

اثر دگزامتازون بر بیان پروتئین FasL در سلول‌های زایای اسپرم در بیضه‌ی موش سوری

دکتر محمود هاشمی‌تبار^۱، دکتر محمود اوراضی‌زاده^۲، لایسادات خرسندی^۳

نویسنده‌ی مسئول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، گروه علوم تشریح layasadat@yahoo.com

دریافت: ۸۶/۱۲/۵ پذیرش: ۸۷/۳/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول) یک فرآیند تنظیمی مهم در ساخت اسپرم است. افزایش غیرطبیعی آپوپتوز در سلول‌های زایای اسپرم منتهی به عدم تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی می‌شود و در نتیجه به روند ساخت اسپرم آسیب می‌رساند. برخی مطالعات نشان می‌دهند گلوکوکورتیکوئیدها هموستاز بیضه را با کاهش دادن سطح تستوسترون تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. در این مطالعه اثر دگزامتازون، یک ترکیب گلوکوکورتیکوئیدی پرمصرف، بر بیان پروتئین FasL، یک پروتئین پیش‌آپوپتوزی مهم، در سلول‌های زایای اسپرم در موش سوری بررسی شده است.

روش بررسی: ۲۴ سر موش سوری نر بالغ (۶ تا ۸ هفته) به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه آزمایش اول و دوم به ترتیب ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و ۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۷ روز دریافت کردند. گروه شاهد تنها نرمال‌سالین به مدت ۷ روز دریافت کرد. یک روز پس از آخرین تزریق موش‌ها قربانی شده و بیضه‌ها در محلول فرمالین جهت انجام مطالعات ایمنوهیستوشیمی قرار داده شدند. واکنش ایمنی مثبت با استفاده از روش نیمه‌کمی H-score سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهند بیان FasL در اپی‌تلیوم منی‌ساز وابسته به مراحل اسپرماتوزن است و مرحله‌ی VII حساس‌ترین مرحله نسبت به دگزامتازون می‌باشند. در گروهی که ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون دریافت کرده بود FasL تنها در مرحله‌ی VII سیکل اسپرماتوزن بیان شده بود و میانگین H-score در این مرحله افزایش قابل‌ملاحظه‌ای یافته بود ($P < 0.05$). در گروه دریافت‌کننده ۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون میانگین H-score در تمام مراحل سیکل اسپرماتوزن، به ویژه مرحله‌ی VII سیکل اسپرماتوزن افزایش یافته بود ($P < 0.05$). تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در این گروه کاهش چشمگیری نشان داد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ترکیبات گلوکوکورتیکوئیدی مانند دگزامتازون با تحت‌تأثیر قرار دادن پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی باعث ایجاد آپوپتوز می‌شوند.

واژگان کلیدی: FasL، آپوپتوز، دگزامتازون، بیضه، موش سوری

مقدمه

دانشمندان زیست‌شناسی در سال‌های اخیر به شمار می‌رود، انجام شده است (۱). مسیر ارسال پیام کاسپازها یکی از

مطالعه‌ی حاضر بر روی فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول (آپوپتوز) که یکی از موضوعات مورد علاقه‌ی

۱- دکترای علوم تشریح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

۲- دکترای بافت‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اهواز

۳- دانشجوی دکترای بافت‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

شناخته‌شده‌ترین مسیرهای آپوپتوز می‌باشد که مطالعات بسیاری در مورد آن صورت گرفته است. مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز هر دو باعث فعال شدن آبشار کاسپازها می‌شوند. مسیر خارجی آپوپتوز با اتصال پروتئین Fas Ligand (FasL) به گیرنده‌ی خود که Fas نام دارد فعال می‌شود (۲). FasL در سال ۱۹۹۳ به عنوان یک پروتئین خلال غشایی (Transmembrane) متعلق به خانواده TNF (Tomur Necrosis Factor) و با وزن ۴۰ کیلودالتون شناسایی شد (۳).

