

## تأثیر یرقان انسدادی بر روی گنادوتروپین‌ها و آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه موشهای صحرایی بالغ

ابراهیم نصیری M.Sc.\*، سید محمد حسین نوری موگهی Ph.D.\*، احمدرضا دهپور Ph.D.\*

علی اکبر امیرزرگر Ph.D.\*، محمد بربرستانی Ph.D.\*، میرعباس عبدالوهابی Ph.D.\*

محمد اکبری Ph.D.\*، علیرضا رفیعی Ph.D.\*

\* دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم تشریح

\* دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه فارماکولوژی

\* دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ایمونولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۴۴۷-۴۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

### چکیده

✱ **هدف:** بررسی تغییرات احتمالی هورمونهای گنادوتروپین، Inhibin B و میزان آپوپتوز سلولهای زاینده در موش کلستاتیک

✱ **مواد و روشها:** در این مطالعه از سه گروه هشت سری موش صحرایی به شرح ذیل استفاده شد: شاهد (بدون جراحی)، شاهد جراحی یا SHAM (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی). سه هفته بعد از جراحی غلظت سرمی هورمونهای FSH و LH با روش ایمنورادیومتریک اسی (IRMA)، میزان Inhibin B با روش آنزیم ایمنو اسی (ELISA) و آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه موش با روش TUNEL اندازه گیری شد.

✱ **یافته‌ها:** نتایج این پژوهش بیانگر کاهش معنی دار هورمونهای FSH و LH در گروه کلستاتیک نسبت به گروههای شاهد و شاهد جراحی بود ( $P < 0/05$ ). در حالیکه سطح پلاسمای Inhibin B در گروه کلستاتیک نسبت به گروههای دیگر افزایش قابل ملاحظه‌ای ( $P < 0/05$ ) را نشان داد، ولی تغییر معنی دار در شاخص آپوپتوز سلولهای زاینده گروه کلستاتیک نسبت به گروههای دیگر مشاهده نشد ( $P < 0/19$ ).

✱ **نتیجه‌گیری:** یرقان انسدادی حاد باعث کاهش هورمونهای گنادوتروپینی می‌شود ولی تأثیر معنی داری روی آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه ندارد. لذا به نظر می‌رسد که آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه موشهای بالغ تنها وابسته به هورمونهای گنادوتروپین نیست و امکان دخالت فاکتورهای دیگر نیز در این خصوص وجود دارد.

