Physiology and Pharmacology, 18 (1), 47-60

Spring 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Protective effects of celecoxib on inflammatory cytokine levels and testis indices after induction of varicocele

Bahareh Habibi[1], Hamid Reza Sadeghipour[1*], Behjat Seifi[1], Mohammad hossein Mugahi[2], Taher Akbari Saeed[3]

1. Dept. of physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
2. Dept. of Histology, School of Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
3. Dept. of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

Received: 13 Jan 2014 **Accepted: 13 Mar 2014**

Abstract

Introduction: Varicocele is a pathological dilation of spermatic cord vein plexus, and celecoxib, an inhibitor of cyclo-oxygenase-2, is widely used in the treatment of chronic inflammation. So, we examined the effects of celecoxib on inflammatory cytokines, testicular Sertoli and spermatogonial cells number, seminiferous tubule diameter, and sperm indices in immature male rats with induced varicocele.

Methods: Twenty four immature Wistar male rats (100-120 gr) were randomly assigned into four groups (sham, varicocele, celecoxib sham and celecoxib varicocele). The sham group underwent sham operation, and the varicocele group underwent partial ligation of the renal vein to induce experimental varicocele. In the celecoxib group 30 mg/kg celecoxib was administrated for 5 weeks (8-13 weeks) by gavage. Serum, testis and sperm samples were collected at the end of 13 weeks for evaluation of celecoxib effects. Histological evaluation of the testis was made by periodic acid Schiff staining. Levels of cytokines IL-6 and INF- γ in serum and testis were assessed by ELISA kits. Sperm indices, seminiferous tubule diameter, and cell counts were evaluated.

Results: Celecoxib caused a significant decrease in concentration of serum and testis inflammatory cytokines, compared to the varicocele group ($P<0.05$). Celecoxib also significantly increased testicular cell numbers (Sertoli cells and spermatogonia), seminiferous tubule diameter and sperm motility compared to the varicocele group ($P<0.05$).

Conclusion: Varicocele has a detrimental effect on fertility by increasing cytokines levels and decreasing cell numbers, seminiferous tubule diameter and sperm indices, and celecoxib may be beneficial for treatment of varicocele by improving varicocele side effects.

Key words: Celecoxib, Varicocele, IL-6, INF-γ, Testicular tissue

* Corresponding author e-mail: Sadeghipour@tums.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (۱)، ۴۷- ۶۰
بهار ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثرات حفاظتی سلکوکسیب بر میزان سیتوکین های التهابی و شاخص های بافت بیضه بعد از القای واریکوسل

بهاره حبیبی[۱]، حمیدرضا صادقی پور رودسری[۱*]، بهجت سیفی[۱]، سید محمد حسین نوری موگهی[۲]، طاهر اکبری سعید[۳]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۲. گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

دریافت: ۲۳ دی ۹۲ پذیرش: ۲۳ اسفند ۹۲

چکیده

مقدمه: واریکوسل اتساع پاتولوژیک شبکه وریدی طناب اسپرماتیک می‌باشد و سلکوکسیب بعنوان مهارکننده آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ در درمان التهاب‌های مزمن استفاده می‌شود از اینرو در این مطالعه به بررسی اثرات سلکوکسیب بر سطح سیتوکین‌های التهابی، تعداد سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونیا در بافت بیضه، قطر لوله‌های منی ساز و شاخص‌های اسپرم در موش‌های نر نابالغ واریکوسل شده پرداختیم.

روش ها: تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نابالغ (۱۰۰-۱۲۰ گرم) بطور تصادفی در چهار گروه (شم، واریکوسل، سلکوکسیب و شم سلکوکسیب) گنجانده شدند. گروه شم تحت عمل جراحی شم قرار گرفت و در گروه واریکوسل با بستن ورید کلیوی، واریکوسل القا شد. در گروه سلکوکسیب، بعد از القای واریکوسل، به مدت ۵ هفته (۱۳-۸) میزان ۳۰ میلی گرم/ کیلوگرم سلکوکسیب بصورت گاواژ تجویز شد. پایان هفته ۱۳ از تمامی موش‌ها نمونه‌ی سرم و بافت برای بررسی اثرات سلکوکسیب تهیه شد. بررسی‌های بافت شناسی با رنگ آمیزی پریودیک اسید شیفت انجام شد. سیتوکین‌های التهابی با استفاده از کیت الیزا اندازه گیری شدند. شاخص‌های اسپرم، قطر لوله های منی ساز و شمارش سلول‌ها انجام شد.

یافته ها: سلکوکسیب توانست بطور معناداری غلظت سیتوکین‌ها را در سرم و بافت بیضه در مقایسه با گروه واریکوسل کاهش دهد ($P<0/05$) و سبب افزایش سلول‌های بافت بیضه، قطر لوله‌های منی‌ساز و تحرک اسپرم در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفته شود ($P<0/05$).

نتیجه گیری: این مطالعه بیان کرد که واریکوسل با افزایش سطح سیتوکین‌ها و کاهش تعداد سلول‌ها، قطر لوله‌ها و کاهش زنده‌مانی اسپرم باروری را کاهش می‌دهد و سلکوکسیب با کاهش اثرات تخریبی واریکوسل می‌تواند در درمان آن موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: سلکوکسیب، واریکوسل، اینترلوکین-۶، اینترفرون گاما، بافت بیضه، موش‌های نابالغ

مقدمه

واریکوسل به اتساع غیرطبیعی و پاتولوژیک وریدهای بیضه‌ای در شبکه‌ی وریدی پامپینیفرم گفته می‌شود که شایع‌ترین علت ناباروری مردان است. طبق مطالعات گذشته شیوع آن در مردان به۱۰-۲۰٪ می‌رسد که از این مقدار ۳۵-۴۰٪ در مردان با ناباروری اولیه و ۸۰٪ در مردانی با ناباروری ثانویه مشاهده می‌شود. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که حتی افراد مبتلا به واریکوسل که آنالیز سمن طبیعی داشته و بارور هستند در خطر از دست دادن عملکرد بیضه و ناباروری در آینده می‌باشند [۱۹، ۲۵].

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Sadeghipour@tums.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

مهمترین علت واریکوسل برگشت روبه عقب جریان خون از عروق اسپرماتیک و کرماستریک به شبکه پامپینیفرم می‌باشد که این امر بعلت نقص در دریچه‌های وریدی می‌باشد. فقدان این دریچه‌ها سبب افزایش فشار هیدرواستاتیکی در عروق بیضه شده که در نهایت فشار شریانی را بالا می‌برد و سبب هیپوکسی در خون‌رسانی بیضه‌ها، لوله‌های منی‌ساز و اختلال در تولید اسپرم می‌شود [۲۸]. واریکوسل از طریق افزایش عوامل التهابی مثل اینترلوکین-۱ و اینترلوکین-۸ سبب کاهش حرکات اسپرم و در نتیجه کاهش میزان باروری می‌گردد [۷، ۲۵].