اتصال FasL به گیرنده‌ی خود منجر به فراخوانی مولکول FADD به دم سیتوپلاسمی Fas می‌شود. این سه با هم کمپلکس ارسال‌کننده‌ی پیام مرگ [Death Inducing Signaling Complex (DISC)] را تشکیل می‌دهند. انتهای آمینی مولکول FADD حاوی ناحیه‌ای به نام DED (Death Effector Domain) است که برای تعامل و به کارگیری پروکاسپاز-۸ لازم است. مجموعه‌ی Fas/FADD از طریق ناحیه‌ی DED به کاسپاز ۸ یا ۱۰ متصل می‌شود و این کاسپازها نیز باعث فعال شدن کاسپازهای مجری (کاسپازهای ۳، ۶ و ۷) می‌شوند، که نتیجه‌ی آن مرگ سلولی است. کاسپازهای مجری، آنزیم‌های پروتئولیتیک قوی هستند و فعال شدن آن‌ها منتهی به مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌شود (۲، ۴). در بافت بیضه، FasL توسط سلول سرتولی در پاسخ به عوامل آسیب‌رسان ساخته می‌شود. گیرنده‌ی آن روی سلول‌های زایا و لیدیگ وجود دارد (۵).

آپوپتوز در سلول‌های زایا یک فرآیند سلولی است که به طور معمول در بیضه‌ی پستانداران دیده می‌شود (۶). علاوه بر آپوپتوز فیزیولوژیک، عوامل دیگری نیز وجود دارند که باعث افزایش فرآیند آپوپتوز در سلول‌های زایای اسپرم می‌شوند. این عوامل شامل تابش اشعه‌ی X (۷)، مواد سمی و بعضی از داروها می‌باشند (۸، ۹). افزایش آپوپتوز در سلول‌های زایا

حالت تعادل بین تکثیر و مرگ سلول‌های زایا را از بین می‌برد و منجر به اختلال در روند اسپرماتوژنز می‌شود (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند گلوکوکورتیکوئیدها باعث مهار ترشح تستوسترون می‌شوند (۱۱). سطح تستوسترون خون توسط عمل استروئیدسازی سلول‌های لیدیگ بیضه تعیین می‌شود. سلول‌های لیدیگ گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدها را سنتز کرده، بنابراین اولین هدف عمل گلوکوکورتیکوئیدها بر بافت بیضه می‌باشند (۱۲). گلوکوکورتیکوئیدها طیف درمانی وسیعی دارند، از جمله می‌توان به بیماری‌های التهابی، عفونی، خودایمنی، نارسایی غده‌ی فوق‌کلیه، دردهای مفاصل و سرطان‌های رده‌ی لنفویید اشاره نمود (۱۳). گزارشات ارسالی دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور بیان‌گر تجویز بیش از حد آمپول دگزامتازون و نشان‌دهنده‌ی روند افزایشی تجویز این دارو در سال‌های اخیر می‌باشد. طی ۵ سال گذشته بر اساس گزارش برخی از دانشگاه‌ها آمپول دگزامتازون رتبه‌ی اول را در تجویز، در بین داروها داشته است (۱۴).

مطالعات قبلی نشان‌دهنده‌ی اثر آپوپتوزی دگزامتازون بر روی سلول‌های زایای اسپرم و سلول‌های لیدیگ می‌باشند، اما تا به حال مطالعه‌ای در زمینه‌ی تأثیر دگزامتازون بر روی ژن‌های درگیر در آپوپتوز در موش صورت نگرفته است (۱۵). از آن جایی‌که گلوکوکورتیکوئیدها بر روی هموستاز بیضه، از طریق کاهش سطح تستوسترون تأثیر می‌گذارند (۱۱) و از طرفی تجویز بی‌رویه‌ی آن‌ها در سال‌های اخیر افزایش یافته است (۱۴)، در این مطالعه اثر دگزامتازون بر روی بیان پروتئین FasL در سلول‌های زایای اسپرم بررسی شده است.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی از ۲۴ سر موش سوری نر بالغ (۶ تا ۸ هفته) با نژاد NMRI (Naval Medical Research Institute) استفاده شده است. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی در دمای ۲۵

