

اثر محافظتی سلول‌های مزانشیمی مغزاستخوان بر ویژگی‌های بافت شناسی و ریزسنجی بافت بیضه متعاقب پیچش - واپیچش بند بیضه در موش‌های سفید آزمایشگاهی

فرشته خانشی، رسول شهروز*، عباس احمدی، رامین مظاهری خامنه، مهدی ایمانی

گروه بافت و جنین شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به این که اختلال در سیستم گردش خون بیضه و متعاقباً کم خونی عضو می‌تواند موجب اختلال در باروری گردد. در این پژوهش اثر محافظتی سلول‌های مزانشیمی مغزاستخوان بر هیستومورفومتری بافت بیضه متعاقب پیچش - واپیچش (T-D) Tursion-Detursion بند بیضه به طور مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۳۰ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی بالغ به طور تصادفی به سه گروه مساوی تقسیم شدند؛ گروه کنترل شم، در این گروه فقط حفره شکم باز و سپس بسته شد. گروه پیچش - واپیچش (T-D)، در این گروه در بند بیضه چپ عمل پیچش - واپیچش انجام شد و پس از برقراری مجدد گردش خون در شبکه بیضه‌ای موش‌ها، بافر فسفات به میزان ۱۰ میکرولیتر تزریق شد. گروه سلول مزانشیمی (T-D+MSC)، پس از عمل پیچش - واپیچش در موش‌های این گروه سلول‌های مزانشیمی به تعداد نیم میلیون در حجم، ۱۰ میکرولیتر داخل شبکه بیضه‌ای تزریق شد. در پایان دوره درمان (۳۵ روز) بعد از نمونه‌برداری از بافت بیضه طرف چپ و تثبیت نمونه، مقاطع پارافینی به وسیله هماتوکسیلین - ائوزین و ماسون تری کروم (برای شمارش تعداد عروق) رنگ‌آمیزی شدند، سپس پارامترهای بافتی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل شده با استفاده از آزمون آماری آنوا و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: گروه درمان با مزانشیم (T-D+MSC) افزایش معنی‌داری در میانگین ضرایب اسپرما توژنز، سلول‌های سرتولی فعال و لایدیگ، قطر لوله‌های منی‌ساز، ضخامت اپیتلیوم و کپسول بیضه در مقایسه با گروه پیچش - واپیچش (T-D) داشتند ($P < 0.05$). در بررسی تعداد عروق نیز در گروه پیچش - واپیچش (T-D) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه تحت درمان با مزانشیم (T-D+MSC) مشاهده گردید ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: استفاده از سلول‌های مزانشیمی در روند بهبود آسیب ناشی از پیچش - واپیچش بند بیضه از طریق افزایش آنژیوژنز و ترمیم بافتی می‌تواند مؤثر واقع شود.

کلید واژگان: ریزسنجی، بیضه، پیچش - واپیچش بند بیضه، سلول مزانشیمی

*نویسنده مسئول: رسول شهروز، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بافت و جنین شناسی

Email: r.shahrooze@urmia.ac.ir

مقدمه

شایع‌ترین علت ناباروری در مردان عدم توانایی آنها در تولید اسپرم سالم است. پیچش بیضه یک مورد اورژانسی می‌باشد که در اثر پیچ‌خوردگی بیضه به دور محور عمودی طناب اسپرماتیک رخ می‌دهد (۱). در حقیقت مهم‌ترین اتفاقی که در پیچش بافت بیضه رخ می‌دهد، اختلال در گردش خون وریدی بیضه می‌باشد که در نهایت ادم ایجاد می‌کند و به واسطه ادم، به عروق شریانی و شریانچه‌ای فشار وارد می‌شود و در نتیجه گردش خون بیضه دچار اختلال می‌شود (۲). آتروفی و تغییرات بافتی بیضه متعاقب پیچش بیضه باعث آسیب حاد بافت می‌شود. ایسکمی ایجاد شده به دنبال پیچش باعث افزایش رادیکال‌های آزاد به دنبال آن خون‌رسانی مجدد نیز آسیب ثانویه در بافت ایجاد می‌کند، که با آزاد کردن هرچه بیشتر رادیکال‌های آزاد در ارتباط است که این امر در روند طبیعی اسپرماتوزن دخالت داشته و تعداد اسپرم را کاهش می‌دهد (۳). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغین که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک منبع ایده‌آل برای سلول درمانی، ژن درمانی و به عنوان ابزاری برای درمان بیماری‌ها محسوب می‌گردند. سلول‌های مزانشیمی می‌توانند پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را تعدیل بخشند و همچنین در ترمیم آسیب بافتی نیز مؤثر واقع شوند (۴). طبق تحقیق‌های اخیر،