سیتوکین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های محلول در آب هستند که وظیفه انتقال پیام بین سلول‌ها را بر عهده دارند. آنها در سلول‌های مختلف سیستم ایمنی تولید می‌شوند. ساختار آن‌ها پروتئین، پپتید و یا گلیکوپروتئین می‌باشد. سیتوکین‌ها بر اساس عملکرد، سلول‌های مترشحه و سلول‌های هدف دارای چند زیر گروه شامل اینترلوکین، کموکاین، اینترفرون، فاکتور نکروزکننده‌ی تومور (TNF)، عوامل تحریک کننده کولونی، لنفوکین و منوکین‌ها هستند که هرکدام از سلول‌های متفاوتی ترشح می‌شود [۵، ۲۲]. طبق مطالعات مشابه بر روی اینترلوکین-۱ (IL-1) دیده شده است که پس از گذشت ۹ هفته از زمان القای واریکوسل میزان اینترلوکین-۱ (IL-1) در دستگاه گلژی، سلول‌های لیدیگ و سر اسپرماتیدها افزایش می‌یابد، ۱۱ هفته پس از القای واریکوسل میزان اینترلوکین-۱ (IL-1) در اسپرم‌ها و سلول‌های سرتولی و ۱۳ هفته بعد در تمام لوله‌های منی‌ساز افزایش یافته و قابل اندازه گیری است [۳۰]. در نتیجه بهترین زمان برای اندازه‌گیری سیتوکین‌ها ۱۳ هفتگی می‌باشد که در کل بافت بیضه قابل تشخیص و اندازه-گیری است. اینترلوکین-۶ (IL-6) توسط منوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها و سایر سلول-ها در پاسخ به تحریکات التهابی ترشح می‌شود. اثرات التهابی آن مشابه TNF-α و IL-1 است و با اتصال به رسپتور اختصاصی خود باعث القای پاسخ فاز حاد و ایجاد تب می‌شود که در واریکوسل دیده شده میزان آن افزایش می‌یابد [۱۰]. اینترفرون گاما سیتوکین اصلی فعال کننده‌ی ماکروفاژهاست و اعمال مهمی را هم در ایمنی ذاتی و هم در ایمنی اکتسابی انجام می‌دهد. این سیتوکین معرف زیر مجموعه‌ی لنفوسیت-های T کمک کننده (TH1) است. اینترفرون گاما را اینترفرون ایمن یا اینترفرون نوع II نیز می‌نامند، تا حدودی فعالیت غیر ویروسی دارد ولی از این لحاظ چندان قوی نیست و بیشتر به عنوان سیتوکین اجرایی پاسخ ایمنی عمل می‌کند. نکته‌ای که قابل توجه است این است که اینترفرون گاما سبب آپوپتوز می‌شود و همین امر در واریکوسل سبب کاهش سلول-های سرتولی و اسپرماتوگونی شده است [۱۵، ۲۹]. ثابت شده است که بعضی از سیتوکین‌ها سبب کاهش حرکت و زنده‌مانی اسپرم می‌شوند و ایجاد واریکوسل با کاهش هورمون تستوسترون و کاهش سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونیا و افزایش سطح سیتوکین‌های التهابی میزان باروری را کاهش می‌دهد [۴۱].

سلکوکسیب (Celecoxib) یا سلبرکس یک داروی ضد التهاب و ضد درد است که جزو دسته داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug) NSAID,) می‌باشد [۳۲]. سلکوکسیب نوعی آنزیم به نام سیکلواکسیژناز (Cyclooxygenase) را در بدن مهار می-کند. از آنجایی که آنزیم سیکلواکسیژناز دو ایزوفرم دارد (COX-1, COX-2)، ثابت شده است که سلکوکسیب ۲۰-۱۰ برابر اثر مهارکنندگی بیشتری بر آنزیم سیکلواکسیژناز نوع ۲ دارد [۳۱]. آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) از مهمترین آنزیم-های میانجی التهاب در بدن است. این آنزیم باعث تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین‌ها شده که منجر به بروز التهاب و درد در بدن می‌گردد. سلکوکسیب با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز موجب می‌شود تا مقدار پروستاگلاندین بدن کم شده و درد و التهاب هم کاهش یابد [۴]. سلکوکسیب بر روی تولید پروستاگلاندین‌هایی که موجب محافظت دیواره معده می‌شوند (COX-1) تأثیری ندارد. طبق مطالعات قبلی در این زمینه، در افراد عقیم و مبتلا به واریکوسل میزان ماکروفاژها که یکی از منابع تولید کننده‌ی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ می‌باشند افزایش می‌یابد. آنزیم سیکلو اکسیژناز هم سبب تولید پروستاگلاندین‌ها در سلول‌های لیدیگ شده که از این طریق فاکتورهای التهابی از جمله اینترفرون گاما (IFN-γ) را افزایش می‌دهد و هم سبب کاهش سطح تستوسترون خون می‌گردد [۱۴]. در نتیجه سلکوکسیب با اثر مهاری بر آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ و کاهش پروستاگلندین‌ها، سطح سیتوکین-

هـای التهـابی را کـاهش مـی‌دهـد [۲۷، ۳۹]. از طرفـی سلکوکسیب با کاهش فسفریلاسیون آنزیم جانوس کیناز سبب کاهش فسفریلاسیون ژن مربوطه (STAT-3) شده و بیان اینترلوکین-۶ را کاهش می‌دهد. همچنین سلکوکسیب با القای آپوپتوز در سلول‌های تولید کننده‌ی اینترلوکین-۶ (IL-6) میزان این سیتوکین را کاهش می‌دهد [۶، ۱۱]. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که پروستانوئیدها مثل پروستاگلندین-۲ بر عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ تأثیر گذاشته و با اثر مستقیم یا غیر مستقیم خود بر سیستم عروقی می‌توانند تولید اسپرم‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. از طرفی آنزیم سیکلواکسیژناز از طریق تولید پروستاگلندین‌ها اثر فیدبک منفی بر ترشح و تولید هورمون‌های استروئیدی در سلول‌های لیدیگ دارد [۳، ۳۵].

تاکنون مطالعات کمی درباره عملکرد سلکوکسیب در باروری و عملکرد بافت بیضه انجام شده، از طرفی مهمترین مشکلی که متخصصان اورولوژی برای درمان واریکوسل اطفال دارند این است که تاکنون مطالعات کمی درباره واریکوسل در زمان قبل از بلوغ انجام شده است و اطلاعات کمی در این زمینه وجود دارد. با توجه به اینکه واریکوسل در اطفال بیشتر از نوع درجه یک است و عدم درمان آن سبب ابتلای کودکان به تومورهایی به نام Wilms می‌شود [۱۳]، همچنین با ایجاد نقص در سیستم هیپوفیزی-گنادی عواملی را که برای باروری آینده لازم است از بین می‌برد تصمیم گرفتیم تا به بررسی اثر سلکوکسیب در درمان موش‌های نابالغ بپردازیم.

مواد و روش ها

این مطالعه در آزمایشگاه گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۱ انجام گرفته است که در آن از ۲۴ سر موش صحرایی نر نابالغ (۶ موش در هر گروه) در محدوده وزنی ۱۲۰- ۱۰۰ گرم، در شرایط استاندارد از نظر نور (با چرخه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی)، حرارت (۲±۲۲)، دسترسی آزاد به آب و غذا استفاده شد و نکات اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. حیوانات به دو گروه اصلی واریکوسل و سلکوکسیب تقسیم بندی شدند. در گروه واریکوسل برای القای واریکوسل پس از بی‌هوشی با کتامین (۵۰ mg/kg به صورت IP) و گزیلوکائین (۷ mg/kg به صورت IP) حیوانات در حالت سوپاین قرار داده شدند و یک برش میدلاین عمودی در شکم در حدود ۴-۳ سانتی متر ایجاد شد. پس از یافتن ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن، به آرامی اطراف ورید کلیوی چپ باز گردید، سپس یک آنژیوکت شماره ۲۰ به موازات ورید قرار داده شد و بوسیله نخ بخیه سیلک ۴ صفر آنژیوکت روی ورید گره زده شد به طوریکه محل گره، بعد از محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی بود. بعد از زدن گره، آنژیوکت به آرامی خارج شد و به ورید اجازه داده شد که به حالت اول خود باز گردد. طبق متد کوکزال (Koksal) و همکارانش این امر قطر ورید کلیه چپ را حدود ۵۰ درصد کاهش خواهد داد. سپس محل برش شکمی در دولایه (عضله و پوست) بخیه زده شد. در گروه شم یک برش میدلاین در شکم ایجاد شد ورید کلیوی پیدا شد نخ بخیه هم قرار داده شد ولی گره نزدیم. گروه سلکوکسیب هم به مدت ۵ هفته (هفته ۱۳-۸ بعد از القای واریکوسل) دارو را دریافت کرد و در گروه شم سلکوکسیب، به جای سلکوکسیب از نرمال سالین استفاده شد سپس تمامی موش‌ها در پایان هفته ۱۳ برای بررسی اثر سلکوکسیب بر پارامترهای بافت بیضه، تعیین غلظت سیتوکین‌ها در سرم و بافت و شاخص‌های اسپرم کشته شدند [۱۱].