دی‌آمینوبنزی‌دین (DAB) برای ۸ دقیقه قرار گرفتند. محل‌های حاوی پروتئین FasL در این مرحله به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند. رنگ‌آمیزی افتراقی با هماتوکسیلین هریس صورت گرفت و اسلایدها با استفاده از چسب انتلان چسبانده شدند. برای مطالعه‌ی ایمنوهیستوشیمی ۵ حیوان از هر گروه در نظر گرفته شد و از هر حیوان ۳ اسلاید به روش ایمنوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شد. اسلایدها توسط دو نفر خوانده شدند. تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با روش نیمه‌کمی، H-score (Histo-score) انجام شد (۱۸ و ۱۷):

$$H\text{-score} = \sum P_i (i+1)$$

P_i = درصد سلول‌های رنگ شده برای هر شدت

i = شدت رنگ‌آمیزی

(۰ = عدم وجود رنگ، ۱ = ضعیف، ۲ = متوسط و ۳ = شدید)

لازم به ذکر است که در این روش شدت رنگ ایجاد شده و درصد سلول‌های رنگ شده با بیان پروتئین FasL نسبت مستقیم دارد، بنابراین هرچه میزان H-score بیشتر باشد، سطح بیان پروتئین FasL نیز بالاتر است.

در هر اسلاید ۲۰ مقطع عرضی لوله‌ی سمینفر با روش H-score سنجیده شد و پس از تعیین مراحل چرخه‌ی اپی‌تلیوم منی‌ساز برای هر مرحله میانگین H-score به طور جداگانه محاسبه شد. برای شمارش سلول‌های اسپرماتوسیت (اسپرماتوسیت اولیه) از هر بیضه ۸ اسلاید انتخاب و به طریق هماتوکسیلین - اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. در هر اسلاید مقطع عرضی ۲۰ لوله‌ی سمینفر با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین مراحل مختلف چرخه‌ی اسپرماتوژنز از روش رایج راسل استفاده شد. طبق این روش چرخه‌ی اسپرماتوژنز در موش ۱۲ مرحله دارد و هر مرحله دارای خصوصیات منحصر به فردی است که بر این اساس می‌توان مراحل مختلف چرخه‌ی اسپرماتوژنز را شناسایی کرد (۱۹).

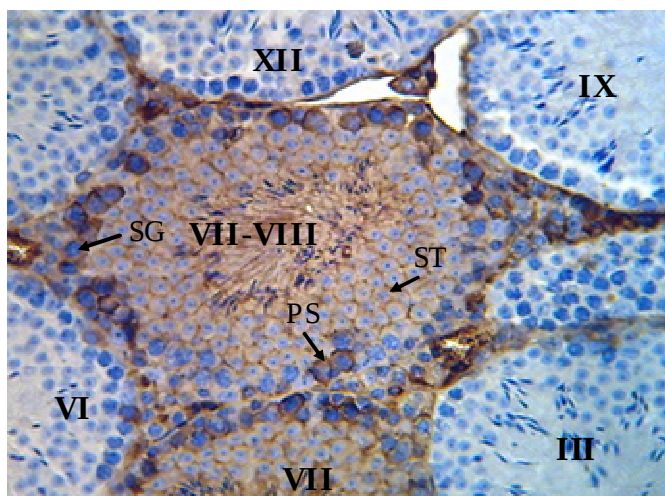
درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۷۵ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. سپس به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه آزمایش اول ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و گروه آزمایش دوم ۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون روزانه به مدت ۷ روز (۱۶، ۱۵) به صورت تزریق صفاقی دریافت کردند و در گروه شاهد تنها نرمال‌سالین به صورت صفاقی به مدت ۷ روز تزریق شد. یک روز پس از آخرین تزریق موش‌ها قربانی شده و بیضه‌ها در فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و پس از پردازش بافتی از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شد.