**کل واژگان:** یرقان انسدادی، گنادوتروپینها، آپوپتوزیس و اسپرمانوژنزیس

## مقدمه

کلتناز اسدادی حاد نوعی بیماری کبدی است که بیشتر به علت گیر کردن سنگ صفراوی در مجرای مشترک، آمپول واثر پاکارسینومی سرپانکراس بوجود می‌آید. دوره این بیماری سه هفته است که بعد از این دوره بیماری مزمن شده و تبدیل به سبروز کبدی می‌گردد. این بیماری با تجمع نمکهای صفراوی و بیلی روبین در پلاسما همراه است. تحقیقات جدید در کلتناز اسدادی افزایش اوبیوئیدی درون‌ساز، نیتریک اکساید، استرس‌های اکسیداتیو و سیتوکین‌ها را در پلاسما نشان می‌دهد (۱-۵). بیشتر این فاکتورها روی محور جنسی مؤثر بوده، باعث تغییر در ترشح گنادوتروپین‌ها می‌گردند. اوبیوئیدهای اندوژن ترشح گنادوتروپین‌ها را با مهار هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) مترشح از هیپوتالاموس، کاهش می‌دهد (۶). نیتریک اکساید اگزوزن باعث مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیز، گناد (HPG) می‌شود (۷) که اثرات آن بر آپوپتوز، بر اساس میزان آن در بافت و سلول، متفاوت است. در بعضی از شرایط باعث القاء آپوپتوز می‌شود. افزایش استرس‌های اکسیداتیو در افراد دیابتیک و افزایش سیتوکین‌ها در بیماری‌های التهابی باعث کاهش گنادوتروپین‌ها می‌شود (۴، ۵). هورمونهای محور جنسی فرایند استروئیدوژنز و اسپرماتوژنز را کنترل می‌کند. هورمون لوتینه (LH) از هیپوفیز قدامی ترشح شده و سلول‌های لایدیگ بیضه را در جهت تولید تستوسترون و ۱۷-بتا استرادیول تحریک می‌کند. تستوسترون نیز به صورت فیدبک منفی ترشح هورمون LH را کنترل می‌کند (۸). هورمون محرک - فولیکولی (FSH)، فرآیند اسپرماتوژنز را در سلول‌های زاینده، تولید هورمون مهاری B<sup>۲</sup> را در سلول سرنولی تحریک می‌کند (۹، ۱۰). هورمون مهاری B نیز به صورت پس خورد منفی بر ترشح FSH تأثیر می‌گذارد (۱۱). هورمونهای مهاری از دو پیشید غیر مشابه (بنام زیر واحدهای آلفا و بتا) تشکیل شده‌اند که با پیوندهای دی سولفید به هم متصل هستند. دو نوع هورمون مهاری A و B کشف شده‌اند که زیر واحد آلفای آنها یکسان است. اما زیر واحد بتای آنها متفاوت و در عین حال مرتبط با هم است. بنابراین هورمونهای مهاری دارای سه زیر واحد آلفا، بتا - A و بتا - B هستند (۱۲). از آنجائیکه مقدار هورمون مهاری A (آلفا و بتا - A) در سرم جنس نر خیلی کم (<2pg/ml) است، فاقد اهمیت فیزیولوژیک است (۱۳). ولی مقدار هورمون مهاری B (آلفا و بتا - B) قابل توجه بوده و به عنوان شاخص خوب<sup>۱</sup> اسپرماتوژنیز و عملکرد سلولهای بیضه محسوب می‌شود (۱۴).

بقای سلولهای زاینده بیضه وابسته به حضور گنادوتروپین است و کاهش آن منجر به افزایش آپوپتوز سلولهای زاینده می‌گردد (۱۵). بنابراین بنظر می‌رسد که در کلتناز اسدادی احتمال تغییر در ترشح گنادوتروپین و میزان آپوپتوز سلولهای زاینده در موش کلتناژیک وجود دارد.

## مواد و روشها

## \* مواد

کیت‌های ایمنونورادیومتریک (IRMA)<sup>۵</sup> برای سنجش هورمون‌های

FSH و LH از شرکت دی - اس - ال (DSL) (ویستر، نگراس، آمریکا) خریداری شد. کیت آنزیم ایمنونواسی<sup>۶</sup> هورمون مهاری B از شرکت سروتک (آکسفورد، انگلستان) تهیه گردید.

و برای بررسی آپوپتوز سلولهای زاینده از کیت تشخیصی Klenow-FragEL DNA Fragmentation از شرکت Oncogen (USA, MI) استفاده گردید.

موشهای صحرایی نر ۱۲-۱۶ هفته‌ای با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم، نژاد Sprague-Dawley از بخش حیوانات آزمایشگاهی انیستیتوپاستور کرج تهیه گردیدند.

## \* روشها

قبل از انجام مطالعه، موشها به بخش حیوانات آزمایشگاهی بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی منتقل و با حیوانات بر اساس مقررات و دستورالعملهای تدوین شده NIH<sup>۷</sup> رفتار شد. موشها بطور تصادفی به سه گروه هشت تایی، گروه شاهد (بدون جراحی)، گروه شاهد - جراحی یا sham (جراحی بدون اسداد مجرای صفراوی) و گروه آزمایش یا کلتناژیک (جراحی همراه با اسداد مجرای صفراوی) تقسیم شدند و در تمام مدت مطالعه غذای پلیت و آب به میزان کافی در اختیار حیوانات قرار داشت و با برقراری سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. اسداد مجرای صفراوی بر اساس پروتکل موجود در مطالعات قبلی صورت گرفت (۱۶).

برای بیهوشی کامل از کتامین (داخل صفاتی ۵۰ mg/kg) و کلورپرومازین (۱۰ mg/kg) لاپاراتومی استفاده شد.