بطور کلی مطالعه شامل سه پروتکل بود: الف) پروتکل بررسی فاکتورهای التهابی در خون و سوپرناتانت بافت بیضه. ب) پروتکل بررسی فاکتورهای بافتی. ج) پروتکل بررسی فاکتورهای تحرک و زنده‌مانی اسپرم. مطالعات بافت شناسی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین صورت گرفت.

۱۳ هفته بعد از القای واریکوسل، ناحیه شکمی مجدداً باز شده بعد از مشاهده القای واریکوسل هر دو بیضه حیوانات را خارج کردیم بدین صورت که بعد از باز کردن هر دو کیسه‌ی بیضه، بیضه‌ها و اپیدیدم‌های حیوانات به دقت از بدن خارج، وزن و حجم آن‌ها تعیین شد. اپیدیدیم چپ حیوانات در نرمال سالین شستشو داده شد تا عاری از خون گردد. سپس بافت اپیدیدیم در یک پتری دیش حاوی ۲ میلی لیتر نرمال سالین خرد شد تا برای اندازه‌گیری اسپرم آماده باشد. بیضه

چپ جهت بررسی‌های بافت شناسی داخل فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد و هر ۱۰۰ میلی‌گرم از بیضه راست با ۱ cc محلول PBS روی یخ هموژن شده و سوپ حاصله در دستگاه سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با دور ۱۳۰۰۰ rpm، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سوپرناتانت آن برای بررسی سطح سیتوکین‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری شد.

روش تهیه‌ی نمونه‌ی خون: در پایان هفته‌ی ۱۳ نمونه-های خونی از ورید اجوف تحتانی حیوانات گرفته شده و با دور ۳۰۰۰ rPm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد سپس سرم آن‌ها در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شده تا غلظت سیتوکین‌های التهابی با استفاده از کیت الایزای حیوانی اندازه‌گیری شود.
(Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter, Austria)

اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز: برای اندازه‌گیری قطر لوله‌ها، بهترین نتیجه وقتی بدست می‌آید که بزرگ‌نمایی عدسی میکروسکوپ ۱۰ یا ۲۰ باشد [۲۱]. برای اندازه‌گیری، لوله‌هایی در نظر گرفته شدند که از لحاظ ظاهری به شکل دایره و یا شبیه به آن باشند. لوله‌هایی که به شکل بیضی بودند (به علت برش مایل) در اندازه‌گیری به حساب نیامدند.

در هر گروه، قطر بزرگ و قطر کوچک تعداد زیادی از لوله‌ها اندازه‌گیری شد و از قطر بزرگ تمامی لوله‌ها میانگین و انحراف معیار بدست آمد. لوله‌هایی که قطر بزرگ آن‌ها از میانگین به علاوه انحراف معیار بیشتر بودند از دور خارج شدند که با این کار آرتیفکت ناشی از برش حذف خواهد شد (توضیح اینکه لوله‌های منی‌ساز در هنگام برش ممکن است به صورت مایل بریده شوند و در نتیجه شکل آن‌ها به حالت بیضی در می‌آید). بعد از تهیه‌ی لوله‌های گرد با استفاده از نرم‌افزار Image tools و با در دست داشتن لام نئوبار قطر لوله‌های منی‌ساز را محاسبه کردیم.

شمارش سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی: در هر گروه از هر موش، ۱۵ لوله‌ی منی‌ساز انتخاب گردید به طوریکه از هر موش ۳ لام و از هر لام ۵ لوله شمارش شد، سپس میانگین کل از تعداد سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی بدست آمد.

روش نمونه گیری اسپرم: ابتدا توسط قیچی در پوست روی بیضه شکافی ایجاد کردیم. بعد از برداشتن لایه‌های چربی و ماهیچه و مشخص شدن وازودفران، توسط پنس، مجرا از بافت‌های مجاور جدا شده که هر دو اپیدیدیم دمی را توسط قیچی جدا کردیم و داخل یک میلی‌لیتر محلول نرمال سالین ۳۷ درجه سلسیوس، قرار دادیم. پس از خروج اسپرم‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصله را با استفاده از سمپلر برداشتیم و روی لام از نظر تحرک مورد بررسی قرار دادیم.

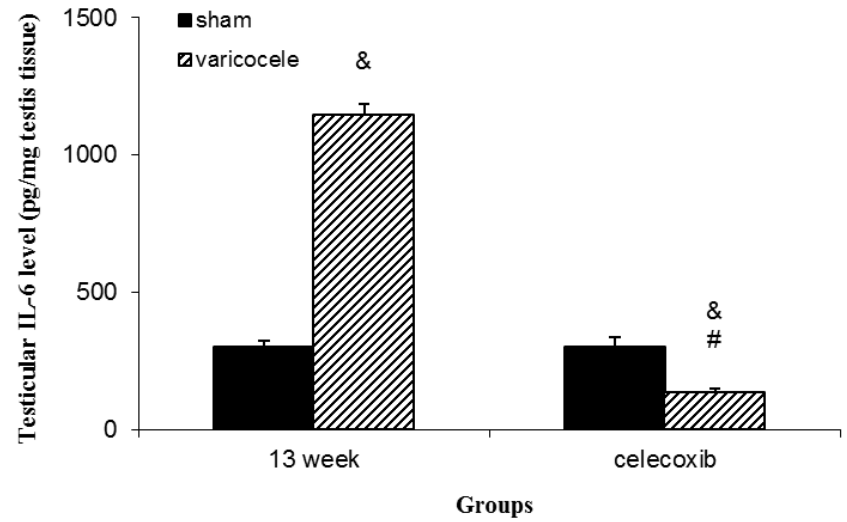
روش بررسی درصد تحرک اسپرم: بدین منظور، تحرک صد اسپرم در ۵ میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی ۴۰ بررسی و میانگین آن‌ها به عنوان درصد تحرک اسپرم‌ها ثبت شد که بر اساس طبقه‌بندی جدید WHO به چهار گروه تقسیم شدند [۲۶]. A (حرکت پیش رونده‌ی سریع در مسیر مستقیم). B (حرکت پیش رونده‌ی آرام در مسیر مستقیم یا غیر مستقیم. C (حرکت درجا). D (بدون حرکت)

روش بررسی درصد زنده‌مانی اسپرم: برای بدست آوردن درصد زنده‌مانی اسپرم، ۵-۶ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم را روی لام مورد مطالعه گذاشته و با یک قطره‌ی کوچک از ائوزین نگروزین رنگ آمیزی کردیم. از آنجایی که اسپرم‌های زنده، رنگ ائوزین نگروزین را جذب نکرده و اسپرم‌های مرده با جذب رنگ ائوزین به رنگ صورتی تا قرمز در آمدند، با شمارش تعداد ۱۰۰ اسپرم در بزرگ نمایی ۱۰۰، درصد اسپرم-های زنده را بدست آوردیم.

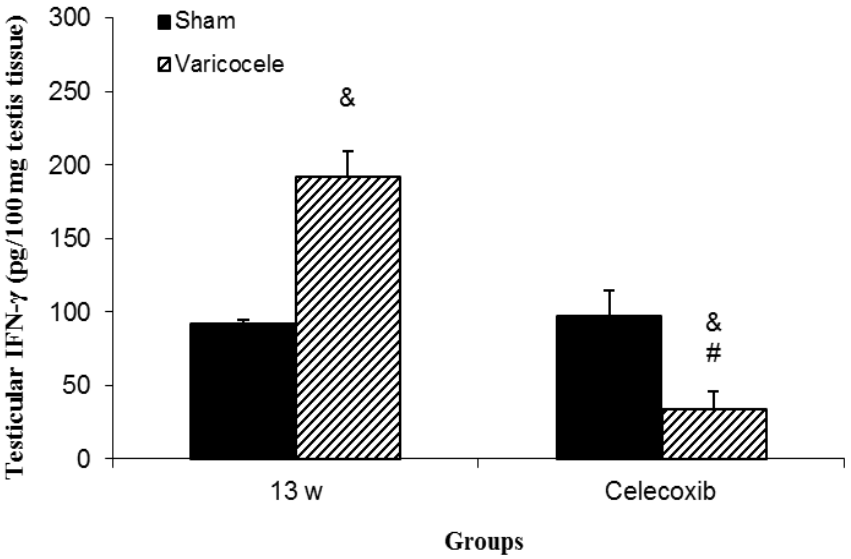
روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: داده‌ها به صورت mean ±SEM بیان شدند سپس با استفاده از آنالیز واریانس (آنوای دو طرفه) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در بررسی سطح سیتوکین‌های التهابی و شمارش تعداد سلول‌های بافت بیضه، برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از t-test استفاده شد. معنی دار بودن اطلاعات با ($P<۰/۰۵$) اعلام گردید.

