رابطه پروفایل لیپیدی سرم خون با شاخص‌های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه در موش صحرایی

علی لوئی منفرد[1*]، عارف نورایی[2]

۱) گروه علوم پایه، دانشکده پیرا دام‌پزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲) گروه بافت شناسی، دانشکده دام‌پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۶ **تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴**

چکیده

مقدمه: ترکیبات لیپیدی به کار رفته در ساختار اسپرماتوزوئید نقش مهمی در عملکرد آن دارد. هم چنین شواهدی مبنی بر تاثیر مستقیم نوع لیپید موجود در خوراک بر روی روند اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرماتوزوئید و میزان تحرک آن در دسترس است. اما از آن جایی که در مورد ارتباط بین مقادیر لیپیدهای سرمی با ساختار و عملکردهای آندوکرینی و اگزوکرینی بیضه تحقیقات اندکی در دسترس است، تحقیق حاضر انجام شد.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر بر روی ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ سالم انجام شد. برای اندازه گیری غلظت سرمی تستوسترون(شاخص آندوکرینی بیضه)، کلسترول تام، تری گلیسرید تام، لیپوپروتئین VLDL-c، لیپوپروتئین LDL-c و لیپوپروتئین HDL-c؛ پس از آسان کشی حیوانات نمونه خون از طریق پونکسیون قلب اخذ شد. کلسترول و تری گلیسرید تام به روش آنزیمی، لیپوپروتئین ها به روش رسوب دهی و میزان تستوسترون به روش رادیوایمونواسی اندازه گیری شد. اندیس های تشریحی شامل وزن، محیط اسکروتوم، طول و عرض بیضه اندازه گیری شد. جهت بررسی هیستومورفومتریک سلول های جنسی (شاخص اگزوکرینی بیضه)، مقاطع پارافینی ۵ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین–ائوزین رنگ آمیزی شد. داده ها با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون و رگرسیون خطی چندگانه مورد تجزیه و تحلیلی آماری قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان سرمی HDL-c با قطر سلول های لیدیگ بیضه(r=0.38; P<0.05)، قطر لوله های اسپرم ساز(r=0.69; P<0.01)، وزن بیضه(r=0.85; P<0.001)، محیط اسکروتوم(r=0.38; P<0.05) و هم چنین مقادیر تستوسترون(r=0.85; P<0.001) همبستگی مثبت دارد. مقادیر سرمی تری گلیسرید با قطر سلول های لیدیگ بیضه(r= -0.82; P<0.001) و میزان ارتفاع اپیتلیوم زایای بیضه(r= -0.79; P<0.001) همبستگی منفی داشت. مقادیر سرمی VLDL-c با قطر سلول های لیدیگ بیضه(r= -0.73; P<0.01) و میزان ارتفاع اپیتلیوم زایای بیضه(r= -0.81; P<0.001) همبستگی منفی داشت. هم چنین مقادیر سرمی تری گلیسرید با وزن بیضه(r=0.81; P<0.001) همبستگی مثبت نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه می توان نتیجه گرفت که لیپوپروتئین HDL-c با شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه رابطه مثبت دارد، اما تری گلیسرید تام و لیپوپروتئین VLDL-c با عملکردهای آندوکرینی و اگزوکرینی بیضه ارتباط منفی دارند.

واژ ه های کلیدی: بافت شناسی، لیپید، بیضه، تستوسترون، موش

*نویسنده مسئول: گروه علوم پایه، دانشکده پیرا دام پزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

Email: alm722@gmail.com

مقدمه

عملکرد صحیح دستگاه تولید مثل مرد در زمینه سنتز سلول های جنسی و ترشح تستوسترون تا حدود زیادی متاثر از نوع لیپیدها و فسفولیپیدهای موجود در رژیم غذایی است. به عبارت دیگر حضور مقادیر کافی از ترکیبات لیپیدی برای انجام اسپرماتوژنز ضروری است(۱،۲). به علاوه، مطالعات قبلی اثبات کرده اند که در طول روند اسپرماتوژنز در مردان، تبدیل سلول های نابالغ جنسی به اسپرماتوزوئید؛ به طور مستقیم وابسته به حضور مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در ساختار بیضه است. هم چنین میزان و نوع فسفولیپیدهای موجود در ساختار دم اسپرماتوزوئید، نقش بسیار مهمی در انعطاف پذیری و حرکت آن دارد(۱).

از طرف دیگر یکی از دلایل ناباروری مردان تغییر اجزای فسفولیپیدی و ترکیب اسیدهای چرب غشای اسپرماتوزوئید می باشد(۳) زیرا نوع فسفولیپیدهای غشای اسپرماتوزوئید؛ ضمن این که پیش نیاز عملکرد طبیعی سلول است نقش بسیار مهمی در بارورسازی سلول جنسی ایفا می کند(۴). علاوه بر این محققین گزارش نموده اند که افزایش غیر طبیعی سطح تری گلیسرید سرم موجب کاهش تحرک اسپرماتوزوئید در انسان(۵) و اختلال در انجام واکنش آکروزومی در سر اسپرماتوزوئید در مدل خرگوش(۶) می شود. اخیراً Morgan و همکاران(۲۰۱۴) گزارش نموده اند که افزایش میزان کلسترول تام سرم موجب نارسائی ساختار بافت شناسی و فیزیولوژیکی سد خونی–بیضه ای می شود و این امر به نوبه خود منجر به ناباروری می گردد(۷).

