۰ با روز ۱۵ افزایش معنی داری ($p < 0/01$) در ضخامت کپسول دیده شد ولی در مقایسه روز ۶۰ با روز ۳۰، تفاوت معنی داری دیده نشد (نمودار ۴).

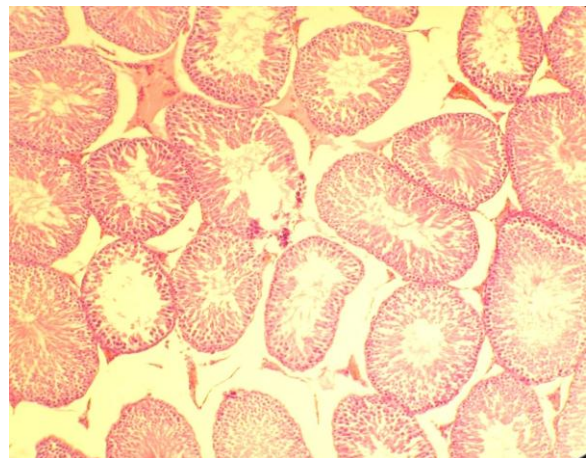
ضخامت کپسول بیضه در گروه‌های تیمار ۲ در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ به ترتیب برابر $40/80 \pm 1/57$ ، $62/22 \pm 2/92$ و $48/70 \pm 2/26$ میکرومتر بود. در مقایسه روز ۳۰ با روز ۱۵ افزایش معنی داری ($p < 0/01$) در ضخامت کپسول بیضه دیده شد، ولی در مقایسه روز ۶۰



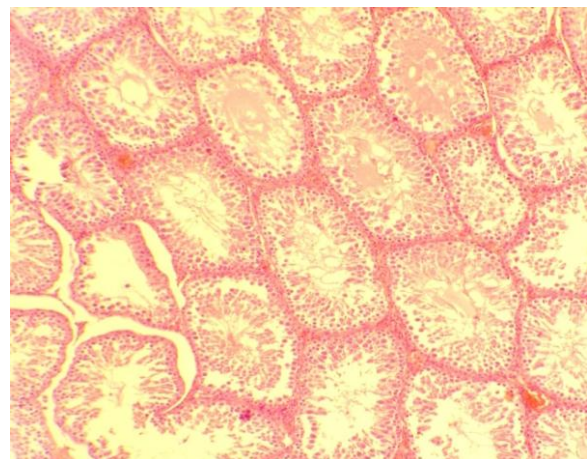
شکل ۱- مقطع بافت بیضه در گروه شاهد. قطر لوله‌های منی‌ساز، ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌ها و مقدار بافت همبند بینابینی طبیعی است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اتوزین، درشت‌نمایی $100\times$).



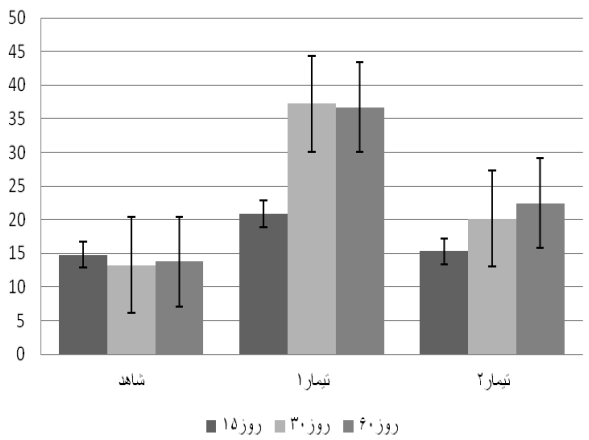
شکل ۴- مقطع بافت بیضه از گروه تیمار ۱ در روز ۶۰ پس از شوک حرارتی. ترمیم جزعی در بافت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز و افزایش قطر لوله‌ها در مقایسه با روز ۳۰ دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 100$).