یافته ها

تأثیر واریکوسل بر غلظت اینترلوکین-۶ در بافت بیضه و اثر سلکوکسیب بر آن: بعد از ۱۳ هفته واریکوسل سطح اینترلوکین-۶ سرم (۱۱۴۸±۳۶ pg/100 mg testis tissue) نسبت به گروه شم مربوطه (pg/100 mg testis tissue



A



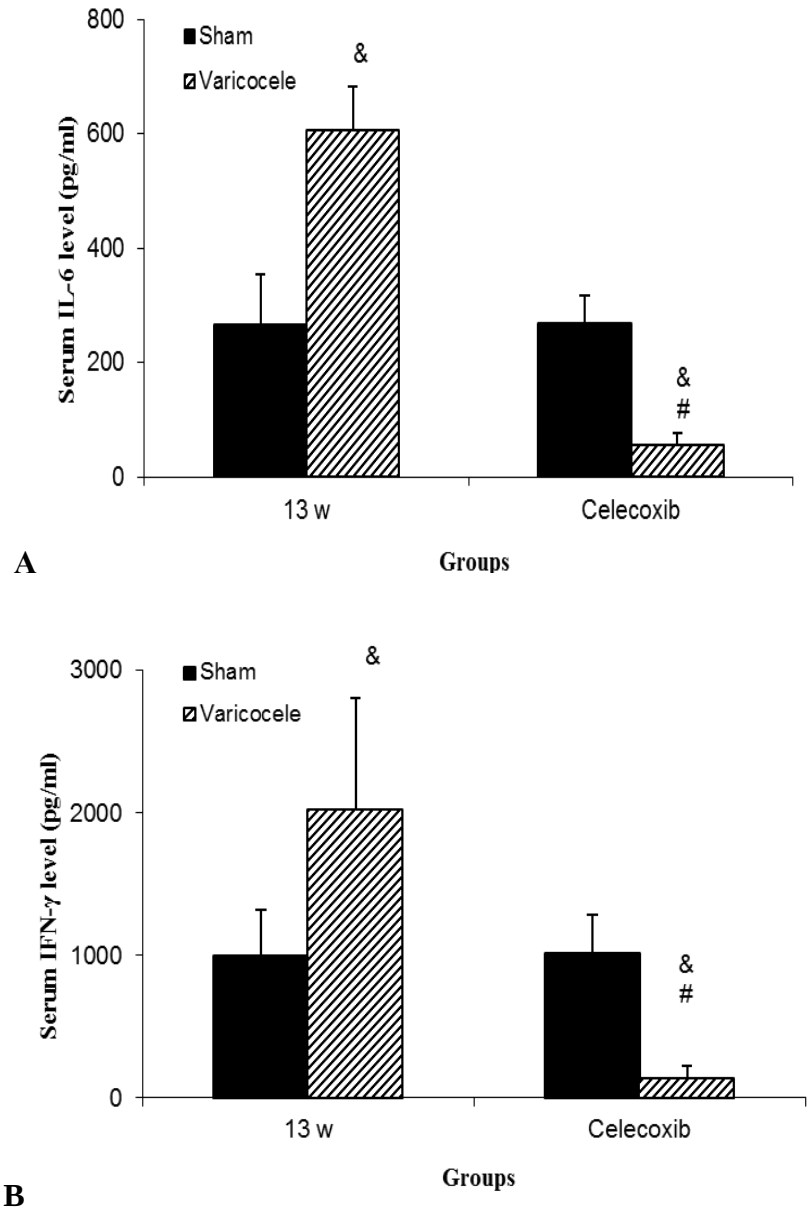
B

شکل ۱- مقایسه غلظت اینترلوکین-۶ (A) و اینترفرون گاما (B) در بافت بیضه گروه‌های مختلف، هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± میانگین انحراف معیار می‌باشد. & اختلاف معنا دار نسبت به گروه شم مربوطه (P<۰/۰۵). # اختلاف معنا دار در گروه سلکوکسیب نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته (P<۰/۰۵).

۲۱±۳۰۰) معنادار بود (P<۰/۰۵) و بعد از درمان با سلکوکسیب سطح اینترلوکین-۶ در بافت بیضه (۱۴۴±۱۵ pg/100 mg testis tissue) کاهش معناداری را نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل A-۱).

تأثیر واریکوسل بر غلظت اینترفرون گاما در بافت بیضه و اثر سلکوکسیب بر آن: بعد از ۱۳ هفته واریکوسل سطح اینترفرون گاما در بافت بیضه (pg/100 mg testis tissue ۱۶±۱۸۲) نسبت به گروه شم مربوطه (pg/100 mg testis tissue ۲±۹۱) معنادار بوده است (P<۰/۰۵) و بعد از درمان با سلکوکسیب سطح اینترفرون گاما در بافت بیضه (pg/100 mg testis tissue ۱۱±۹۷) کاهش معناداری را نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل B-۱).

تأثیر واریکوسل بر غلظت اینترلوکین-۶ سرم و اثر سلکوکسیب بر آن: با گذشت ۱۳ هفته از القای واریکوسل غلظت اینترلوکین-۶ سرم (pg/ml ۷۷±۶۰۵) نسبت به گروه شم مربوطه (pg/ml ۸۶±۲۶۶) معنادار بود (P<۰/۰۵) و بعد از درمان با سلکوکسیب سطح اینترلوکین-۶ سرم (pg/ml ۲۱±۵۵) کاهش معناداری را نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته نشان داد (P<۰/۰۵) (شکلA- ۲).



شکل ۲- مقایسه غلظت اینترلوکین-۶ (A) و اینترفرون گاما (B) در سرم گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± میانگین انحراف معیار می‌باشد. & اختلاف معنادار نسبت به گروه شم مربوطه (P<۰/۰۵). # اختلاف معنا دار در گروه سلکوکسیب نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته (P<۰/۰۵).

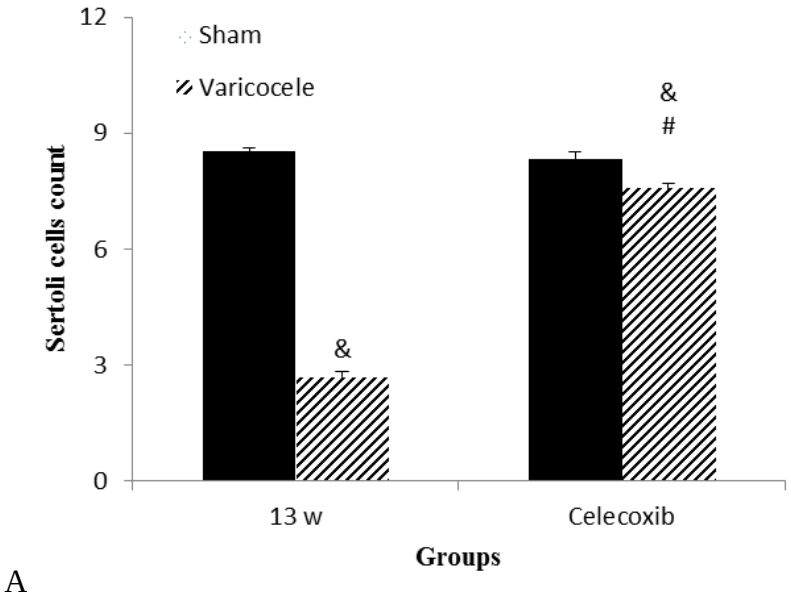
تأثیر واریکوسل بر غلظت اینترفرون گامای سرم و اثر سلکوکسیب بر آن: بعد از ۱۳ هفته واریکوسل سطح اینترفرون گاما در سرم (۷۰۷ pg/ml±۲۰۲۵) نسبت به گروه شم مربوطه (۳۲۰ pg/ml±۱۰۰۲) معنادار بود (P<۰/۰۵) و بعد از درمان با سلکوکسیب سطح اینترفرون گاما در سرم (pg/ml ۹۲±۱۳۷) کاهش معناداری را نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته نشان داد (P<۰/۰۵)(شکل B-۲).