شواهدی مبنی بر تاثیر مستقیم نوع لیپید موجود در خوراک بر روی روند اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرماتوزوئید و میزان تحرک آن در دسترس است(۳). هم چنین Liu و همکاران(۲۰۱۴) دریافتند که بالا بودن مقادیر لیپید در جیره غذایی، ضمن این که منجر به هیپرلیپیدمی می شود، می تواند عملکرد سلول های سرتولی و هم چنین ساختار بافت شناسی سلول های جنسی متعدد را در مدل موش صحرایی مختل نماید. این محققین اعلام نمودند دلیل این امر، ناکارآمدی سلول های سرتولی در زمینه تغذیه و محافظت سلول های جنسی مختلف طی روند اسپرماتوژنز می باشد(۸). Erdemir و همکاران(۲۰۱۲) گزارش نمودند که بالا بودن سطح لیپیدی سرم خون منجر به بروز استرس اکسیداتیو، تغییرات ساختاری گسترده در بافت بیضه و هم چنین کاهش میزان هورمون تستوسترون در موش صحرایی می شود(۹). Schisterman و همکاران(۲۰۱۴) دریافتند که بالا بودن میزان کلسترول تام و تری گلیسرید تام می تواند سبب ایجاد تغییرات غیر طبیعی در میزان تحرک اسپرماتوزوئید و هم چنین مرفولوژی سلول های جنسی مختلف در لوله های اسپرم ساز بیضه در انسان شود(۱۰). Chen و همکاران(۲۰۱۱) اعلام نمودند که رژیم های خوراکی پرچربی باعث اختلال در ساختار بافت شناسی و هیستومتریک سلول های جنسی موجود در لوله های اسپرم ساز در مدل موش صحرایی می شود(۱۱).

لیپوپروتئین ها وظیفه جا به جایی چربی هایی از قبیل کلسترول را بین بافت ترشح کننده آن و اندام های هدف بر عهده دارند؛ جذب لیپید در ارگان هدف عمدتاً با واسطه گیرنده های لیپوپروتئین صورت می گیرد(۱۲،۱۳). هم چنین لیپوپروتئین ها میزان عرضه استرول مورد نیاز برای انجام برخی از فعالیت های سلولی از جمله شکل گیری غشاء ها و سنتز هورمون های استروئیدی را تنظیم می کنند(۱۳).

با توجه به این که در مورد ارتباط بین مقادیر لیپیدها و لیپوپروتئین های سرم خون با میزان ترشح تستوسترون، شاخص های آناتومیک و بافت شناسی بیضه در موش های صحریی اطلاعات محدودی در دسترس است، بررسی حاضر صورت گرفت.

مواد و روش ها

تهیه حیوانات مورد آزمایش: برای انجام این آزمایش در آبان ماه ۱۳۹۲، از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پیرا دام پزشکی دانشگاه ایلام، تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ سالم با سن تقریباً یکسان(۴/۵ ماه) و با وزن اولیه ۲۵۹–۲۳۹ گرم به طور تصادفی انتخاب شد. پس از فراهم کردن شرایط زیستی مناسب(۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۴–۲۲ درجه سانتی گراد، آب و غذا به

طور نامحدود) به مدت یک هفته به منظور عادت کردن به محیط، نگهداری شدند. حیوانات مورد مطالعه در تمام طول حیات خود از رژیم غذایی یکسان محتوی پروتئین و چربی از طریق پلت خوراک حیوانات آزمایشگاهی تغذیه می شدند. در این مطالعه، کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده پیرا دام پزشکی دانشگاه ایلام رعایت گردید(شماره مجوز کمیته اخلاق: ۷/۴۷۵۹۵–ص).

اندازه گیری غلظت سرمی لیپید و لیپوپروتئین: برای اندازه گیری غلظت سرمی لیپید و لیپوپروتئین، پس از آسان کشی حیوانات با استفاده از کلروفرم، نسبت به اخذ نمونه خون از طریق پونکسیون قلب اقدام شد. برای این کار حیوانات به مدت ۱۴–۱۰ ساعت در حالت ناشتا قرار داده شدند، سپس به میزان ۷ میلی لیتر نمونه خون گرفته شد. برای جدا سازی سرم، نمونه های جمع آوری شده خون به مدت ۲۰ دقیقه و rpm 2500 سانتریفوژ گردید. سپس سرم نمونه ها با کمک سمپلر جمع آوری و در میکروتیوب های استریل ریخته و تا زمان اندازه گیری لیپیدهای سرم و هورمون تستوسترون در فریزر ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تعیین میزان کلسترول و تری گلیسرید تام سرم از کیت های تجارتی شرکت پارس آزمون استفاده شد. بدین منظور، معرف یا معرف های مربوطه طبق دستورالعمل کیت تهیه و کلسترول تام به روش آنزیمی کلسترول اکسیداز و تری گلیسرید تام به روش آنزیمی گلیسرول فسفات دهیدروژناز اندازه گیری شدند. کلسترول موجود در لیپوپروتئین های با چگالی بسیار کم(VLDL-c)، با چگالی کم(LDL-c) و با چگالی بالا(HDL-c) به روش دستی و با کیت های شرکت زیست شیمی اندازه گیری شدند. بدین منظور، برای تعیین میزان HDL-c از روش رنگ سنجی و بر اساس رسوب LDL-c و VLDL-c به وسیله معرف رسوب دهنده استفاده شد. سپس HDL-c در لایه شفاف فوقانی با روش آنزیمی توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (Shimadzu-UV.120, Japan) اندازه گیری شد. برای اندازه گیری LDL-c، از روش آنزیمی و رنگ سنجی استفاده شد؛ برای این کار ابتدا LDL-c به وسیله هپارین رسوب می کند و بعد از سانتریفوژ، لیپوپروتئین های با چگالی بالا و بسیار کم بر روی سطح شناور قرار می گیرند و پس از اندازه گیری آن ها به روش آنزیمی و کسرشان از کلسترول تام، مقدار LDL-c به دست می آید. میزان VLDL-c از کسر مجموع مقادیر LDL-c و HDL-c از کلسترول تام به دست آمد(۱۴).

اندازه گیری غلظت سرمی تستوسترون: برای اندازه گیری میزان سرمی هورمون تستوسترون، نمونه های خون حیوانات با استفاده از روش رادیوایمنواسی و کیت تجاری هورمون تستوسترون(Immunotech SA, France, PI-1119) و دستگاه گاماکانتر(LKB, Sweden) بررسی شدند.