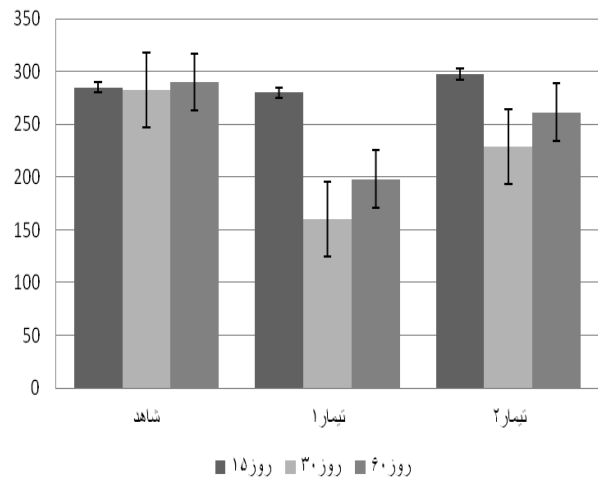
شکل ۳ - مقطع بافت بیضه از گروه تیمار ۲ در روز ۳۰ پس از شوک حرارتی. ترمیم و افزایش ضخامت بافت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز مشخص بوده و کاهش بافت بینابینی و افزایش قطر لوله‌ها نیز دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 100$).



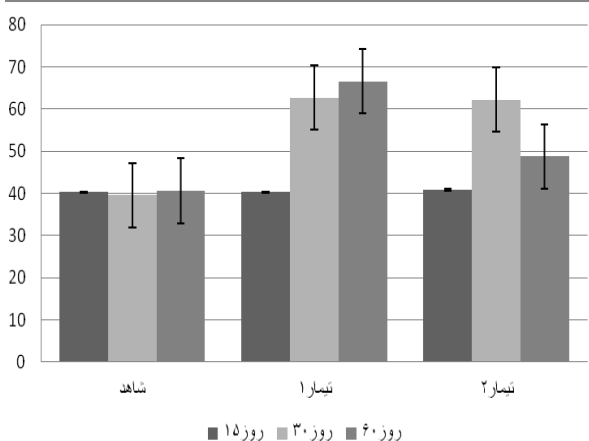
شکل ۵ - مقطع بافت بیضه از گروه تیمار ۲ در روز ۶۰ پس از شوک حرارتی. افزایش قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌ها و همچنین کاهش بافت بینابینی محسوس است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 100$).



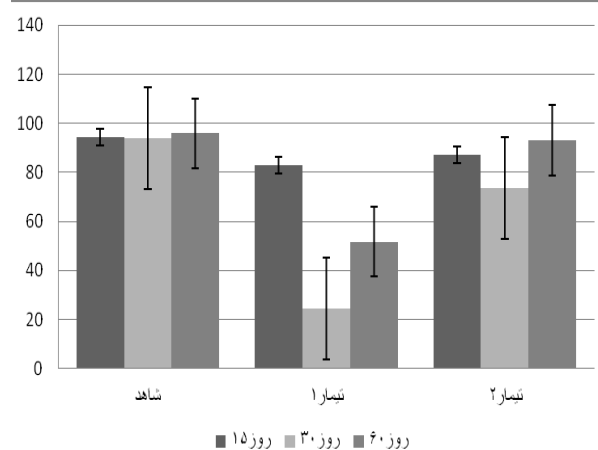
نمودار ۳- میانگین ضخامت بافت بینابینی (میکرومتر)



نمودار ۱- میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر)



نمودار ۴- میانگین ضخامت کپسول بیضه (میکرومتر)



نمودار ۲- میانگین ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر)

سلسیوس، تغییرات مشخصی در فاکتورهای هیستومورفومتری بیضه ایجاد می‌شود. در مطالعه انجام شده توسط عمواغلی تبریزی و خاکپور در سال ۱۳۹۳ مشخص گردید که ایجاد شوک حرارتی در بیضه موش باعث کاهش معنی‌دار قطر لوله‌های منی‌ساز و کاهش درصد اسپرماتوزن در مقایسه با گروه شاهد گردید (عمواغلی تبریزی و خاکپور، ۱۳۹۳).

بحث و نتیجه‌گیری

گزارشات قبلی نشان می‌دهد که القاء شوک حرارتی هرچند به مدت کوتاه، باعث تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه شده و موجب اختلال در روند اسپرماتوزن می‌گردد (Meistrich et al., 2003).