تأثیر زمان بر تعداد سلول‌های سرتولی بعد از القای واریکوسل و اثر مصرف سلکوکسیب بر آن:

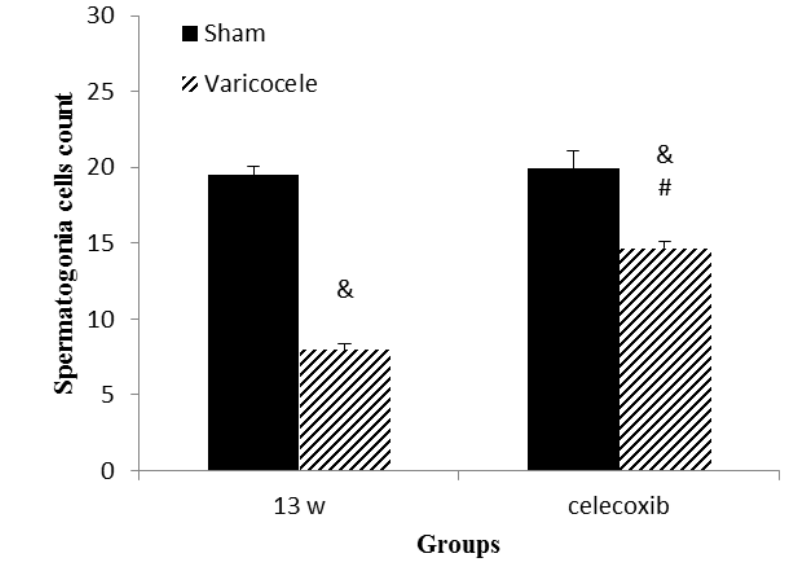
در این مطالعه با القای واریکوسل، تعداد سلول‌های سرتولی در گروه واریکوسل نسبت به گروه شم مربوطه کاهش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۵) و در گروه درمان شده با سلکوکسیب، تعداد سلول‌های سرتولی در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفته افزایش معناداری پیدا کرد (P<۰/۰۵) (شکل A-۳).

تأثیر زمان بر تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از القای واریکوسل و اثر مصرف سلکوکسیب بر آن:

در این مطالعه با القای واریکوسل، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه واریکوسل نسبت به گروه شم مربوطه کاهش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۵) که در گروه درمان



A



B

شکل ۳- مقایسه تعداد سلول‌های سرتولی (A) اسپرماتوگونیا (B) در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± میانگین انحراف معیار می‌باشد. & اختلاف معنا دار نسبت به گروه شم مربوطه (P<۰/۰۵). # اختلاف معنا دار در گروه سلکوکسیب نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته (P<۰/۰۵).

شده با سلکوکسیب افزایش معناداری در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفته مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (شکل B-۳).

اثر سلکوکسیب بر اندام‌های جنسی: تغییر نسبت وزن اپیدیدیم به وزن کل بدن، بعد از القای واریکوسل و اثر سلکوکسیب بر آن: نسبت وزن اپیدیدیم به وزن کل بدن بعد از القای واریکوسل در گروه ۱۳ هفته، کاهش مختصری نشان داد و مصرف سلکوکسیب در این مورد تأثیری نداشته است (جدول ۱).

تغییر نسبت وزن بیضه به وزن کل بدن، بعد از القای واریکوسل و اثر سلکوکسیب بر آن: این نسبت بعد از القای واریکوسل یا بعد از مصرف سلکوکسیب در گروه‌های مختلف تغییری نداشته است (جدول ۱).

تغییر نسبت حجم اپیدیدیم به وزن کل بدن بعد از القای واریکوسل و اثر سلکوکسیب بر آن‌ها: القای واریکوسل بر حجم اپیدیدیم افزایش معناداری نداشته است ولی مصرف سلکوکسیب در موش‌های واریکوسلی حجم اپیدیدیم را در مقایسه با گروه شم سلکوکسیب افزایش داده است (P<۰/۰۵) (جدول۱).

تغییر نسبت حجم بیضه به وزن کل بدن بعد از القای

جدول ۱- بررسی شاخص‌های بافت بیضه

	Group	Varicocele group	Celecoxib treated
Epididymis weight into body weight	Sham	.31± .1	0.08±0.006
	Varicocele	0.08±0.004	0.22±0.1
Testis weight into body weight	Sham	0.51±0.02	0.56±0.01
	Varicocele	0.05±0.02	0.55±0.02
Epididymis volume into body volume	Sham	1.15±0.05	1.23±0.08
	Varicocele	1.28±0.08	⁎1.71±0.02
Testis volume into body volume	Sham	9.05±0.099	10.00±0.16
	Varicocele	⁎ 9.99±0.353	10.95±0.81
Rapid sperm motility (%)	Sham	11±.2	14±.7*#
	Varicocele	8±.8 *	11±1.1
Slow sperm motility (%)	Sham	27±1.1	35±3.1
	Varicocele	⁎19±1.2	⁎18±2.4
Motile sperm (%)	Sham	31±0.7	29±3.2
	Varicocele	⁎21±2.2	#33±1.6
Immotile sperm (%)	Sham	29±1.7	25±1
	Varicocele	⁎51±1.02	⁎#37±2.1
Viability of sperm (%)	Sham	71±2.2	79±.033
	Varicocele	⁎48±2.6	⁎#63±1.2
Internal diameter of seminiferous tubule (µm)	Sham	123±12.2	138±8.6
	Varicocele	100±1.7	125±12.3
Epithelium diameter of seminiferous tubule (µm)	Sham	62±.4	59±1.2
	Varicocele	⁎54±1.5	⁎#67±1.4
External diameter of seminiferous tubule (µm)	Sham	244±13.07	261±9.9
	Varicocele	⁎207±9.6	#259±8.06

⁎ ($P<۰/۰۵$) نسبت به گروه شم مربوطه. # ($P<۰/۰۵$) نسبت به گروه واریکوسل ۱۳ هفته

واریکوسل و اثر سلکوکسیب بر آن‌ها: القای واریکوسل سبب افزایش نسبت حجم بیضه به کل بدن در مقایسه با گروه شم مربوطه شده است که این نسبت در گروه واریکوسل ۱۳ هفته نسبت به گروه شم مربوطه معنادار شده است ($P<۰/۰۵$) ولی مصرف سلکوکسیب در این مورد تأثیری نداشته است (جدول ۱).