سنجش های آناتومیکال: بلافاصله پس از آسان کشی، بیضه راست حیوانات از بدن خارج و اندیس های تشریحی شامل وزن با ترازوی الکترونیکی دیجیتال؛ محیط اسکروتوم، طول و عرض بیضه با استفاده از کولیس الکترونیکی دیجیتال اندازه گیری شد.

بررسی های هیستومورفومتری: جهت انجام مطالعات بافت شناسی و تهیه مقاطع بافتی، نمونه هایی به ضخامت ۰/۵ سانتی متر از سه قسمت سری، میانی و دمی بیضه هر حیوان برداشت و به مدت یک روز در محلول تثبیت کننده فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. برای به حداکثر رساندن تعداد برش های مناسب لوله های اسپرم ساز در مقطع عرضی، بیضه ها در جهت محور طولی برش داده شدند. پس از انجام مراحل معمول آمادش بافتی، از هر بیضه پنج مقطع پارافینی ۵ میکرومتری تهیه و با روش هماتوکسیلین–ائوزین رنگ آمیزی گردید(۱۵). مقاطع بافتی حاصله با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse E800, Tokyo, Japan) متصل به کامپیوتر و دوربین دیجیتال (Sony camera, Tokyo, Japan)، مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند. برای انجام مطالعات هیستومورفومتریک ۹۰ مقطع عرضی کاملاً یا تقریباً مدور از لوله های اسپرم ساز و هم چنین بافت بینابینی بیضه(سلول های لیدیگ) در هر حیوان به طور تصادفی انتخاب و عکسبرداری گردید. فتومیکروگراف های

حاصل با استفاده از نرم افزار آنالیز تصویر Motic 2002 تحت بررسی هیستومتری و سیتومتری قرار گرفتند. با استفاده از نرم افزار مساحت تمام لوله های اسپرم ساز موجود در هر فیلد میکروسکوپی از مساحت کل فیلد کسر شد در نتیجه مساحت لوله های اسپرم ساز و بافت بینابینی بیضه مشخص شد. این کار برای پنج مقطع مختلف از هر نمونه تکرار شد. برای تعیین قطر لوله های اسپرم ساز و هم چنین میزان ارتفاع اپیتلیوم زایا مقاطع عرضی کاملاً یا تقریباً مدور انتخاب و با استفاده از نرم افزار در پنج نقطه از هر مقطع اندازه گیری صورت گرفت. علاوه بر این در همه نمونه ها میانگین تعداد و قطر سلول های لیدیگ، سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید به ازای شمارش ۱۰۰ عدد از آن در هر ۱۰۳ میلی متر از بافت بیضه تحت بزرگ نمایی میکروسکوپی ۴۰۰ اندازه گیری و ثبت شد(۱۵،۱۶).

آنالیز آماری: برای تعیین میانگین و انحراف معیار مقادیر لیپیدهای سرم و هم چنین شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه از آمار توصیفی استفاده شد. سپس از آزمون Kolmogorov-Smirnova برای بررسی توزیع نرمال داده ها استفاده گردید. پس از ارزیابی همبستگی ساده بین مقادیر لیپیدهای سرم و هم چنین شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه(آزمون همبستگی پیرسون)؛ متغیرهایی که همبستگی بالا و معنی دار داشتند انتخاب و در تجزیه رگرسیون خطی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند(SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

یافته های پژوهش

میانگین و انحراف معیار مقادیر طبیعی مربوط به غلظت تستوسترون، لیپیدها و لیپوپروتئین های سرم و هم چنین مقادیر طبیعی سنجش های آناتومیکال و هیستومورفومتریک در موش های صحرایی مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. بر این اساس میزان کلسترول تام بیشتر از تری گلیسرید تام می باشد. به علاوه، VLDL-c بیشترین مقدار لیپوپروتئین سرم بوده و HDL-c و LDL-c در سطوح پایین تر قرار دارند.

نتایج مربوط به رابطه پروفایل لیپیدی سرم خون با شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه و میزان همبستگی آن، در جدول شماره ۲ درج شده است. بر این اساس، از بین لیپیدها و لیپوپروتئین های مختلف، میزان سرمی HDL-c با قطر سلول های لیدیگ بیضه، قطر لوله های اسپرم ساز، وزن بیضه، محیط اسکروتوم و هم چنین مقادیر تستوسترون همبستگی مثبت دارد(جدول شماره ۲).

مقادیر سرمی تری گلیسرید و VLDL-c با قطر سلول های لیدیگ بیضه و میزان ارتفاع اپیتلیوم زایای بیضه همبستگی منفی داشت. به علاوه میزان سرمی تری گلیسرید با وزن بیضه همبستگی مثبت نشان داد. لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر، میزان سرمی LDL-c و هم چنین مقادیر کلسترول تام هیچ گونه ارتباط آماری معنی داری با مقادیر شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه نداشت(جدول شماره ۲). علاوه بر این تعداد سلول های سرتولی، لیدیگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید ارتباطی با لیپیدی سرم خون نداشت(جدول شماره ۲). در جدول شماره ۳ تجزیه رگرسیون خطی چندگانه برای ارزیابی رابطه پروفایل لیپیدی سرم خون با شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه در موش صحرایی ذکر شده است(جدول شماره ۳). هم چنین مقطع بافتی بیضه حیوانات مورد مطالعه برای مشاهده جزئیات ساختاری در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است(تصاویر شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱. ویژگی های توصیفی آزمودنی های مورد بررسی در متغیرهای پژوهش