روش رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی: ابتدا برش‌های ۵ میکرونی از بلوک‌های پارافینی تهیه شد و سپس بر روی آن‌ها رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی انجام شد. مراحل انجام رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی طبق سفارش شرکت سازنده‌ی کیت آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به شرح زیر است: برش‌های پارافینی پس از دو تغییر در گزیرلول و چند تغییر در درجات مختلف الکل اتانل (۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) آماده‌ی رنگ‌آمیزی شدند. مهار فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز درون‌زاد با قراردادن برش‌ها در محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن در بافر فسفات، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس نمونه‌ها در بافر سیترات (pH: ۶) در دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. مهار محل‌های غیراختصاصی آنتی‌بادی توسط محلول ۵ درصد سرم بز در بافر فسفات (pH: ۷/۵) برای مدت ۱ ساعت انجام شد. به نمونه‌ها آنتی‌بادی منوکلونال FasL (SC-7480, Santa Cruz) اضافه شد و برای یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. بعد از شست‌وشو با بافر فسفات، آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به آنزیم پراکسیداز (SC-2017, Santa Cruz) به نمونه‌ها اضافه شد. پس از شست‌وشو با بافر فسفات، نمونه‌ها در معرض سوبسترای

آنالیز آماری: نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS، به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه‌ی (ANOVA) و متعاقب آن تست Tukey انجام شد. سطح معنی‌دار در این مطالعه $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در گروه شاهد پروتئین FasL بیان نشده بود. در گروه دریافت‌کننده‌ی ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون پروتئین FasL تنها در مرحله‌ی VII-VIII سیکل اسپرماتوژنز بیان شده بود و شدت بیان آن نیز نسبت به گروهی که ۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون دریافت کرده بود در همین مرحله ضعیف‌تر بود (شکل ۱).

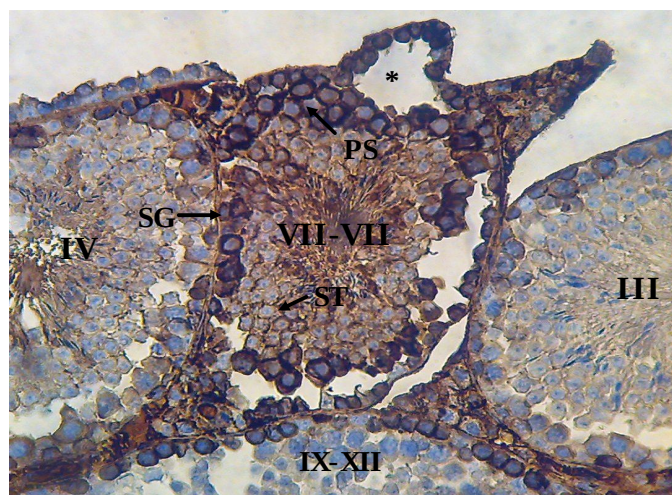


شکل ۱: مقطع بافت بیضه در گروه دریافت‌کننده‌ی ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم. بیان پروتئین FasL در مراحل VII-VIII چرخه‌ی اسپرماتوژنز به صورت شدت رنگ یک یا دو درجه در اسپرماتوگونیه‌ها (SG)، ۲ یا ۳ درجه در اسپرماتوسیت‌های اولیه (PS) و یک یا دو درجه در اسپرماتیدها (ST) مشاهده می‌شود. در سایر مراحل اسپرماتوژنز مانند مراحل III, VI, IX و XII بیان پروتئین FasL مشاهده نمی‌شود (X400).

طویل متوسط تا شدید (شدت رنگ ۲ و ۳ درجه) بود. در مراحل I-III شدت رنگ در اسپرماتوگونیه‌ها و اسپرماتوسیت‌ها متوسط بود (۲ درجه) و اسپرماتیدها به طور ضعیف (۱ درجه) رنگ گرفته بودند ($P < 0/05$). در مراحل IV-VI شدت رنگ در اسپرماتوگونیه‌ها و اسپرماتوسیت‌ها متوسط بود (۲ درجه) و اسپرماتیدها نیز به طور متوسط رنگ گرفته بودند ($P < 0/05$). در مراحل IX-XII شدت رنگ در اسپرماتوگونیه‌ها

در گروه دریافت‌کننده‌ی ۷ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون پروتئین FasL در تمام مراحل چرخه‌ی اسپرماتوژنز بیان شده بود. در مرحله‌ی VII-VIII سیکل اسپرماتوژنز، FasL شدیداً در سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتوگونیه‌ها بیان شده بود (شدت رنگ ۳ درجه). اسپرماتیدهای گرد به طور متوسط رنگ گرفته بودند (شدت رنگ ۲ درجه). اما شدت رنگ در اسپرماتیدهای

شدید و در سایر سلول‌های زایا منفی یا ضعیف بود (شکل ۲).