در مطالعه حاضر مشخص گردید پس از ایجاد شوک حرارتی به مدت ۱۵ دقیقه و با دمای ۴۳ درجه

سلول‌های زایا افزایش می‌یابد و علاوه بر آن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز دچار اختلال می‌شود (Ikeda *et al.*, 1999). نتایج بررسی‌ها مؤید آن است که استرس اکسیداتیو ممکن است نقش مهمی در القاء آپوپتوز تحت شرایط استرس حرارتی داشته باشد (Buttke and Sandstrom, 1994).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز با بی‌اثر کردن H_2O_2 یک اثر محافظتی مشخصی در برابر آپوپتوز ناشی از استرس حرارتی یا اکسیداتیو ایجاد می‌کند. مسیر داخل سلولی القاء آپوپتوز توسط H_2O_2 چندان مشخص نیست. سمیت سلولی H_2O_2 به نظر می‌رسد با رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار فعال آن مرتبط باشد. از سایر رادیکال‌های آزاد که ممکن است در آپوپتوز نقش داشته باشند، پراکسی نیتريت می‌باشد که در اثر تعامل بین نیتريك اكسيد (NO) و سوپراکسید تولید می‌شود و اخیراً مشخص شده در القاء آپوپتوز نقش مهمی دارد. سنتز NO در سلول‌های زایای طبیعی قابل تشخیص نبوده ولی در سلول‌های زایای آپوپتوتیک در بیضه انسان تشخیص داده شده است (Kumagai and Kodama, 2002).

تحقیقات نشان داده است استرس حرارتی میزان پراکسیداسیون لیپیدی بافت بیضه را افزایش داده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را کاهش می‌دهد (عمواوغلی تبریزی و خاکپور، ۱۳۹۳).

در تحقیق حاضر، تاثیر داروی پیوگلیتازون پس از ایجاد شوک حرارتی در بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های هیستومورفومتری در گروه‌های تحت درمان با داروی

نشان داده شده است که به دنبال افزایش دما در بیضه، اسپرماتوسیت‌های مرحله پاکي تن و اسپرماتیدهای اولیه سریعاً واکنش نشان داده و آسیب می‌بینند (Setchell *et al.*, 2001). مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر، وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز در سلول‌های زایای بافت بیضه پس از قرار گرفتن در درجه حرارت بالا در محوطه بطنی را مشخص کرده است (Shikone and Biling, 1994).

در استرس حرارتی، فعالیت آنزیم‌های آندونوکلاز منجر به تقسیم DNA در سلول‌های زایگر، به زنجیره‌های با وزن ملکولی پایین می‌شود که این شکسته شدن داخل نوکلئوزومی DNA به عنوان شاخص آپوپتوز در سلول‌های زایای بافت بیضه به خصوص در اسپرماتوسیت‌های پاکي تن و اسپرماتیدها قابل مشاهده است (Billig and Beumer, 1995; Royer *et al.*, 2004).

یکی از مکانیسم‌های احتمالی تأثیر شوک حرارتی بر سلول‌های بافت بیضه تغییر در پروتئین‌هایی موسوم به پروتئین استرس حرارتی (heat shock proteien) در این سلول‌ها می‌باشد. در انواع گونه‌های سلولی hsp در شرایط طبیعی وجود دارد اما میزان آن تحت شرایط استرس حرارتی به طور مشخصی افزایش می‌یابد (Sarge and Cullen, 1997; Danno *et al.*, 2000). پروتئین‌های استرس حرارتی از دنا توره شدن پروتئین‌ها و تجمع آن در سلول‌هایی که در معرض تغییراتی همچون درجه حرارت بالا، واسطه‌های التهابی یا عفونت قرار می‌گیرند، جلوگیری می‌کند (Sarge and Cullen, 1997). با افزایش حرارت در بافت بیضه به دنبال کریپتورکیدیسم میزان پراکسیداسیون چربی در

رخداد التهاب و فعال شدن NADPH جلوگیری می کند (Ajit *et al.*, 2010).

در طول ایسکمی و به خصوص متعاقب ریپرفیوژن، تولید رادیکال های آزاد بیشتر از سیستم آنتی اکسیدانی آندوژن فعال می شود و رادیکال های آزاد باعث تقویت پراکسیداسیون چربی خواهد شد. در طول ایسکمی مقدار زیادی رادیکال آزاد اکسیژن، فاکتور یک آندوتلیالی و فاکتور نکروزدهنده توموری آلفا (TNF- α) تولید و آزاد می شوند که همه آنها باعث آسیب متنوع عروقی می شوند. پیوگلیتازون می تواند با کاهش اثرات TNF- α و سایر رادیکال های آزاد اکسیژن از اثرات آسیب زای ایسکمی و ریپرفیوژن بکاهد (Jagdish and Nehal, 2011).