تأثیر زمان بر تحرک اسپرم بعد از القای واریکوسل و اثر مصرف سلکوکسیب بر آن: بعد از القای واریکوسل، حرکت پیش‌رونده‌ی سریع اسپرم‌ها در گروه واریکوسل در مقایسه با گروه شم مربوطه ($P<۰/۰۵$) کاهش یافته و بعد از مصرف سلکوکسیب، حرکت آنها در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفته افزایش می‌یابد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۴). بعد از القای واریکوسل، حرکت پیش‌رونده‌ی آرام اسپرم‌ها، در گروه واریکوسل نسبت به گروه شم مربوطه ($P<۰/۰۵$) کاهش معناداری پیدا می‌کند ولی مصرف سلکوکسیب در این مورد تأثیری نداشته است (شکل ۴). بعد از القای واریکوسل تعداد اسپرم‌های درجا، در گروه واریکوسل در مقایسه با گروه شم مربوطه کاهش می‌یابد ($P<۰/۰۵$) و بعد از مصرف سلکوکسیب، تعداد آنها در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفته افزایش می‌یابد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۴). بعد از القای واریکوسل، تعداد اسپرم‌های مرده در گروه واریکوسل در مقایسه با گروه

شـم مربوطـه افـزایش یافتـه (P<۰/۰۵) و بعـد از مصـرف سلکوکسیب، تعداد آنها در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفتـه کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

تأثیر زمان بر زنده‌مانی اسپرم بعد از القای واریکوسل و اثـر مصرف سلکوکسیب بر آن:

بعد از القای واریکوسل درصد زنده‌مانی اسپرم‌هـا در گـروه واریکوسل در مقایسه با گـروه شـم مربوطـه کـاهش مـی‌یابـد (P<۰/۰۵) کـه بعـد از مصـرف سلکوکسـیب ایـن درصـد در مقایسه با گـروه واریکوسـل ۱۳ هفتـه افـزایش پیـدا مـی‌کنـد (P<۰/۰۵) (جدول ۱). تأثیر زمان بر قطر لوله‌های منی‌ساز بعد از القای واریکوسل و اثر مصرف سلکوکسیب بر آن:

– قطر داخلی لوله‌های منـی‌سـاز در گـروه واریکوسـل ۱۳ هفته نسبت بـه گـروه شـم مربوطـه کـاهش داشـته کـه ایـن تغییرات معنادار نبوده است و مصرف سلکوکسـیب نیـز در ایـن مورد تأثیری نداشته است (جدول۱).

– در ایـن مطالعـه بـا گذشـت زمـان از لحظـه‌ی القـای واریکوسل، ضخامت لایه‌ی اپیتلیال لوله‌های منی‌ساز در گـروه واریکوسل نسبت به گروه شم مربوطه، کاهش معناداری داشـته است (P<۰/۰۵) و در گروه درمان شده با سلکوکسیب افزایش معناداری در ضخامت لایه‌ی اپیتلیـال لولـه‌هـای منـی‌سـاز در مقایسه با گروه واریکوسل ۱۳ هفتـه مشـاهده شـد (P<۰/۰۵) (جدول۱).

– در این مطالعه با القای واریکوسل قطر خارجی لوله‌هـای منی‌ساز گـروه واریکوسـل در مقایسـه بـا گـروه شـم مربوطـه کاهش معناداری داشته است (P<۰/۰۵). در گروه درمان شـده با سلکوکسیب، بر قطر لوله‌های منی‌ساز افزوده شده که نسبت به گروه واریکوسـل ۱۳ هفتـه معنـادار بـوده اسـت (P<۰/۰۵) (جدول۱).

بحث

مهمترین مشکلی که متخصصان اورولـوژی بـرای درمـان واریکوسل اطفال دارند این است کـه تـاکنون مطالعـات کمـی درباره واریکوسل در زمان قبل از بلوغ انجام شده است و عـدم درمان آن در این دوران سبب ابتلای کودکان به تومورهایی به نام Wilms می‌شود، به همین جهت ما ایـن مطالعـه را بـروی واریکوسل در دوران قبل از بلوغ انجام دادیـم تـا بـا مشـخص کردن سیر افزایش تدریجی سیتوکین‌ها و اثرات مخرب آن‌هـا، ثابت کنیم درمان هرچه سـریعتر واریکوسـل مـی‌توانـد اثـرات مخرب آن را کاهش دهد و میزان باروری آینده را ارتقا ببخشد. در این مطالعه اندازه‌گیری سیتوکین های التهابی هم در بافـت بیضه و هم در سرم انجام شد. از آنجایی که بافت بیضـه یکـی از مهمترین اندام‌های ترشح سیتوکین‌ها می‌باشد، اندازه گیـری شاخص‌هـای التهـابی در ایـن بافـت قابـل ارزش اسـت زیـرا شاخص‌های التهابی بطور موضعی نیز منجر به آسـیب سـلول-های بیضه و کاهش تحرک و زنده‌مـانی اسـپرم مـی‌شـوند. از طرفی اندازه‌گیری این شاخص‌ها در سرم هـم مهـم مـی‌باشـد زیرا در انسان تهیه نمونه از بافت بیضه کاری غیر ممکن مـی-باشد [۳۳]. دیده شده است که با القای واریکوسل، میزان آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ افزایش پیدا کرده که ایـن آنـزیم بـا اثـر بـر اسید آراشیدونیک غشای سلول‌ها از جمله سلول‌هـای لیـدیگ، سبب افزایش تولید پروستاگلاندین‌ها گردیـد و پروسـتاگلاندین ای-۲ از طریق رسپتور اختصاصـی خـود (EP2) و آنـزیم‌هـای (PKA ,PKC) میزان بیان ژنی سیتوکین‌هـای التهـابی مثـل اینترلـوکین-۶ و اینترفـرون-گامـا را افـزایش داد [۳۴]. سلکوکسیب مـورد اسـتفاده در ایـن مطالعـه یـک داروی ضـد التهاب غیـر اسـتروئیدی و یـک مهارکننـده‌ی انتخـابی آنـزیم سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) است. داروهـای ضـد التهـابی و غیر استروییدی قدیمی (NSAID) هم آنزیم سیکلواکسـیژناز-۱ (COX-1) و هـم آنـزیم سیکلواکسـیژناز-۲ (COX-2) را مهـار مـی‌کننـد در صـورتیکه سلکوکسـیب ۲۰-۱۰ برابـر اثـر مهاری بیشتری بر آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) نسـبت بـه آنـزیم سیکلواکسـیژناز-۱ (COX-1) دارد و بـا اثـر مهـار انتخابی بر آنزیم سیکواکسـیژناز-۲ (COX-2) باعـث اخـتلال در سـنتز پروسـتاگلاندین‌هـا خصوصـاً پروسـتاگلاندین-ای-۲ می‌شود. ثابت شده است که مصرف سلکوکسیب از طریق مهار رشد سلول‌های T و مهار تولیـد آنـزیم سیکلواکسـیژنـاز [۱۲]، سبب کاهش میزان فاکتورهای التهابی، خصوصـاً اینترلـوکین-۶ (IL-6) و اینترفرون گاما (INF-ɤ) می‌شود [۲۴].

رسـپتورهایی بـرای بیـان آنـزیم سیکلواکسـیژناز-۲ (COX-2) و پروستاگلاندین ای-۲ (PG-E2) در سـلول‌هـای اسپرماتوژنیک وجود دارد که تولید پروستاگلاندین‌هـا خصوصـاً

پروستاگلاندین ای-۲ در سلول‌های اسپرم‌ساز بر مورفولوژی اسپرم تأثیر می‌گذارند و میزان باروری را کاهش می‌دهند. اینترفرون گاما (INF-ɣ)، اینترلوکین-۱۰ (IL-10) و اینترلوکین-۸ (IL-8) باعث لیپیدپراکسیداسیون در غشای اسپرم می‌شوند و میزان MDA را افزایش می‌دهند که در نهایت سبب کاهش ظرفیت اسپرم و ناباروری می‌گردند ، از طرفی اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروز کننده تومور-آلفا (TNF-α) از طریق افزایش میزان تولید نیتریک اکساید سبب کاهش تحرک اسپرم می‌گردند [۸، ۱۸، ۳۷]. همچنین در مطالعه ای گزارش شده است که واریکوسل با القای آپوپتوز در سلول‌های سازنده‌ی اسپرم می‌تواند تعداد اسپرم‌های نرمال را کاهش دهد [۴۰]. در مطالعه حاضر سلکوکسیب توانست باعث بهبود حرکت و زنده مانی اسپرم بدنبال القای واریکوسل شود. از آنجایی که هورمون تستوسترون برای سلامت و حرکت اسپرم ضروری است، سلکوکسیب توانست با تولید تستوسترون حرکات اسپرم را بهبود بخشد.