شکل ۲: مقطع بافت بیضه، گروه دریافت‌کننده ۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون. بیان پروتئین *FasL* در مراحل VII-VIII چرخه‌ی اسپرماتوژنز به صورت شدت رنگ ۳ یا ۲ درجه در اسپرماتوگون‌ها (SG)، اسپرماتوسیت‌های اولیه (PS) و اسپرماتیدها (ST) مشاهده می‌شود. در سایر مراحل اسپرماتوژنز مانند مراحل IV و III بیان پروتئین *FasL* به صورت ۱ تا ۲ درجه در اسپرماتوسیت‌ها و ۱ درجه در اسپرماتیدها مشاهده می‌شود. در مراحل IX-XII بیان پروتئین *FasL* به صورت ۲ تا ۳ درجه در اسپرماتوگون‌ها و ۱ درجه در اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها مشاهده می‌شود. تعداد زیادی از اسپرماتوسیت‌ها از بین رفته‌اند (*) (X400) رفته‌اند (*) (X400).

مقایسه‌ی میانگین H-score بین گروه‌های شاهد و آزمایش نشان‌دهنده‌ی افزایش شدت و درصد قابل‌ملاحظه‌ی بیان پروتئین *FasL* در گروه‌های آزمایش، به ویژه گروه دریافت‌کننده ۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم دگزامتازون می‌باشد که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱: درصد و شدت بیان پروتئین *FasL* بر اساس معیار *H-score* و مقایسه‌ی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دگزامتازون با گروه شاهد

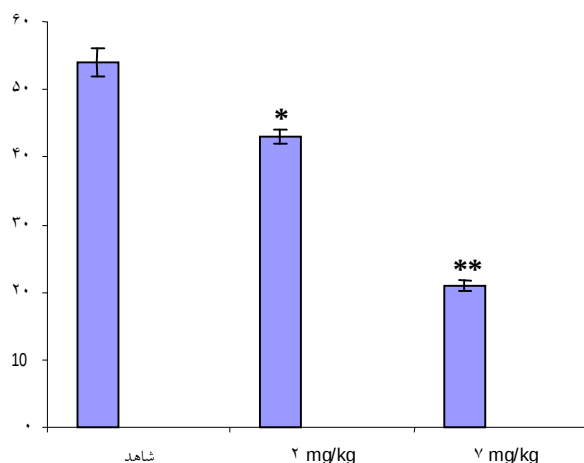
گروه‌ها (میانگین $\pm$ انحراف معیار)			
مراحل چرخه‌ی اسپرماتوژنز	شاهد	۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم	۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم
I-III	۱۰۰	۱۰۰	$139/1 \pm 5^*$
VI-IV	۱۰۰	۱۰۰	$160/2 \pm 4^*$
VII-VIII	۱۰۰	$173 \pm 8^*$	$288 \pm 11^{**}$
XI-XII	۱۰۰	۱۰۰	$120 \pm 6^*$

Pvalue بر اساس تست Tukey بیان شده است.

$P < 0.05$ و $P < 0.01$ **

به دلیل این که در گروه‌های آزمایش اسپرماتوسیت‌های اولیه حساس‌ترین سلول‌ها نسبت به دگزامتازون بودند و در بعضی از لوله‌ها این سلول‌ها تخریب شده و جای خالی آن‌ها کاملاً مشهود بود (شکل ۱)، تعداد اسپرماتوسیت‌ها در گروه‌های

مختلف در نظر گرفته شد. تعداد اسپرماتوسیت‌ها در گروه آزمایش دوم کاهش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه شاهد ($P < 0.001$) و گروه آزمایش اول ($P < 0.05$) نشان داد (نمودار ۱).