متغیر	میانگین± انحراف معیار	متغیر	میانگین± انحراف معیار
میزان تستوسترون(میلی گرم/دسی لیتر)	۸/۸±۰/۶	طول بیضه(میلی متر)	۳۴/۵±۳/۸
کلسترول تام(میلی گرم/دسی لیتر)	۴۶/۴±۰/۳	عرض بیضه(میلی متر)	۳۲/۶±۶/۹
تری گلیسرید تام(میلی گرم/دسی لیتر)	۳۴/۳±۲/۸	مساحت بافت بینابینی بیضه(٪)	۸۹/۶±۶/۴
VLDL-c(میلی گرم/دسی لیتر)	۳۸/۱±۰/۶	مساحت لوله های اسپرم ساز(٪)	۱۰/۷±۵/۷
LDL-c(میلی گرم/دسی لیتر)	۱۶/۹±۱/۷	ارتفاع بافت پوششی لوله های اسپرم ساز(میکرون)	۱۱۳/۴±۷/۱
HDL-c(میلی گرم/دسی لیتر)	۳۵/۷±۲/۵	قطر لوله های اسپرم ساز(میکرون)	۲۷۶/۴±۱۱/۳
وزن بیضه(میلی گرم)	۹/۲±۰/۰۶	تعداد سلول های لیدیگ(در هر۱۰۳میلی متر از بافت بیضه)	۱۲/۶±۲/۸
محیط اسکروتوم(میلی متر)	۵۷/۸±۷/۳	قطر سلول های لیدیگ بیضه(میکرون)	۲۹/۶±۰/۰۲

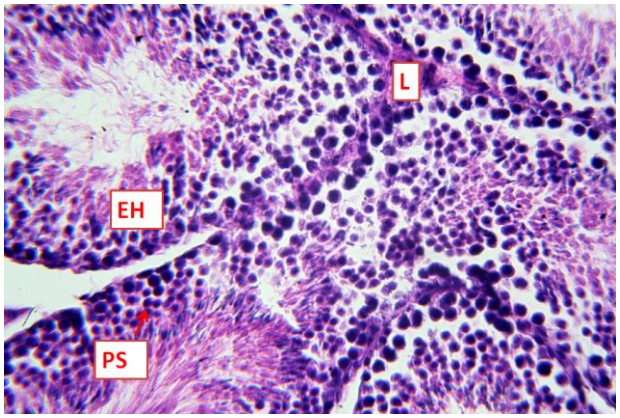
جدول شماره ۲. مقادیر ضریب همبستگی بین متغیرهای پروفایل لیپیدی سرم خون و شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه

متغیرها	قطر سلول های لیدیگ بیضه (میکرون)	قطر لوله های اسپرم ساز (میکرون)	وزن بیضه (میلی گرم)	محیط اسکروتوم (میلی متر)	میزان تستوسترون (میلی گرم/ دسی لیتر)	ارتفاع بافت پوششی لوله های اسپرم ساز (میکرون)
HDL-c(میلی گرم/ دسی لیتر)	۰/۳۸*	۰/۶۹**	۰/۸۵***	۰/۳۸*	۰/۸۵***	ns۰/۱۲
تری گلیسرید تام(میلی گرم/ دسی لیتر)	-۰/۸۲***	ns۰/۱۷	۰/۸۱***	ns۰/۱۱	ns۰/۱۴	-۰/۷۹***
VLDL-c(میلی گرم/ دسی لیتر)	-۰/۷۳**	ns۰/۱۶	ns۰/۱۵	ns۰/۱۲	ns۰/۱۳	-۰/۸۱***
LDL-c(میلی گرم/ دسی لیتر)	ns۰/۱۱	ns۰/۱۴	ns۰/۱۴	ns۰/۱۳	ns۰/۱۲	ns۰/۱۱
کلسترول تام (میلی گرم/ دسی لیتر)	ns۰/۱۳	ns۰/۱۱	ns۰/۱۱	ns۰/۱۲	ns۰/۱۵	ns۰/۱۴

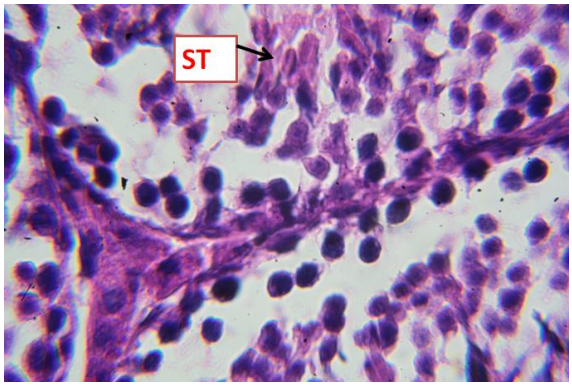
*معنی دار در سطح$P<0.05$ ، **معنی دار در سطح $P<0.01$ ،***معنی دار در سطح$P<0.001$ ، ns غیر معنی دار

جدول شماره ۳. تجزیه رگرسیون خطی چندگانه برای ارزیابی رابطه پروفایل لیپیدی سرم خون با شاخص‌های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه در موش صحرایی