القای واریکوسل به مرور زمان سبب کاهش سلول‌های لیدیگ در نتیجه کاهش هورمون تستوسترون می‌گردد و از آنجایی که تستوسترون سبب افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و افزایش بیان رسپتورهای FSH در آن‌ها می‌شود آن را به‌عنوان یک عامل در رشد و تمایز (Prolifration) سلول‌های لیدیگ و افزایش سلول‌های سرتولی می‌شناسند. در واریکوسل میزان آنزیم سیکلواکسیژناز افزایش می‌یابد که آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) با افزایش آنزیم آروماتاز، افزایش cAMP و فسفریله کردن آنزیم پروتئین کیناز-آ (PKA) در نهایت سبب کاهش تستوسترون می‌شود [۱۷]. ثابت شده است که پروستاگلاندین-ای-۲ (PG-E2) و نوعی از پروستاگلاندین اف-۲ (PG-F2α) با اثر بر اینترلوکین‌های-۱ (IL-1α, β)، هم بر سلول‌های سرتولی تأثیر می‌گذارند و هم با تأثیر بر سلول‌های لیدیگ باعث کاهش ترشح هورمون تستوسترون می‌شوند [۲۳]. نوعی از پروستاگلاندین اف-۲ (PG-F2α) با اثر فیدبک منفی بر هورمون LH و سلول‌های لایدیگ در نهایت سبب کاهش تستوسترون خون می‌شود که این عمل را با تأثیر منفی بر ۱۷-بتا-هیدروکسی دهیدروژناز انجام می‌دهد [۲]. در سال ۲۰۰۷، Chen نیز بیان کرد که آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ سبب کاهش میزان هورمون تستوسترون می‌شود که این عمل می‌تواند از طریق اثر مستقیم پروستاگلاندین‌ها بر سلول‌های بینابینی بافت بیضه و تحریک cAMP باشد [۹] که مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ باعث کاهش آنزیم آروماتاز (آنزیم آروماتاز سبب کاهش تستوسترون و تبدیل آن به سایر استروئیدها می‌شود) سبب افزایش تستوسترون می‌شوند [۳۶].

با توجه به مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ انجام شده بود برای اندازه گیری قطر لوله‌های منی‌ساز، روش مساحت سنجی و روش استفاده از نرم افزار با توجه به اشکال بافت شناسی عنوان شده بود. از آنجایی که در این مطالعه روش دوم را مورد تایید قرار داده بودند، ما هم از این روش قطر لوله‌ها را اندازه-گیری کردیم. واریکوسل سبب کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، افزایش ضخامت لایه خارجی بیضه (Tunica Albuginea Thickness)، کاهش ضخامت لایه اپیتلیالی در لوله‌های منی‌ساز، افزایش ادم بین سلول‌های بافت بینابینی و کاهش تعداد سلول‌های سرتولی می‌شود. از طرفی ثابت شده است که واریکوسل با افزایش سطح پروستاگلاندین‌ها سبب کاهش تعداد سلول‌های لیدیگ و کاهش هورمون تستوسترون می‌گردد. تستوسترون برای بلوغ لوله‌های منی‌ساز لازم است و ترشح آن سبب گسترش و رشد لوله‌های منی‌ساز می‌شود در نتیجه واریکوسل با افزایش پروستاگلاندین‌ها و کاهش هورمون تستوسترون سبب تحلیل لوله‌های منی‌ساز می‌شود و سلکوکسیب با جلوگیری از کاهش هورمون تستوسترون از کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز جلوگیری کرد. از طرفی سلکوکسیب با افزایش تعداد سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونیا و افزایش مایع میان بافتی سبب افزایش قطر لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه واریکوسل می‌شود.

در این مطالعه القای واریکوسل، سبب افزایش نسبت حجم اپیدیدیم به وزن کل بدن شده است که این تغییر معنادار نبوده است ولی در گروه درمان شده با سلکوکسیب، این نسبت به طور معناداری افزایش نشان داده است. در بررسی نسبت حجم بیضه به وزن کل بدن، القای واریکوسل سبب افزایش معناداری در این نسبت شده است و در گروه درمان شده با سلکوکسیب تغییری مشاهده نشد. در توجیه این مساله باید گفت که حداقل گذشت زمان ۴ ماه برای مشاهده‌ی تغییرات معنادار در حجم بیضه و اپیدیدیم لازم است و با گذشت زمان

کمتر می‌توان کاهش اندکی را در حجم بیضه و اپیدیدیم انتظار داشته باشیم [۱].

در مورد مصرف سلکوکسیب می‌توان گفت که سلکوکسیب با افزایش حجم مایع میان‌بافتی و جلوگیری از تخریب سلول‌های بافت بیضه، حجم بیضه و اپیدیدیم را افزایش می‌دهد مانند مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ انجام شد که پس از مصرف ۵ هفته سلکوکسیب در موش‌های سالم، افزایش ۳۰٪ در حجم مایع میان‌بافتی رخ داد که البته این تغییر معنادار نشده بود. در بررسی تغییرات وزن بیضه و اپیدیم نیز مانند حجم آن باید گفت که حداقل گذشت زمان ۴ ماه از لحظه‌ی القای واریکوسل برای مشاهده‌ی تغییرات معنادار در وزن بیضه و اپیدیدیم لازم است [۱۶، ۲۰] و سلکوکسیب با جلوگیری از تخریب بافت بیضه و افزایش مایع میان‌بافتی می‌تواند وزن بیضه و اپیدیدیم را افزایش دهد [۳۸]. سلکوکسیب با اثرات ضدالتهابی خود فقط در موش‌هایی که در آن‌ها التهاب ایجاد شده اثرات خود را بطور واضح نشان می‌دهد و این اثرات در موش‌های سالم آنقدر واضح و آشکار نیست مثل مطالعه‌ای که در آن با مصرف سلکوکسیب به میزان mg/kg ۴۰ و به مدت ۱۵ روز در موش‌های سالم، تغییری را در وزن بیضه‌ها و اپیدیدیم در گروه درمان شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نکردند [۴۲].

در این مطالعه نشان داده شد که واریکوسل اثرات مخربی بر غلظت سیتوکین‌ها و بافت بیضه دارد و از طریق کاهش اسپرم‌ها سبب کاهش میزان باروری می‌گردد. سلکوکسیب با بهبود سطح اینترلوکین‌ها و کاهش اثرات جانبی واریکوسل می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی، مفید واقع شود. در نتیجه در کودکان مبتلا به واریکوسل سلکوکسیب می‌تواند اثرات مخرب واریکوسل را کاهش دهد و میزان باروری آینده را ارتقا ببخشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی و گروه فیزیولوژی که تأمین کننده منابع مالی در انجام این پروژه بوده‌اند را اعلام می‌دارند.

References

[1] Asci R, Sarikaya S, Buyukalpelli R, Yilmaz AF, and Yildiz S. The effects of experimental varicocele on testicular histology and fertility in monorchic adult rats. ***BJU Int*** 83(1999) 493-497.

[2] Chantharaksri U, and Fuchs AR. PGF2 alpha regulation of LH action on testicular testosterone production. ***Adv Prostaglandin Thromboxane Res*** 8 (1980) 1313-1315.

[3] Chen H, Luo L, Liu J, and Zirkin BR. Cyclooxygenases in rat Leydig cells: effects of luteinizing hormone and aging. ***Endocrinology*** 148 (2007) 735-742.

[4] Chen YF, Jobanputra P, Barton P, Bryan S, Fry-Smith A, Harris G, and Taylor RS. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. ***Health Technol Assess*** 12 (2008) 1-278.

[5] Cruz-Cordova A, Rocha-Ramirez LM, Ochoa SA, Gonzalez-Pedrajo B, Espinosa N, Eslava C, Hernandez-Chinas U, Mendoza-Hernandez G, Rodriguez-Leviz A, Valencia-Mayoral P, Sadowinski-Pine S, Hernandez-Castro R, Estrada-Garcia I, Munoz-Hernandez O, Rosas I, and Xicohtencatl-Cortes J. Flagella from five Cronobacter species induce pro-inflammatory cytokines in macrophage derivatives from human monocytes . ***PLoS One*** 7 (2012) e52091.