نمودار ۱: تعداد اسپرماتوسیت‌ها به ازای هر لوله اسپرم‌ساز (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در گروه‌های مختلف. *Pvalue* بر اساس تست *Tukey* بیان شده است.

$P < 0.05$ و $P < 0.01$ **

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه بیان‌گر این مطلب است که دگزامتازون باعث افزایش بیان پروتئین FasL می‌شود که این افزایش تحت تأثیر مراحل مختلف اسپرماتوژنز قرار می‌گیرد. به طوری که این پروتئین در گروه‌های آزمایش در مراحل VII چرخه‌ی اسپرماتوژنز شدیداً بیان می‌شود.

یساوازا و همکارانش در تحقیقاتشان با استفاده از روش تونل (TUNEL) روش اختصاصی برای تشخیص آپوپتوز، متوجه شدند که دگزامتازون باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های زایا به میزان ۱۰ برابر بیشتر می‌شود (۱۵). برنیر و همکارانش (۱۹۹۹) نشان دادند دگزامتازون و سایر آگونیست‌های صنایع گلوکوکورتیکوئیدی اثر مهاری بر تولید

تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ بیضه در محیط کشت دارند (۱۹). گائو و همکارانش در تحقیقات خود نشان دادند که افزایش در غلظت گلوکوکورتیکوئیدهای سرم ناشی از استرس منجر به مهار فعالیت آنزیم‌های سازنده‌ی تستوسترون و کاهش تعداد سلول‌های لیدیگ می‌شوند، در نتیجه ترشح تستوسترون کاهش می‌یابد (۱۵). هاردی و همکارانش نیز اثر مهاری گلوکوکورتیکوئیدها بر تولید تستوسترون را نشان دادند (۲۰). بدیهی است که هر وقت بیضه نتواند اسپرماتوژنز را از طریق تولید تستوسترون حمایت کند، یک مسیر پیام‌رسان خاصی فعال می‌شود، که نهایتاً منجر به آپوپتوز خواهد شد (۲۱). هوروشی و همکارانش (۲۰۰۱) در

نتیجه گرفت که دگزامتازون احتمالاً به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم بر روی سلول‌های زایای اسپرم اثر می‌کند. در روش مستقیم از طریق تأثیر بر روی بیان پروتئین‌های آپوپتوزی سلول‌های زایا و ایجاد آپوپتوز در آن‌ها باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز می‌شود. در روش غیرمستقیم از طریق تخریب سلول‌های لیدیگ و کاهش سطح تستوسترون، سلول‌های زایا را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ابراز می‌دارند.

منابع

- 1- Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, et al. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology*. 2003; 144: 3167-75.
- 2- Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 647-56.
- 3- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*. 1999; 33: 29-55.
- 4- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15: 269-90.
- 5- Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 85: 175-82.

تحقیقات خود نشان دادند که دگزامتازون می‌تواند آپوپتوز ناشی از ایسکمی بیضه‌ی را افزایش دهد. آن‌ها برای ایجاد ایسکمی بر روی بیضه موش عمل جراحی انجام دادند و با استفاده از روش تونل متوجه شدند در گروهی که دگزامتازون دریافت کرده، آپوپتوز افزایش چشمگیری پیدا کرده است (۲۲).

در مطالعه‌ی کنونی افزایش بیان پروتئین FasL در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دگزامتازون نشان‌دهنده‌ی افزایش آپوپتوز می‌باشد که با یافته‌های فوق هم‌خوانی دارد. نتایج این تحقیق اولین گزارش در مورد هرگونه ارتباط بین گلوکوکورتیکوئیدها و ژن‌های درگیر در آپوپتوز در سلول‌های زایای بیضه را ارائه می‌دهد. با مقایسه‌ی نتایج این تحقیق و پژوهش‌های سایر محققین (۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۳) می‌توان

- 6- Kierszenbaum AL. Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol Repord Dev*. 2001; 58: 1-3.
- 7- Henriksen K, Kulmala J, Toppari J, Mehrotra K, Parvinen M. Stage- specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *J Androl*. 1996; 17: 394-402.
- 8- Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both sertoli cell vimentine filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; 137: 42-50.
- 9- Allard E, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2, 5-hexandione-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; 137: 149-56.
- 10- Makoto K, Naoki I, Seiji T, Takumi S, et al. Balanced of apoptosis and proliferation of germ

cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androlog.* 2003; 24: 185-191.