متغییر وابسته (متغیرهای آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه)	متغیرهای مستقل (پروفایل لیپیدی سرم خون)	ضرایب رگرسیونی(B)	انحراف معیار	آماره t	سطح معنی داری
قطر سلول های لیدیگ(میکرون)	Intercept	۹/۲۴۵۰۴	۵/۹۶۶۰۶	۱/۵۵	۰/۱۴۰۸
	HDL-c	۱/۱۴۳۳۴	۰/۲۶۲۴۸	۴/۳۶	۰/۰۰۰۵
	تری گلیسرید تام	−۰/۱۷۷۵۹	۰/۰۹۰۷۶	−۱/۹۶	۰/۰۰۸۱
	VLDL-c	−۰/۱۲۹۸۴	۰/۰۹۶۰۳	−۱/۳۵	۰/۱۹۵۲
	LDL-c	−۰/۰۰۱۱۸	۰/۰۲۰۶۲	−۰/۰۶	۰/۹۵۵۲
	کلسترول تام	−۰/۰۲۹۹۵	۰/۰۵۵۰۲	−۰/۵۴	۰/۵۹۳۷
قطر لوله های اسپرم ساز(میکرون)	Intercept	۲/۰۷۴۶۶	۱/۸۶۱۸۱	۱/۱۱	۰/۲۸۱۶
	HDL-c	۰/۰۷۰۱۲	۰/۰۸۱۹۱	۰/۸۶	۰/۰۰۴۶
	تری گلیسرید تام	−۰/۰۲۲۸۵	۰/۰۲۸۳۲	−۰/۸۱	۰/۴۳۱۶
	VLDL-c	−۰/۰۲۱۶۹	۰/۰۲۹۹۷	−۰/۷۲	۰/۰۰۹۷
	LDL-c	۰/۰۰۴۷۹	۰/۰۰۶۴۳	۰/۷۴	۰/۴۶۷۶
	کلسترول تام	−۰/۰۲۱۵۱	۰/۰۱۷۱۷	−۱/۲۵	۰/۲۲۸۲
وزن بیضه(میلی گرم)	Intercept	۰/۰۲۹۸۶	۱/۴۵۸۹۲	۰/۷۱	۰/۴۹۰۴
	HDL-c	۰/۳۴۲۴۰	۰/۰۶۴۱۹	۵/۳۳	<۰/۰۰۰۱
	تری گلیسرید تام	۰/۰۱۰۸۴	۰/۰۲۲۱۹	۰/۴۹	۰/۰۰۱۸
	VLDL-c	۰/۰۰۱۷۸	۰/۰۲۳۴۸	۰/۰۸	۰/۹۴۰۶
	LDL-c	۰/۰۰۹۱۴	۰/۰۰۵۰۴	۱/۸۱	۰/۵۸۸۸
	کلسترول تام	−۰/۰۰۹۸۴	۰/۰۱۳۴۵	−۰/۷۳	۰/۴۷۵۰
محیط اسکروتوم(میلی متر)	Intercept	−۱۴/۵۵۹۳۳	۴/۸۷۴۹۴	−۲/۹۹	۰/۰۰۸۷
	HDL-c	۱/۸۲۲۱۴	۰/۲۱۴۴۸	۸/۵۰	<۰/۰۰۰۱
	تری گلیسرید تام	۰/۱۵۶۰۱	۰/۰۷۴۱۶	۲/۱۰	۰/۷۵۱۶
	VLDL-c	۰/۰۱۲۵۱	۰/۰۷۸۴۷	۰/۱۶	۰/۸۷۵۳
	LDL-c	−۰/۰۰۲۶۲	۰/۰۱۶۸۵	−۰/۱۶	۰/۸۷۸۴
	کلسترول تام	−۰/۰۶۷۲۱	۰/۰۴۴۹۶	−۱/۴۹	۰/۱۵۴۴
غلظت تستوسترون (میلی گرم/ دسی لیتر)	Intercept	−۰/۰۲۴۱۹	۱/۴۹۸۷۰	−۰/۰۲	۰/۹۸۷۳
	HDL-c	۰/۲۸۹۳۲	۰/۰۶۵۹۴	۴/۳۹	۰/۰۰۰۵
	تری گلیسرید تام	−۰/۰۱۶۵۰	۰/۰۲۲۸۰	−۰/۷۲	۰/۴۷۹۸
	VLDL-c	۰/۰۲۴۸۷	۰/۰۲۴۱۲	۱/۰۳	۰/۳۱۷۸
	LDL-c	−۰/۰۰۱۰۱	۰/۰۰۵۱۸	−۰/۲۰	۰/۸۴۷۷
	کلسترول تام	۰/۰۱۳۸۲	۰/۰۱۳۸۲	۱/۰۰	۰/۳۳۲۲
ارتفاع اپیتلیوم زایای لوله های اسپرم ساز (میکرون)	Intercept	۱۲۹/۸۵۳۴۶	۹/۵۹۶۸۶	۱۳/۵۳	<۰/۰۰۰۱
	HDL-c	۰/۸۷۹۵۷	۰/۴۲۲۲۳	۲/۰۸	۰/۰۵۳۶
	تری گلیسرید تام	−۰/۰۶۲۹۳	۰/۱۴۵۹۹	−۰/۴۳	۰/۰۰۲۲
	VLDL-c	−۱/۵۷۰۳۴	۰/۱۵۴۴۷	−۱۰/۱۷	<۰/۰۰۰۱
	LDL-c	۰/۰۲۳۰۸	۰/۰۳۳۱۷	۰/۷۰	۰/۴۹۶۵
	کلسترول تام	۰/۱۷۵۷۲	۰/۰۸۸۵۱	۱/۹۹	۰/۷۶۴۵



تصویر شماره ۱. مقطع بافتی بیضه حیوانات مورد مطالعه(رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ نمایی ٤٠٠×). در این بخش از تصویر ارتفاع اپیتلیوم زایای لوله های اسپرم ساز(EH)، سلول های لیدیگ(L) و هم چنین سلول های اسپرماتوسیت اولیه(PS) دیده می شود. (EH: Epithelial Height و L: Leydig Cells و PS: Primary Spermatocyte)



تصویر شماره ۲. مقطع بافتی بیضه حیوانات مورد مطالعه(رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ نمایی ۱۰۰۰×). در این بخش از تصویر سلول های اسپرماتید(ST)، دیده می شود.(ST: Spermatid)