در گروه شاهد - جراحی، مجرای صفراوی با استفاده از پنست فقط مشاهده گردید، در گروه کلتناژیک، مجرای صفراوی با دو گره در فاصله چند میلی متری بسته شد و حدفاصل بین دو گره با قیچی قطع و جدار شکم در دو لایه فاسیا و پوست بخیه شد. میزان مرگ و میر بعد از عمل در گروه آزمایش حدوداً ۱۰ درصد بود. بعد از ۲۱ روز موشهای صحرایی ابتدا با اثر بیهوش و سپس قطع نخاع شدند و مقدار ۵ سی سی خون با سرنگ استریل از قلب استخراج و سرم با سانتریفوژ نمونه‌ها در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید.

سرم‌ها تا زمان آزمایش در منهای هفتاد درجه نگهداری و همزمان بیضه‌های حیوان برداشته و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در محلول فسفات‌بوسون برای ارزیابی آپوپتوز سلولهای زاینده نگهداری شد.

مقادیر FSH سرم با روش ایمنونورادیومتریک و استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد FSH موش صحرایی متصل به لوله‌های پلی‌استیرنی با قابلیت تسخیر FSH موش صحرایی در حضور آنتی‌بادی مونوکلونال ثانویه حاوی پدیده رادیواکتیو

1. Ginadotropin-Releasing Hormone
2. Hypothalamus Pitiatary Gonad
3. Inhibin B
4. Good Marker
5. Immunoradiometric Assay
6. Immunoassay Kit
7. Health National-Institute

رنگ آمیزی شدند. سپس نمونه‌ها چهار با در آب مقطر (dH2O) شستو داده شدند و بعد از آن زمینه نمونه‌ها با رنگ متیل گرین<sup>۱</sup> بمدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی متضاد گردیدند. بعد از آبگیری با الکل و گزیزیل، توسط چسب انتالن روی نمونه‌ها با لامل پوشانده شد.

شاخص آپوپتوز با شمارش سلولهای TUNEL مثبت در ۵۰ برش عرضی از مناطق مختلف لوله‌های منی ساز هر گروه محاسبه گردیدند (۲۳). از آنجائیکه میزان آپوپتوزیس در سلولهای اسپرماتوگونی به طور طبیعی بیشتر است در این پژوهش شاخص آپوپتوزیس سلولهای اسپرماتوگونی را برای بررسی آپوپتوز سلولهای زاینده انتخاب نموده‌ایم. پس از شمارش سلولهای اسپرماتوگونی آپوپتوتیک و غیر آپوپتوتیک شاخص آپوپتوز برای هر لوله منی ساز با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید:

$$100 \times \frac{\text{تعداد سلولهای آپوپتوتیک}}{\text{تعداد کل سلولها}} = \text{اندیس آپوپتوتیک}$$

#### • آنالیز آماری

تمامی مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار استاندارد نشان داده شده است. ارزیابی آماری داده با آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA انجام شد. بر این اساس ارزش P کمتر از  $0.05 < P$  از لحاظ آماری معنی دار است.

ضد FSH موش صحرائی، بر اساس دستورالعملهای شرکت تولید کننده کیت و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اندازه گیری شد (۸).

مقادیر LH سرم با روش ایمنورادپومتریک (IRMA) رقابتی با استفاده از LH رتی حاوی بدید رادیواکتیو (۱۲۵) و آنتی بادی منوکلونال ضد بدید رادیواکتیو تهیه شده در خرگوش، بر اساس دستورالعملهای شرکت تولید کننده کیت و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اندازه گیری شد (۸).

مقدار هورمون مهارى B سرم با روش ساندویچ ایمنوناسی آنزیم (ELISA) بعنوان روشی با حساسیت و ویژگی بالا انجام شد. برای افزایش حساسیت و ویژگی نتها ابتدا نمونه‌ها با افزودن SDS<sup>۱</sup> به مدت سه دقیقه در ۱۰۰°C حرارت داده شده و پس از سردت با محلول ۶ درصد پروکسید هیدروژن نازم مجاور گردید. این سنجش بر اساس آنتی بادی نسخیر کننده تحت واحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  inhibin است. برای این منظور آنزیم الکالین فسفاتاز با واحد آلفا کونژوگه گردیده و حاصل جذب فرایند آنالیز فتومتریک در طول موج ۴۹۰nm خوانده می‌شود. وقت این تست تقریباً ۱۵pg/mL است و بر اساس دستورالعملهای شرکت تولید کننده سنجیده شد (۸).