باتوجه به مجموعه فوق، استفاده از داروی پیوگلیتازون در موارد آسیب بافت بیضه به دنبال شوک حرارتی پیشنهاد می گردد. تعیین اثرات جانبی مصرف دراز مدت این دارو و بررسی اثرات محافظتی آن با دوزهای مختلف در شوک های حرارتی نیازمند مطالعات آتی می باشد.

پیوگلیتازون نشان می دهد داروی پیوگلیتازون باعث بهبود شاخص های هیستومورفومتری بیضه پس از ایجاد شوک حرارتی می شود.

باتوجه به اینکه شوک حرارتی در بافت بیضه موجب بروز استرس اکسیداتیو و ظهور رادیکال های آزاد در بافت بیضه می گردد (Ikeda *et al.*, 1999)، به نظر می رسد اثرات آنتی اکسیدانی داروی پیوگلیتازون (Gumieniczek *et al.*, 2008)، از علل بهبود قابل توجه بافت بیضه به دنبال القاء شوک حرارتی می باشد. نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نیز موید اثرات آنتی-اکسیدانی پیوگلیتازون و اثرات محافظتی و درمانی آن در استرس های اکسیداتیو می باشد. طی تحقیقی مشخص گردیده است که مصرف پیوگلیتازون در خرگوش های دیابتی شده توسط آلوکسان، موجب ایجاد اثرات آنتی اکسیدانی در بافت بیضه می گردد (Gumieniczek *et al.*, 2008). پیوگلیتازون نقش مهمی را در تولید و دوام اثر آنزیم های آنتی اکسیدانی و کاهش تشکیل رادیکال های آزاد اکسیژن بر عهده دارد (Packiavathy and Rmalingam, 2010). فعال شدن PPAR- γ از

منابع

- صفوی، ا.، شهروز، ر.، صدرخانلو، ر. و صراف زاده، ف. (۱۳۸۷). مطالعه هیستومورفومتری بیضه در کریپتورکیدیسم تجربی یک طرفه در موش صحرائی بالغ. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱، بهار ۸۷، صفحات: ۶۵-۵۷.
- عمواغلی تبریزی، ب. و خاکپور، م. (۱۳۹۳). مطالعه اثرات محافظتی عصاره ریزوم زنجبیل بر آسیب ناشی از استرس گرما در بیضه موش. مجله آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی، دوره ۷، شماره ۳، صفحات: ۱۹۲-۱۸۳.

- Abshenas, J., Babaei, H., Zare, M.H., Allahbakhshi, A. and Sharififar F. (2011). The effects of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. *Veterinary Research Forum*, 2(4): 242-247.
- Ajit, V.Gopabandhu, J. and Poduri, R. (2010). Pioglitazone attenuates prostatic enlargement in diet-induced insulin-resistant rats by altering lipid distribution and hyperinsulinaemia. *British Journal of Pharmacology*, 161(8): 1708-1721.
- Billig, H. and Beumer, T. (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stage. *Endocrinology*, 136: 5- 12
- Buttke, T. and Sandstrom, P. (1994). Oxidativ stress as mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 15: 7- 70
- Danno, S., Itoh, K. and Matsuda, T. (2000). Decreased expression of mouse Rbm 3, a cold-shock Protein, in sertoli cells of cryptorchid testis. *American Journal of Pathology*, 156(5): 1685-1692
- Ferwana, M., Firwana, B., Hasan, R., Al-Mallah, M., Kim, S., Montori V., *et al.* (2013). Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Journal of the British Diabetic Association*, 30(9): 1026-1032.
- Gumieniczek, A., Hopkała, H. and Zabek, A. (2008). Protective effects of a PPAR gamma agonist pioglitazone on anti-oxidative system in testis of diabetic rabbits, *Die Pharmazie*, 63(5): 377-378.
- Guo, C., Zhou, x. and Liu, Y. (2001). Expression of HSP 70-2 gene during Germ cell. *Molecular and Cellular Biology*, 8: 3260- 3266.
- Ikeda, M., Kodama, H. and Fududa, J. (1999). Role of radical oxygen species in the rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of Reproduction*, 61: 393-399.
- Jagdish, K. and Nehal, S. (2011). Comparison effect of Pioglitazone and Glimepiride alone on renal function marker in experimentally induced renal damage in diabetic rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(3): 72-76.
- Kim, Y., Kim, G., Shin, J., Kim, K. and Lim, J. (2010). Effect of Korea red ginseng on testicular tissue injury after testicular torsion and detorsion. *Korean Journal of Urology*, 51(11):794-799.
- Kumagai, A., Fukuda, J., and Kodama, H. (2000). Germ cell- specific heat shock protein105 binds to P53 in a temperature – sensitive manner in rat testis. *European Journal of Biochemistry*, 267: 3073-3078.
- Lue, Y., Hikim, A., Swerdloff, R. and Taing, K. (1999). Single exposure to heat induces stage – specific germ cell apoptosis in rat. *Endocrinology*, 140: 1709-1717.
- Mazzone, T. (2007). Effect of pioglitazone compared with glimepride on carotid intima-media thickness in type 2. *US Cardiology*, 4(1): 25-30.