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر مربوط به اجزای لیپیدی سرم خون می توانند با شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه رابطه مثبت یا منفی داشته باشند. به طوری که میزان سرمی HDL-c با قطر سلول های لیدیگ بیضه، قطر لوله های اسپرم ساز، وزن بیضه، محیط اسکروتوم و هم چنین مقادیر تستوسترون همبستگی مثبت دارد، بنا بر این شاید بتوان گفت که در حیوانات مورد بررسی، عمدتاً HDL-c در مقایسه با سایر لیپیدها و لیپوپروتئین های سرم برای سنتز تستوسترون در شبکه های آندوپلاسمی صاف در سلول های لیدیگ بافت بیضه به کار می رود(۷،۱۷). محققین اهمیت قطر سلول های لیدیگ بیضه در زمینه ترشح و سنتز هورمون تستوسترون را اثبات نموده و گزارش نموده اند که همواره بین افزایش قطر سلول های لیدیگ و افزایش غلظت سرمی تستوسترون ارتباط مستقیم وجود دارد(۱۸). هم چنین بررسی های قبلی نشان داده اند که سلول های لیدیگ بیضه موش صحرایی برای استروئیدوژنز عمدتاً کلسترول موجود در HDL-c را مورد استفاده قرار می دهند(۱۹). این نتایج با یافته های محققین دیگر در مورد وجود ارتباط مثبت بین تعداد و اندازه سلول های لیدیگ با میزان تستوسترون سرم در گاوهای نر برهمن(۲۰) و هم چنین سگ(۱۷) مطابقت دارد. دلیل این امر سنتز و ترشح هورمون تستوسترون در شبکه های آندوپلاسمی صاف سلول های لیدیگ است. مهم

ترین استدلال هایی که در مورد بکارگیری HDL-c در مقایسه با سایر لیپوپروتئین های سرم برای سنتز تستوسترون در بافت بیضه می توان نمود موارد ذیل است:

الف–ساختار بیوشیمیایی HDL-c به گونه ای است که در مقایسه با سایر لیپوپروتئین ها دارای بیشترین درصد فسفولیپید و کمترین درصد تری گلیسرید است(۲۱)، بنا بر این هیدرولیز HDL-c توسط لیپوپروتئین لیپاز سرمی منجر به تولید مقادیر فراوانی فسفولیپید می شود. فسفولیپید حاصله به راحتی از سدهای لیپیدی اکثر بافت ها از جمله بیضه عبور می نماید(۲۲).

ب–یکی دیگر از علل قابل طرح برای اثرات مستقیم میزان HDL-c بر روی فعالیت آندوکرینی بافت بیضه، تعداد گیرنده های بافتی و تئوری آندوسیتوز وابسته به گیرنده HDL-c می باشد. در این مورد، برخی محققین تعداد گیرنده های HDL-c موجود در بافت های مختلف را مورد مطالعه قرار داده اند و اثبات نموده اند که ورود HDL-c به سلول های گرانولوزای تخمدان(۲۲) و هم چنین سلول های کورتکس آدرنال (۱۲) عمدتاً بر اساس آندوسیتوز وابسته به گیرنده می باشد. بنا بر این می توان گفت که ممکن است تعداد گیرنده های HDL-c در بافت بیضه بیشتر از گیرنده های سایر لیپیدها و لیپوپروتئین ها باشد.

ج–مطالعات قبلی نشان داده اند که سلول های سرتولی نقش تغذیه سلول های جنسی موجود در بیضه با مواد مغذی مختلف از جمله لیپیدها را بر عهده دارند(۱،۲۳). هم چنین داربست موجود در بین لوله های اسپرم ساز و مویرگ های خونی بیضه، از عبور و مرور LDL-c و VLDL-c جلوگیری نموده و تنها اجازه تبادل ذرات HDL-c و تحویل کلسترول موجود در آن را به سلول های سرتولی می دهد(۲۴)؛ بنا بر این می توان نتیجه گرفت که در ساختار بیضه، کلسترول موجود در HDL-c در مقایسه با سایر ترکیبات لیپیدی سرم، علاوه بر بکارگیری برای سنتز تستوسترون، جهت تغذیه سلول های جنسی در حال ساخت نیز مورد استفاده قرار می گیرد. نتیجه حاصل از مطالعه حاضر همسو با گزارشی مبنی بر همبستگی مثبت بین مقادیر HDL-c سرمی، زنده مانی و نیز دانسیته اسپرماتوزوئید در انسان می باشد(۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که بین غلظت سرمی تری گلیسرید و VLDL-c با قطر سلول های لیدیگ و میزان ارتفاع اپیتلیوم زایای لوله های اسپرم ساز بیضه همبستگی منفی وجود دارد، این یافته ها همسو با گزارشی مبنی بر اثرات زیان بار افزایش میزان VLDL-c سرمی بر روی اسپرماتوژنز و نیز میزان تحرک اسپرماتوزوئید در انسان می باشد(۵). علاوه بر این، این یافته با نتایج تحقیقات Morgan و همکاران(۲۰۱۴)(۷) و هم چنین Chen و همکاران (۲۰۱۱) در مورد اثرات سوء VLDL-c بر روی کیفیت اسپرم و میزان باروری جنس نر هم خوانی دارد(۱۱). از جمله دلایل این همبستگی منفی در مطالعه حاضر این است که لیپیدهای غیرقطبی مانند تری گلیسرید به میزان ناچیز در ساخت اسپرماتوزوئید مورد استفاده قرار می گیرند(۱). گزارش شده است که اثرات سوء تری گلیسرید بر روی سلول های جنسی موجود در لوله های اسپرم ساز بیضه، به دلیل آسیب رساندن به غشای سلولی آن و اختلال در تمامیت، سیالیت و ثبات آن می باشد(۲۶). به علاوه، در انسان بین غلظت سرمی دی هیدروتستوسترون و ریخت شناسی اسپرم با سطح تری گلیسرید تام(۲۵)، هم چنین بین نسبت تری گلیسرید به آپولیپوپروتئین های B پلاسما، با سطح سرمی تستوسترون(۲۷) همبستگی منفی وجود دارد. به علاوه نشان داده شده است که هیپرتری گلیسریدمی در خرگوش موجب کاهش توانایی انجام واکنش آکروزومی در اسپرماتوزوئید و اختلال در ساختار آن می شود(۶). در مطالعه حاضر مقادیر سرمی تری گلیسرید با وزن بیضه همبستگی مثبت نشان داد این احتمال می رود که افزایش سطح سرمی تری گلیسرید، موجب افزایش تعداد رگ های لنفاوی و هم چنین افزایش توده بافت چربی در ساختار بافتی بیضه و در نتیجه افزایش وزن آن گردد(۱۶). در تحقیق حاضر بین میزان سرمی LDL-c و سنجش های آناتومیکال و هیستومتریک بیضه ارتباط معنی دار مشاهده نشد. مطابق با این مورد، Arem و همکاران اعلام نموده اند که تغییرات میزان پلاسمایی LDL-c تاثیری بر روی ساختار بافت شناسی بیضه و میزان ترشح هورمون