#### • نشاندار کردن برشهای بافتی بیضه

برای تعیین سلولهای آپوپتوتیک از روش TUNEL بر اساس دستورالعملهای Klenow-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit (Oncogene Research USA) استفاده گردید. برشهای بافتی در گزیزیل پارافین‌گیری، سپس در درجات مختلف الکل آبگیری و در نهایت با PBS شستو شدند. برای تراواسازی، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با  $20 \mu\text{g/mL}$  محلول پروتیناز K رقیق شده با (10mm Tris-HCL, PH7.4) مجاور شد. برای غیر فعال ساختن آنزیم پراکسیداز درون‌ساز نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول ۳ درصد H2O2 در متانول قرار داده شدند. برای نشاندار کردن درجا نمونه‌ها، از واکنش نشاندار سازی Klenow، با استفاده از Digoxigenin-ddUTP غیر رادیواکتیو استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های بافتی با آنزیم دی‌آکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز انتهایی (TdT) و بازهای آلی Digoxigenin-ddUTP در دمای ۳۷°C به مدت ۱/۵ ساعت در اتاقک مرطوب انکوبه شد و گروههای هیدروکسیل انتهایی ۳' قطعات DNA با ماده Digoxigenin نشاندار شد، سپس واکنش با افزودن بافرهای Stop و Block بترتیب به مدت ۱۰ و ۵ دقیقه متوقف گردید. آنگاه با افزودن آنتی بادی Antidigoxigenin کونژوگه شده نمونه‌ها با پراکسیداز برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و بعد در محلول TBS 1X چهار بار شستو داده شد. با افزودن محلول حاوی ۰/۰۵ DAB<sup>۲</sup> بمدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق

#### یافته‌ها

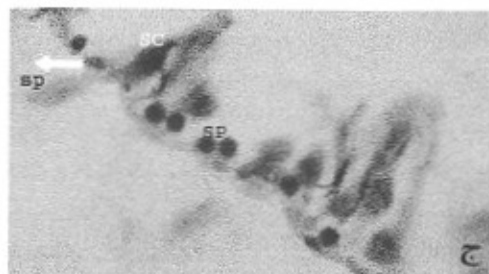
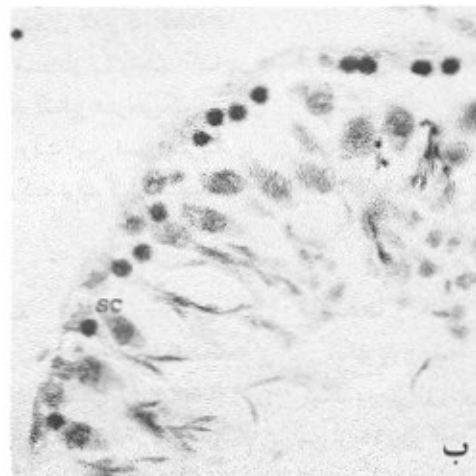
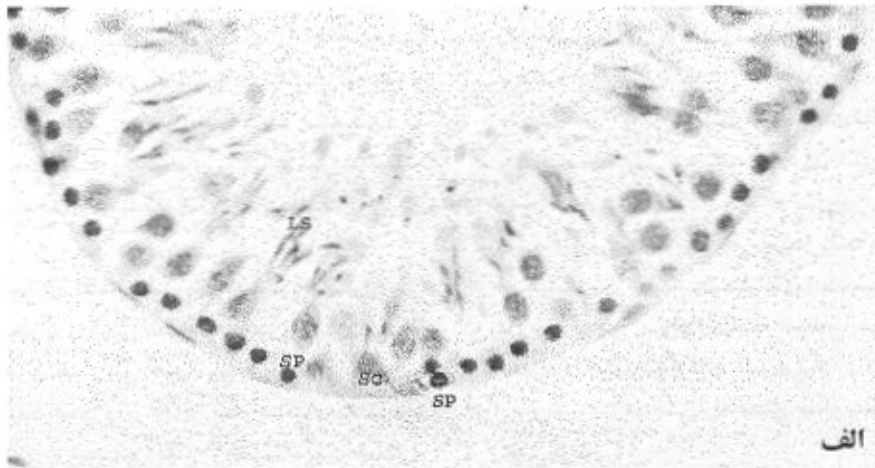
یک روز بعد از لاپاراتومی موشهای کلساتیک علائم کلستازیس (زردی، ادرار تیره، و استاتوره) را بروز دادند و پس از ۲۱ روز کشته شدند و هورمونهای FSH، LH و Inhibin در سرم اندازه‌گیری شد. میزان آپوپتوز سلولهای زاینده در هر گروه با شمارش سلولهای زاینده TUNEL مثبت در مجاری منی ساز گرد بررسی شد.