[6] Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, and Huleihel M. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. ***Eur Cytokine Netw*** 16 (2005) 167-172.

[7] French DB, Desai NR, and Agarwal A .Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? ***Curr Opin Obstet Gynecol*** 20 (2008) 269-274.

[8] Ganaiem M, AbuElhija M, Lunenfeld E, Cherniy N, Weisze N, Itach SB, Breitbart H, Apte R, and Huleihel M. Effect of interleukin-1 receptor antagonist gene deletion on male mouse fertility. ***Endocrinology*** 150

(2009) 295-303.

[9] Grotjan HE, Jr., Heindel JJ, and Steinberger E. Prostaglandin inhibition of testosterone production induced by luteinizing hormone, dibutyryl cyclic AMP or 3-isobutyl-١-methyl xanthine in dispersed rat testicular interstitial cells. ***Steroids*** 32 (1978) 307-322.

[10] Hao W, Chan IH, Liu X, Tang PM, Tam PK, and Wong KK. Early post-operative interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels after single-port laparoscopic varicocelectomy in children. ***Pediatr Surg Int*** 28 (2012) 281-286.

[11] Herbenick MA, Sprott D, Stills H, and Lawless M. Effects of a cyclooxygenase 2 inhibitor on fracture healing in a rat model. ***Am J Orthop (Belle Mead NJ)*** 37 (2008) E133-137.

[12] Iniguez MA, Punzon C, Cacheiro-Llaguno C, Diaz-Munoz MD, Duque J, Cuberes R, Alvarez I, Andres EM, Buxens J, Buschmann H, Vela JM, and Fresno M. Cyclooxygenase-independent inhibitory effects on T cell activation of novel 4,5-dihydro-3 trifluoromethyl pyrazole cyclooxygenase-2 inhibitors. ***Int Immunopharmacol*** 10 (2010) 1295-1304.

[13] Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, and Fujisawa M. Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with varicocele. ***BJU Int*** 100 (2007) 863-866.

[14] Ishikawa T ,Morris PL. A multistep kinase-based sertoli cell autocrine-amplifying loop regulates prostaglandins, their receptors, and cytokines. ***Endocrinology*** 147 (2006) 1706-1716.

[15] Javanmard SH, Dana N. The effect of interferon gamma on endothelial cell nitric oxide production and apoptosis. ***Adv Biomed Res*** 1: 69, 2012.

[16] Kaur C, Sivakumar V, Zou Z, Ling EA. Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. ***Brain Struct Funct*** 219 (2014) 151-70.

[17] Kim JY, Han EH, Kim HG, Oh KN, Kim SK, Lee KY, Jeong HG. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells. ***Toxicol Lett*** 193 (2010) 200-208.

[18] Lampiao F, du Plessis SS. TNF-alpha and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. ***Reprod Biomed Online*** 17 (2008) 628-631.

[19] Lee SW, Lee JY, Kim KH, Ha US. Laparoendoscopic single-site surgery versus conventional laparoscopic varicocele ligation in men with palpable varicocele: a randomized, clinical study. ***Surg Endosc*** 26 (2012) 1056-1062.

[20] Li F, Chiba K, Yamaguchi K, Okada K, Matsushita K, Ando M, Yue H, Fujisawa M. Effect of varicocelectomy on testicular volume in children and adolescents: a meta-analysis. ***Urology*** 79 (2012) 1340-1345.

[21] Liew SH, Meachem SJ, Hedger MP. A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats. ***J Androl*** 28 (2007) 176-185.

[22] Liu AY, Dwyer DF, Jones TG, Bankova LG, Shen S, Katz HR, Austen KF, Gurish MF. Mast cells recruited to mesenteric lymph nodes during helminth infection remain hypogranular and produce IL-4 and IL-6. ***J Immunol*** 190 (2013) 1758- 1766.

[23] Matzkin ME, Gonzalez-Calvar SI, Mayerhofer A, Calandra RS, Frungieri MB. Testosterone induction of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression and prostaglandin F (2alpha) production in hamster Leydig cells. ***Reproduction*** 138 (2009) 163-175.

[24] Mor A, Aizman E, Kloog Y. Celecoxib enhances the anti-inflammatory effects of farnesylthiosalicylic acid on T cells independent of prostaglandin E(2) production. ***Inflammation*** 35 (2012) 1706-1714.

[25] Moretti E, Cosci I, Spreafico A, Serchi T, Cuppone AM, Collodel G. Semen characteristics and inflammatory mediators in infertile men with different clinical diagnoses. ***Int J Androl*** 32 (2009) 637-646.

[26] Mortimer D, Mortimer ST. Manual methods for sperm motility assessment. ***Methods Mol Biol*** 927 (2013) 61-75.

[27] Nakanishi Y, Nakatsuji M, Seno H, Ishizu S, Akitake-Kawano R, Kanda K, Ueo T, Komekado H, Kawada M, Minami M, Chiba T. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. ***Carcinogenesis*** 32 (2011) 1333-1339.

[28] Pedrerol A, Blanco JA, Sampere J, De Diego M, Isnard RM, Perich E, Casatellvi A, Muxart J. [Venous embolization--treatment of choice in varicoceles]. ***Cir Pediatr*** 24 (2011) 55-58.

[29] Perez-Rodriguez R, Roncero C, Olivan AM, Gonzalez MP, Oset-Gasque MJ. Signaling mechanisms of interferon gamma induced apoptosis in chromaffin cells: involvement of nNOS, iNOS, and NFkappaB. ***J Neurochem*** 108 (2009) 1083-1096.

[30] Sahin Z, Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun ET, Acar N, Erdogru T, Demir R, Ustunel I. Increased expression of interleukin-1alpha and interleukin-1beta is associated with experimental varicocele. ***Fertil Steril*** 85 (2006) 1265-1275.

[31] Saini SS, Gessell-Lee DL, Peterson JW. The cox-2-specific inhibitor celecoxib inhibits adenylyl cyclase. ***Inflammation*** 27 (2003) 79-88.

[32] Schonthal AH, Chen TC, Hofman FM, Louie SG, Petasis NA. Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs. ***Expert Opin Investig Drugs*** 17 (2008) 197-208.

[33] Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. ***Int J Urol*** 19 (2012) 538-550.

[34] Walch L, Morris PL. Cyclooxygenase 2 pathway mediates IL-1beta regulation of IL-1alpha, -1beta, and IL-6 mRNA levels in Leydig cell progenitors. ***Endocrinology*** 143 (2002) 3276-3283.

[35] Wang X, Dyson MT, Jo Y, Stocco DM. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory gene expression in MA-10 mouse Leydig cells. ***Endocrinology*** 144 (2003) 3368-3375.

[36] Wang X, Shen CL, Dyson MT, Eimerl S, Orly J, Hutson JC, Stocco DM. Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis. ***Endocrinology*** 146 (2005) 4202-4208.

[37] Winnall WR, Ali U, O'Bryan MK, Hirst JJ, Whiley PA, Muir JA, Hedger MP. Constitutive expression of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by somatic and spermatogenic cells is responsible for prostaglandin E2 production in the adult rat testis. ***Biol Reprod*** 76 (2007) 759-768.

[38] Winnall WR, Muir JA, Liew S, Hirst JJ, Meachem SJ, Hedger MP. Effects of chronic celecoxib on testicular function in normal and lipopolysaccharide-treated rats. ***Int J Androl*** 32 (2009) 542-555.

[39] Woo PC, Tung ET, Chan KH, Lau CC, Lau SK, Yuen KY. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. ***J Infect Dis*** 201 (2010) 346-353.

[40] Zheng Y, Zhang X, Zhou J, Cheng F, Zhou B. Effects on the ipsilateral testis during progression of experimental varicocele in rat. ***Med Sci Monit*** 14 (2008) BR122-126.

[41] Zohdy W, Ghazi S, Arafa M. Impact of varicocelectomy on gonadal and erectile functions in men with hypogonadism and infertility. ***J Sex Med*** 8 (2011) 885-893.