-
- Meistrich, M., Wilson, G. and Porter, K. (2003). Restoration of spermatogenesis in DBCP – treated rats by hormone suppression. *Toxicological Sciences*, 76(2): 418-426.
 - Packiavathy, A. and Rmalingam, M. (2010). Effect of pioglitazone on inflammatory mediators in type 2 diabet. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 1(3): 869-872.
 - Royere, D., Guerif, F. and Laurent, V. (2004). Apoptosis in testicular germ cell. *International Congress Series*, 1266: 170-176.
 - Sarge, K. and Cullen, K. (1997). Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53: 191-197.
 - Setchell, B., Ploen, L. and Ritzen, E. (2001). Reduction of long term effects of local heating of the testis by treatment of rats with a GnRH agonist and an antiandrogen. *Reproduction*, 122: 255-263.
 - Shikone, T. and Billing, H. (1994). Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biology of Reproduction*, 51: 866-872.
 - Smith, U. (2001). Pioglitazone: mechanism of action. *International journal of clinical practice. Supplement Sep.*, 121: 8-13.
 - Toshinari, T., Hitoshi, A., Yukihiro, N., Haruhisa, Y., Erika, N. and Kenichi, K. (1999). Pioglitazone prevents mice from multiple low-dose streptozotocin induced insulinitis and diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 44(2): 107-114.

Study of the effect of pioglitazone on testicular function after scrotal heat induced shock in the rat

Mohammad Hoseini, S.¹, Neshat Gharamaleki, M.^{2*}, Safavi, E.³

- 1- Graduate of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Clinical Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Basic Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author's email: dr.neshat@iaut.ac.ir
(Received: 2013/11/30 Accepted: 2015/8/17)

Abstract

Testicular heat shock even for a single short period can induce destruction in testicular tissue and disturbances spermatogenesis. Pioglitazone is an anti-inflammatory and anti-oxidative drug which is used widely in diabetic patients. The main aim of this study is evaluation of effect of pioglitazone on testicular tissue after scrotal heat shock. For this purpose, 54 male Wistar rats were randomly divided in to 9 of 6 rats. In the first three groups which were used as control, the scrotum of animals were submerged in 23^{0c} water. In the other three groups (treatment 1), the scrotum was submerged in 43^{0c} water for 15 minutes and then the animals received normal saline for 15, 30 and 60 days. In the final three groups (treatment 2) after scrotal heat shock induction, pioglitazone was injected at a dose of 20 mg/kg for 15, 30 and 60 days. At the end of the experimental periods, testicular tissue samples were obtained for pathological and histomorphometrical studies. The results were analyzed with one-way ANOVA and Tukey test and $p < 0.05$ was considered significant. In treatment 1 group the diameter of seminiferous epithelial tubules and epithelial thickness significantly decreased ($p < 0.05$), but interstitial tissue and testicular capsules thickness significantly increased in comparison to control group ($p < 0.05$). In treatment 2 groups, the diameter of seminiferous tubules on the 15th, 30th and 60th days and tubular epithelial thickness on the 30th and 60th days significantly increased ($p < 0.05$) and interstitial tissue thickness on the 15th, 30th and 60th days were significantly decreased in comparison to treatment 1 groups ($p < 0.05$). Testicular capsule significantly decreased in thickness only on the 60th day ($p < 0.001$). The result of this study confirmed that pioglitazone decreased the destructive effects of heat shock on testicular tissue and significantly improved the testicular histomorphometrical induces.

Key words: Scrotal heat shock, Testis, Pioglitazone, Rat