#### • الف) کلستازیس موجب کاهش معنی دار هورمون‌های LH و FSH می‌شود.

با توجه به نمودار ۱ - الف) میانگین غلظت هورمون FSH در موش کلساتیک ( $13/22 \pm 1/03 \text{ ng/ml}$ ) نسبت به گروه‌های شاهد ( $18/14 \pm 1/27 \text{ ng/ml}$ ) و sham ( $16/92 \pm 1/07 \text{ ng/ml}$ ) بطور معنی دار کاهش یافت ( $P=0/019$ ).

نمودار ۱ - ب) تأثیر کلستاز بر روی هورمون LH را نشان می‌دهد. میانگین غلظت هورمون LH در موش کلساتیک ( $0/83 \pm 0/21 \text{ ng/ml}$ ) نسبت به گروه‌های شاهد ( $2/58 \pm 0/21 \text{ ng/ml}$ ) و sham ( $1/84 \pm 0/17 \text{ ng/ml}$ ) بطور معنی دار کاهش داشت ( $P=0/029$ ).

1. Sodium Dodecyle Sulfate
2. Diaminobenzidin
3. Methyl Green



۸۶

شکل ۱: رنگ آمیزی TUNEL سلولهای زاینده مجرای منی سازه بیضه در سه گروه کنترل (الف)، sham (ب) و کلستازیس (ج). سلولهای آپوپتیک TUNEL مثبت، به رنگ قهوه‌ای و سلولهای غیر آپوپتیک توسط متیل گرین به رنگ سبز نشان داده شده است. اسپرمانوگونی SP، سرنولی SC و اسپرمانید دراز نابالغ LS.

◉ (ج) عدم تأثیر کلستاز انسدادی بر روی آپوپتوز سلولهای زاینده

سلولهای زاینده آپوپتیک در تمامی گروهها دیده شد ولی شاخص آپوپتوز (شکل ۱ و نمودار ۲) در موشهای کلستاتیک (۳۷/۱ درصد  $\pm$  ۹/۸۹) نسبت به شاهد (۹۱/۰ درصد  $\pm$  ۷/۰۸) و sham (۱۱/۲۷  $\pm$  ۷/۱۹) تغییرات معنی دار را نشان نداد ( $P=0/۱۹$ ).

◉ (ب) انسداد مجاری صفراوی موجب افزایش سطح پلاسمای هورمون inhibin B می‌شود.

هورمون inhibin B (نمودار ۱ - ج) در موشهای کلستاتیک (۳۸/۰۸  $\pm$  ۲/۷ pg/ml) نسبت به گروههای شاهد (۲۸/۹  $\pm$  ۱/۲۲ ng/ml) و sham (۲۷/۵۶  $\pm$  ۱/۵۵ pg/ml) بطور معنی دار افزایش نشان داد ( $P=0/۰۰۴۹$ ).