تستوسترون ندارد(۲۸). مطالعه حاضر دارای محدودیت هایی از جمله عدم کنترل کافی بر روی نوع ترکیبات تغذیه ای به ویژه اجزای ویتامینی رژیم خوراکی در حیوانات مورد بررسی در زمان قبل از بلوغ می باشد. به عبارت دیگر، نگارندگان این تحقیق نمی توانند به طور قطع و یقین در مورد تامین تمام نیازهای تغذیه ای حیوانات مورد بررسی در طول دوران قبل و بعد از بلوغ و یا زمان تولید مثل، اظهار نظر کنند. بهتر آن بود که رژیم خوراکی حیوانات مورد مطالعه از اولین روز پس از تولد تا هنگام بلوغ و تولیدمثل جنسی، کاملاً تحت نظارت دقیق قرار می گرفت.

یکی دیگر از محدودیت های این تحقیق، اکتفا کردن به اخذ نمونه خون ناشتا و آن هم فقط یک بار بود. دلیل این امر کوچک بودن جثه حیوانات مورد بررسی و نداشتن خون کافی برای دفعات نمونه گیری بیشتر بود به عبارت دیگر بهتر بود که در چند روز متوالی نمونه های خون ناشتا، اخذ می شد و سپس اجزای لیپیدی و میزان تستوسترون آن ها ارزیابی و در نهایت میانگین آن ها گزارش می شد.

هر چند که نتایج این تحقیق بیانگر ارتباط بین شاخص های آناتومیک و هیستومورفومتریک بیضه با برخی از اجزای لیپیدی سرم در مدل موش صحرایی است، اما از جمله کاستی های این مطالعه؛ عدم اخذ نمونه منی از حیوانات تحت بررسی و عدم مطالعه کیفیت اسپرماتوزوئید به ویژه میزان تحرک آن بود. دلیل این امر ناکافی بودن امکانات در دسترس بود. بنا بر این در آینده مطالعات بیشـتری لازم اســـت که با استفاده از آن ها بتوان در مورد ارتباط احتمالی پروفایل لیپیدی سرم خون با حجم، ویسکوزیته و تحرک اسپرم اظهارنظر نمود.

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که میزان HDL-c سرم با جمعیت سلول های جنسی و پشتیبان بافت بیضه و هم چنین فعالیت ترشحی سلول های لیدیگ بیضه ارتباط مثبت دارد. هم چنین بالا رفتن غلظت سرمی تری گلیسرید و VLDL-c؛ موجب کاهش تعداد سلول های جنسی و پشتیبان در بافت بیضه می شود و ممکن است بر روی باروری حیوان اثرات مخربی داشته باشد؛ با این وجود بررسی های بیشتری از جمله انجام مطالعات بافت شناسی در سطح میکروسکوپ الکترونی جهت نائل آمدن به مکانیسم یا مکانیسم هایی که طی آن تاثیرات فوق الذکر اعمال می شود لازم است.

یافته های تحقیق حاضر می تواند به عنوان پایه ای برای پژوهش های بیشتر در زمینه رابطه بین پروفایل لیپیدی خون و ساختار بیضه در انسان و گونه های دیگر مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین نتایج این بررسی نقش موثر HDL-c سرم در بهبود و ارتقاء ساختار بافت شناسی بیضه، جمعیت سلول های جنسی نر و هم چنین سطح سرمی تستوسترون در مدل موش صحرایی خاطر نشان می کند. علاوه بر این، با توجه به یافته های حاضر می توان افزایش غلظت سرمی تری گلیسرید و VLDL-c را به عنوان تهدید عمده ای برای قدرت باروری و میزان تولید مثل در جنس نر قلمداد نمود.

References

1.Speake BK, Surai PF, Rooke JA. Regulation of avian and mammalian sperm production by dietary manipulation. Champaign Illinois AOCS Publication 2003; p.96-117.

2.Lenzi A, Gandini L, Maresca V, Rago R, Sgro P, Dondero F, Picardo M. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. Mol Hum Reprod 2000; 6: 226-31.

3.Gulaya NM, Margitich VM, Govseeva NM, Klimashevsky VM, Gorpynchenko II, Boyko MI. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. Arch Androl 2001; 46:169-75.

4. Rana APS, Majumder GC, Misra S, Ghosh A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. Biochim Biophys Acta 1991;1061:185-96.

5. Ergun A, Kose SK, Aydos K, Ata A, Avci A. Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. Arch Androl 2007;53:21-3.