11- Macky LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signalling pathways. *Endocr Rev.* 1999; 20: 435-59.

12- Bahiru G, Cheryl W. Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cell line. *Cell Biochem.* 2003; 87: 133-146.

13- Schmidt S, Ranier J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induce apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004; 11: 45-55.

14. Soleimani F, Gholami KH, Tehrani A. Increasing dexamethasone administration. *Food Drug commission.* 2003; 1: 3.

15- Yawaza H, Sasagawa I, Nakada T. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human Reprod.* 2000; 15: 197-205.

16- Gao HB, Tong MH, Hu HYQ, et al. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 199: 153-63.

17- Ariel R, Hila R, Edward Y, et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptore antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzopyrene. *Reproduct Toxicol.* 2001; 15: 479-86.

18- Pallares J, Bussaglia E, Martinez JL, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Modern pathology.* 2005; 18: 719-27.

19- Russell LD, Ettlin RA, Sinha AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press.* 1990; 3: 87-96.

20- Bernier M, Gibb W, Collu R, Ducharme JR. Effect of glucocorticoids on testosterone production by porcine Leydig cells in primary culture. *Can Physiol Pharmacol.* 1999; 62: 1166-9.

21- Hardy MP, Gao HB, Dong Q, et al. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res.* 2005; 322: 147-53.

22- Koji T, Hishikawa Y, Ando H, Nakanishi Y, Kobayashi N. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Boil Report.* 2001; 64: 946-54.

23- Horoshi Y, Isoji S, Yasuhiro S. Effect of dexamethasone on germ cell apoptosis in the contralateral testis after testicular ischemia reperfusion injury in the rats. *Fertility sterility.* 2001; 6: 139-147.

Effect of Dexamethasone on Fas Ligand Expression in Mouse Testicular Germ Cells

Hashemitabar M, Orazizadeh M, Khorsandi LS

Corresponding Author's Address: Department of Anatomical Sciences, Jundi Shapour University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran

E-mail: layasadat@yahoo.com

Background and Objectives: Apoptosis (programmed cell death) is an important regulatory event in spermatogenesis. Abnormally accelerated apoptosis in germ cells, may lead to an imbalance between cell proliferation and death, resulting in impairment in spermatogenic. Some studies have shown that glucocorticoids affect testicular homeostasis by decreasing of testosterone level. In the present study, the influence of dexametasone (Dex), a widely used glucocorticoid agent, on expression of FasL (Fas-Ligand) protein (a proapoptotic protein) in mouse testicular germ cells is investigated.

Materials and Methods: Twenty-four adult male (6- 8 weeks) mice were randomly divided into 3 groups. The first and second test groups received 2 and 7 mg/kg Dex per day, respectively, for 7 days. The control group received only saline daily for 7 days. One day after the final injection, the mice were sacrificed and the test groups were placed in formalin solution for immunohistochemistry studies. Positive immunoreactivity was calculated by H-score method.

Results: The results revealed that expression of FasL in seminiferous epithelium is spermatogenic stage dependent, and the stage VII was the most susceptible to Dex. FasL expression was observed only at stages VII-VIII of spermatogenic cycle in 2 mg/kg Dex treated group ($P<0.05$). H-score was significantly increased in all stages of 7 mg/kg Dex treated group ($P<0.05$). The number of spermatocytes decreased significantly in this group.

Conclusions: It appears that glucocorticoid agents such as Dex, induces apoptosis by affecting proapoptotic proteins.

Key words: FasL, Apoptosis, Dexamethasone, Testis, Mice