### بحث

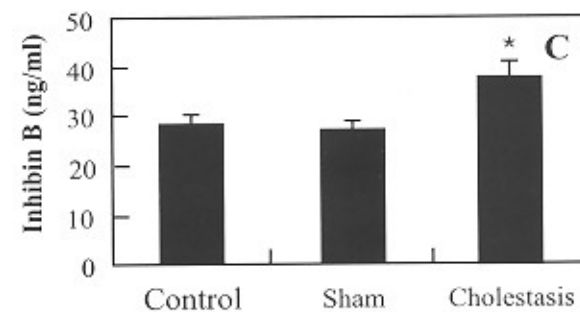
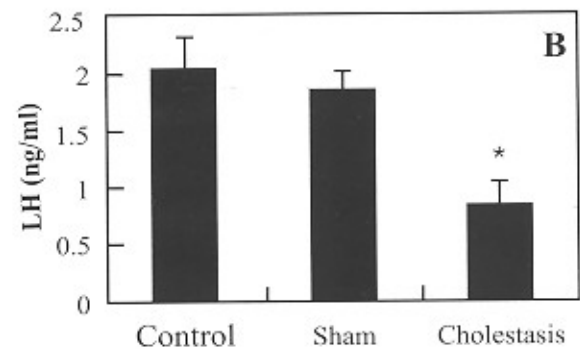
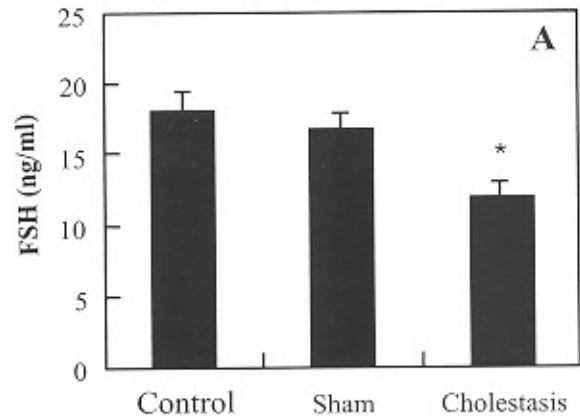
نتایج این بررسی نشان داد که در موشهای کلستاتیک، کاهش معنی داری در ترشح FSH و LH در پلاسما ایجاد شده است. از آنجائیکه در کلستاز چندین فاکتور، شامل: اوپیوئیدها، نیتریک اکساید، استرسهای اکسیداتیو و میتوکینها افزایش می یابند (۵-۱). لذا احتمال می رود که افزایش این فاکتورها دلیلی برای کاهش میزان FSH و LH در پلاسمای موشهای کلستاتیک باشد.

کاهش گنادوتروپینها در موشهای معتاد دیده شده است و تجویز اوپیوئیدهای آگروژن همانند مرفین باعث کاهش سطح سرمی گنادوتروپینها می گردد. بنظر می رسد اوپیوئیدهای اندوزن ترشح گنادوتروپین را از مهار GnRH از هیپوتالاموس کاهش می دهد (۱۷)، (۱۸). بنابراین ممکن است افزایش اوپیوئید کلستاز در کاهش گنادوتروپینها نقش داشته باشد.

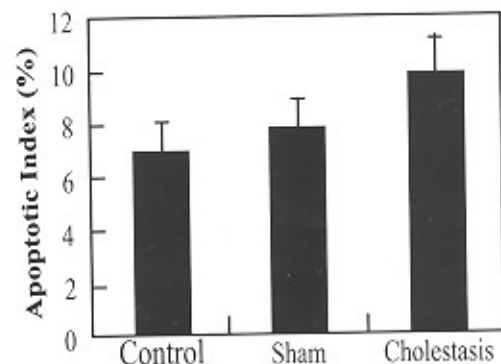
در جریان کلستاز انسدادی افزایش بیش از حد نیتریک اکساید اتفاق می افتد که مقدار زیاد آن برای بسیاری از سلولها، عوارض سمی (Cytotoxic) دارد (۱۹). در مطالعاتی که با نیتریک اکساید آگروژن صورت گرفته است، نیتریک اکساید باعث مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد (HPG) شده است (۷) و تجویز آزاده کننده نیتریک اکساید (DETO/NO) باعث مهار فرآیند استروئیدوژنیز در سلولهای لایدیگ گردیده است (۲۰). لذا این احتمال وجود دارد که افزایش نیتریک اکساید ناشی از کلستاز بر کاهش گنادوتروپینها دخالت داشته باشد.

استرسهای اکسیداتیو در افراد کلستاتیک و دیابتیک به شدت افزایش می یابد. بنظر می رسد در افراد دیابتیک استرسهای اکسیداتیو بر اثر مهار آنتی اکسیدانها توسط هیپرگلیسمی افزایش می یابد. کاهش LH و FSH در افراد دیابتیک را به استرسهای اکسیداتیو نسبت داده اند (۵) به نظر می رسد افزایش استرسهای اکسیداتیو در کلستاز انسدادی در کاهش گنادوتروپینها دخالت داشته باشد.