6. Diazfontdevilla M, Bustosobregon E. Cholestrol and polyunsaturated acid enriched diet effects on kinetics of the

acrosome reaction in rabbit spermatozoa. Mol Reprod 1993;35:176-80.
7. Morgan DH, Ghribi O, Hui L, Geiger JD, Chen X. Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. Am J Physiol Endocrinol Metab 2014;15:1125-30.
8. Liu Y, Zhao W, Gu G, Lu L, Feng J, Guo Q, et al. Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1) an obesity-induced rat testicular marker of reduced fertility. Mol Reprod Dev 2014; 81:55-65.
9. Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suhaparlaktas B, Sahin S. The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. Acta Urol Esp 2012; 36:153-9.
10. Schisterman EF, Mumford SL, Chen Z, Browne RW, Boyd Barr D, Kim S, Buck Louis GM. Lipid concentrations and semen quality: the LIFE study. Andrology2014;2:408-15.
11. Chen MM, Lan XX, Li CY, Tian ZM, Chen KF. Diet-induced obesity increases the apoptosis of testicular spermatogenic cells in pubertal male rats. Zhonghua Nan Ke Xue 2011; 17:342-7.
12. Gwynne JT, Hess B, Hughes T, Rountree R, Mahaffee D. The role of serum high density lipoproteins in adrenal steroidogenesis. Endocr Res1985;10:411-30.
13. Havel RJ, Kane JP. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill Publication2001; p. 2705-16.
14. Bruits CA, Ashwood RF. Tietz texbook of clinical chemistry. 2ed. Saunders Philadelohia Publication 1994; p.1002-93.
15. Faridha A, Faisal K, Akbarsha MA. Duration-dependent histopathological and histometric changes in the testis of aflatoxin B1-treated mice. J Endocrinol Reprod 2006;102: 117-33.
16.Leal MC, Beckersilva SC, Chiarinigarcia H, Franca LR. Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (*capra hircus*). Anim Reprod 2004;6:122-8.
17.Zirkin BR, Ewing LL, Kkromann N, Cochran RC. Testosterone secretion by Rat and Rabbit guinea Pig and Dog and Hamaster tests perfused in vitro correlation with leydig cell ultrastructure. Endocrinol 1980;106:1867.
18.Page ST, Mohr BA, Link CL, Odonnell AB, Bremner WJ, McKinlay JB. Higher testosterone levels are associated with increased high-density lipoprotein cholesterol in men with cardiovascular disease: results from the Massachusetts Male Aging Study. Asian J Androl 2008; 10:193-200.
19. Klinefelter GR, Ewing LL. Maintenance of testosterone production by purified adult rat leydig cells for 3 days in vitro. Cell Dev Biol 1989; 25:283-8.
20. Nolan CJ, Neuendorff DA, Godfrey RW, Harms PG, Welsh TH, Mcarthur NH , et al. Influenece of dietary energy intake on prepubertal development of Brahman bulls. J Anim Sci 1990;68:1087-96.
21. Garrett RH, Grisham CM. Biochemistry. 3ed. Belmont CA: Thomson Cole Publication 2007;p.232-4.
22. Bauchart D. Lipid absorption and transport in ruminants. J Dairy Sci 1992;76:3864-81.
23. Orth JM, Gunsalus GL, Lampert AA. Evidence from sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of sertoli cells produced during perinatal development . Endocrinol1988;122:787-94.
24. Maboundou JC, Fofana M, Fresnel J, Bocquet J, Le Goff D. Effect of lipoproteins on cholesterol synthesis in rat sertoli cells. Biochem Cell Biol1995;73:67-72.
25. Padron RS, Mas J, Zamora R, Riverol F, Licea M, Mallea L, et al. Lipids and testicular function. Int Urol Nephrol 1989; 21:515-9.
26. Meizel S. The importance of hydrolitic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. Biol Rev Camb Philos Soc 1984; 59:125-157.
27. Perova NV. Alteration of apoproteins of very low density lipoprotein from blood plasma in hypertriglyceridemia. Vopv Med Khim1979;25:185.
28. Arem R, Ghusn H, Ellerhorst J, Comstock JP. Effect of decreased plasma low-density lipoprotein levels on adrenal and testicular function in man. Clin Biochem1997; 30:419-24.

Correlation of Serum Lipids Profile with Anatomical and Histomorphometrical Parameters of the Testes in the Rat

Loueimonfared A[1], Nooraei A[2]*

(Received: May 6, 2015 Accepted: December 5, 2015)

Abstract

Introduction: The lipid compositions of spermatozoa play an important role in its physiological functions. In addition, the available evidence suggests that dietary supplementation with appropriate lipids affects spermatogenesis, sperm quality and sperm motility. The present work was performed since there are only little data on the correlation of serum lipids with endocrine and exocrine integrities of the testis.

Materials & methods: The present study was carried out on 60 normal healthy male rats. Then animal euthanasia blood samples were collected by cardiac ponction. The serum concentrations of total cholesterol and triglyceride were measured by method Enzymatic, lipoproteins were determined by method Precipitation and testosterone was measured by Radio Immuno Assay method. Anatomical indices include weight, scrotal circumference; length and width of the testis were recorded. For histomorphometric study (exocrine parameters of the testis); the 5 µ sections were made and stained with Hematoxyline-Eosin. Data were statistically analyzed by the Pearson correlation tests.

Findings: Results showed that the serum HDL-c values were significantly correlated with the diameter of the leydig cells ($r=0.38$; $p<0.05$), the diameter of the seminiferous tubules ($r=0.69$; $p<0.01$), testicular weight ($r=0.85$; $p<0.001$), scrotal circumference ($r=0.38$; $p<0.05$) and as well as serum levels of testosterone ($r=0.85$; $p<0.001$). Serum triglycerides value was also inversely correlated with the diameter of the leydig cells ($r= -0.82$; $p<0.001$) and germinal epithelium height ($r= -0.79$; $p<0.001$). In addition, the serum levels of VLDL-c was inversely correlated with the diameter of the leydig cells ($r= -0.73$; $p<0.01$) and germinal epithelium height ($r= -0.81$; $p<0.001$). Furthermore, the serum triglycerides levels had significant correlation with the testis weight ($r=0.81$; $p<0.001$).

Discussion & Conclusions: Upon to these results, it is concluded that anatomical and histomorphometrical indices of the testis are correlated with serum levels of HDL-c and also the triglycerides and VLDL-c values are inversely correlated with endocrine and exocrine integrities of the testis in the rat.

Keywords: Histology, Lipid, Testis, Testosterone, Rat

1. Dept of Basic Sciences, Faculty of Para-Veterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran
2. Dept of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
**Corresponding author Email: alm722@gmail.com*