از نتایج دیگر این پژوهش مشاهده افزایش هورمون مهاری B در گروه کلستاتیک است که بیانگر دو مسئله مهم است: اول اینکه از ارتباط پس خورد منفی هورمون B و FSH حدس زده می شود که کاهش سطح سرمی FSH باعث افزایش هورمون مهاری B شده است دوم اینکه هورمون مهاری B در ارتباط مستقیم با عملکرد سلولهای بیضه بوده و وجود آن بهترین شاخص فعالیت اندوکرینی آنها محسوب می شود (۱۰). نتایج این پژوهش در مورد میزان وقوع آپوپتوز در سلولهای زاینده اسپرماتوگونی بیضه نشان می دهد. علیرغم کاهش گنادوتروپینها در گروه کلستاز معنی داری در آپوپتوز سلولهای زاینده اسپرماتوگونی بیضه رخ نداده است. این نتیجه با گزارش Billig و همکارانش مبنی بر کاهش گنادوتروپینها همراه با افزایش آپوپتوز سلولهای زاینده همخوانی ندارد (۱۵). این تفاوت احتمالاً بدلیل استفاده آنها از آنتاگونیستهای گنادوتروپین و رنهای جوان (یکماهه) باشد. آنتاگونیستهای گنادوتروپین در رنهای بالغ تقریباً تا ۸۰ درصد سطح سرمی FSH و LH را (بدون افزایش مقدار آپوپتوز سلولهای زاینده) را کاهش می دهد (۲۳). در پژوهش ما نیز مقدار FSH و LH به



نمودار ۱: تأثیر کلستاز بر روی سطح سرمی A) FSH، B) LH، C) Inhibin نشان می دهد. علامت (\*) نشانگر معنی دار بودن اختلاف میانگین گروه کلستاز با گروههای شاهد و sham می باشد.



نمودار ۲: تأثیر کلستاز بر روی آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه. اعداد بصورت میانگین ± خطای استاندارد معیار بیان شده است.

سلولهای زاینده و اختلال در روند اسپرماتوژنز باشد. احتمالاً فاکتورهای دیگری که هنوز ناشناخته‌اند همراه با اختلال هورمونی روی آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه تأثیر دارند. بررسی‌های آینده در مورد شناخت عوامل دیگر فاکتورهای بقاء سلولهای زاینده در جریان کلستاز انسدادی می‌تواند دانش ما در مورد تظاهرات کلستاز کامل‌تر کند.

### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بخصوص از آقای دکتر هدایتی و خانم دکتر آذری و همچنین خانم خسروی از بخش ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام سنجش هورمونی و آقای دکتر E.V. Younglai از دانشگاه McMaster کانادا که ما را در روش TUNEL Apoptosis یاری نمودند تقدیر و قدردانی می‌گردد.

### References

- Nahavandi A, Dehpour AR, Mani A, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini MR: The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Europ J of Pharmacol* 2001; 411:135-141
- Dehpour AR, Seyyedi A, Rastegar H, Namiranian K, Moezi L, Sadeghipour H, Dehghani M, Jorjani M, Roushanzamir F, Ahmadiani A: The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated Rats. *Europ J Pharmacol* 2002; 445:31-36
- Narimani K, Samini M, Ejtemaei Mehr SH, Gaskari SA, Rastegar H, Homayoun H, Dehpour AR: Mesenteric Vascular bed responsiveness in bile duct-ligated Rats: roles of opioid and nitric oxide systems. *Europ J Pharmacol* 2001; 423:185-193
- Zietz B, Wengler I, Messmann H, Lock G, Schomerich J, Straub RH: Early shifts of adrenal steroid synthesis before and after relief of short-term cholestasis. *J Hepatol* 2001; 35:329-337
- Abou-seif MA, Youssef AA: Oxidative stress and male IGF-1, gonadotropin and related hormones in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(7): 618-623
- Cicero TJ: Effects of exogenous and endogenous opiates on the hypothalamic- Pituitary-gonadal axis in the male. *Fed-Proc* 1980; 39(8): 2551-2554
- Pinilla L, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Bellido C, Aguilar E: Effects of systemic blockade of nitric oxide synthase on pulsatile LH, prolactin and GH secretion in adult male rats. *Horm Res* 2001; 55(5): 229-235
- Koib BA, Frank Stanczyk Z, Rebecca Sokol Z:

ترتیب ۲۵ و ۵۵ درصد در رتهای کلستاتیک کاهش یافت. بنابراین احتمال دارد که فاکتور سن یکی از عوامل مؤثر در بقای سلولهای زاینده باشد و هورمونهای گنادوتروپین در زمان بلوغ تنظیم کننده اصلی سلولهای زاینده بیضه نباشند (۲۲).

جمع بندی نتایج حاصل از مطالعات فوق نشان می‌دهد که کلستاز انسدادی حاد باعث کاهش هورمونهای گنادوتروپین می‌شود و این کاهش شاید بخاطر افزایش تون اوپیوئیدها، نیتریک اکساید و یا رادیکالهای آزاد دیگر در موشهای کلستاتیک باشد. کلستاز انسدادی حاد تأثیر معنی داری بر آپوپتوز سلولهای زاینده اسپرماتوگونی در بیضه موش‌های صحرائی ندارد. لذا بنظر می‌رسد که فاکتورهای افزایش یافته در جریان کلستاز، علی‌رغم کاهش هورمونهای گنادوتروپینی نتوانسته‌اند منجر به تغییرات ریخت‌شناسی و افزایش آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه گردد. بنابراین بنظر می‌رسد که وجود اختلال در محور هورمونی هیپوفیز - بیضه‌ای به تنهایی نمی‌تواند عامل ایجاد آپوپتوز

Serum Inhibin B levels in males with gonadal dysfunction *Fertility and Sterility*. 2000; 74(2):234-38.

- Mclachlan RI, Wreford NG, Donnell LO, Kretser DM, Robertson DM: The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology*. 1996; 148:1-9.
- Pierik HF, Vreeburg JM, Stijnen T, De Jongand Robertus FH, Weber FA: Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998; 83(9): 3110-3114
- Burger HG, Igarashi M: Inhibin definition and nomenclature, including related substance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:885-886
- Wanzhu J, Chandana BH, Yoshida M, Arai KY, Saita E, Zhanquan S, Ren L, Watanabe G, Nigel PG, Taya K: Inhibin B regulation FSH secretion during testicular recrudescence in male Golden Hamster. *J Androl* 2003; 23(6): 845-853
- Anderson RA, Wallace EM, Groome NP, Bellis AP: Physiological relationships between inhibin B, FSH secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotropin suppression by exogenous testosterone. *Hum Rep* 1997; 12(4): 746-751
- Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M: Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *European Journal of Endocrinology*. 2001; 145: 561-571
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen and Aaron H, Hsueh JW: Apoptosis in testis germ

cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinol* 1995; 136(1): 5-12

16. Dehpour AR, Seyyedi A, Rastegar H, Namirania K, Moezi L, Sadeghipour H, Dehghani M, Jorjani M, Roushanzamir F, Ahmadiani A: The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated Rats. *European Journal of Pharmacol* 2002; 445: 31-36

17. Cicero TJ, Meyer ER, Wiest WG: Effects of chronic morphine administration on the reproductive system of male rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 192(3): 542-548

18. Cicero TJ, Bell RD, Meryer ER: Narcotic and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: acute androgen dependent systems. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 201(1): 76-83

19. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ: Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decrease sperm motility and

induces sperm toxicity. *Human Reproduction* 1995; 10(7): 1786-1790

20. Punta KD, Charreau EH, Pignataro OP: Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidgenesis. *Endocrinol* 1996; 137(12): 5337-5343

21. Dym M, Raj HGM, Lin YC, Chemes HE, Nayfeh SN, French FS: Is FSH required for the maintenance of spermatogenesis in adult rats? *J Reprod Fertil Suppl.* 1979; 26: 175-181

22. Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S: Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *Word Journal Urology* 1999; 17: 296-300

23. Inaba Y, Fujisawa M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S: The apoptotic changes of testicular germ cells in the obstructive Azoospermia models of prepubertal and adult rats. *The Journal of Urology* 1998; 160: 540-544