پژوهشگران با تزریق داخل وریدی و موضعی (محل ضایعه) سلول‌های بنیادی توانستند با ایجاد آنژیوژنز (رگ‌زایی) موجب بهبود در عملکرد نوروها گردند. همچنین عزیز الهی و همکاران گزارش نمودند که در پیچش بند بیضه، دریافت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موجب بهبود در عملکرد و ساختار بافت بیضه می‌شود (۹). این سلول‌ها توانایی تولید گیرنده اینترلوکین یک، فاکتورهای رشد مثل فاکتورهای سلول‌های بنیادی، اینترلوکین ۶ و ۷ و ۱۱، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و آندوتلیوم عروقی را دارند (۷ و ۶)، همچنین می‌توانند با تکثیر خود در طول عروق جدید مهاجرت کنند و پس از آن به سلول‌های پری‌سیت بالغ تمایز یابند و سبب پایداری رگ جدید گردند (۸). همچنین صباغی و همکاران نشان دادند که استفاده از سلول‌های مزانشیمی در بافت بیضه پیچش یافته می‌تواند در کاهش آپوپتوز مؤثر واقع شود (۵). بنابراین با توجه به این که در پیچش بافت بیضه مرگ سلولی و در نتیجه کاهش اسپرماتوزن در اثر آسیب عروق خونی کوچک مطرح است (۱۰). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی آنژیوژنز و روند بهبود بخشی سلول‌های مزانشیمی بر آسیب ایجاد شده به بافت بیضه در اثر پیچش- واپیچش می‌باشد.

روش بررسی

این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت و در آن سی‌سی سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران خریداری و در مرکز پرورش

حیوان‌های آزمایشگاهی با شرایط استاندارد (دمای حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سیکل منظم ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی به سه گروه مساوی تقسیم شدند؛ گروه کنترل شم، در این گروه حفره شکم باز و بیضه بیرون آورده شده و بدون عمل پیچش بند بیضه حفره شکم بسته گردید. گروه پیچش - واپیچش (T-D)، در این گروه بند بیضه سمت چپ به میزان ۷۲۰ درجه در خلاف جهت عقربه‌های ساعت به مدت یک ساعت پیچش ایجاد (۱۱) و پس از واپیچش در شبکه بیضه‌ای موش‌ها بافر فسفات (PBS) به حجم ۱۰ میکرولیتر تزریق شد.

گروه مزانشیم (T-D+Msc)، پس از عمل پیچش - واپیچش سلول‌های مزانشیمی در PBS به تعداد نیم‌میلیون در حجم ۱۰ میکرولیتر داخل شبکه بیضه‌ای موش‌ها تزریق شد (۱۲).

جهت نمونه‌برداری از مغز استخوان یک سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی با دز بالای کتامین - زایلازین (خریداری شده از شرکت Alfasan، کشور هلند) آسان‌کشی شد. استخوان‌های ران و درشت نی جدا گردید و عضلات و بافت‌های نرم اطراف استخوان پاک شد و در داخل محیط کشت DMEM قرار داده شد. پتری‌دیش‌های محتوی استخوان‌های ران و درشت‌نی به زیر هود منتقل گردیدند. سپس دو انتهای استخوان‌ها قطع گردید و با استفاده از سرنگ انسولین سرسوزن شماره ۲۲ و محیط کشت مغز استخوان خارج گردید. سپس سلول‌ها به

مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردیدند و سلول‌های ته نشین شده دوباره با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شد. فلاسک کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. هر ۴ روز یک بار محیط کشت تعویض شد تا زمانی که سلول‌های مزانشیمی کف فلاسک را پر کردند. جهت پاساژ سلول‌ها با استفاده از Trypsin-EDTA در مدت ۲ دقیقه سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند و در فلاسک‌های تازه کشت داده شدند. به منظور کاهش سلول‌های غیر مزانشیمی از سومین پاساژ سلول‌ها برای تزریق استفاده شد (۱۳).

به منظور عمل پیچش - واپیچش بند بیضه حفره بطنی حیوانات از طریق برش میانی - شکمی باز گردید و بیضه و طناب اسپرماتیک سمت چپ از محل خود خارج شد و طناب اسپرماتیک با پیچش ۷۲۰ درجه در خلاف جهت عقربه‌های ساعت به مدت یک ساعت در شرایط پیچش قرار گرفت. پس از ۱ ساعت با باز کردن آن در خلاف جهت پیچش و برقراری جریان خون، ایجاد گردید. بعد از جراحی، در گروه‌های دریافت‌کننده سلول، پس از خون‌رسانی مجدد، سلول‌ها به تعداد نیم‌میلیون در حجم ۱۰ میکرولیتر داخل شبکه بیضه‌ای تزریق شد (۱۱).

حیوانات پس از ۳۵ روز، بعد از توزین کشتار شدند و از بیضه نمونه‌برداری شد و در محلول ثبوتی فرمالین - سرم فیزیولوژی ۱۰ درصد قرار داده شد. نمونه‌ها پس از ثبوت و طی مراحل پاساژ و تهیه مقاطع بافتی پارافینی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر

نیز در سه لوله منی‌ساز در هر نمونه بافتی انجام گرفت، شمارش میانگین تعداد سلول‌های لیدیک در سطح یک میلی‌مترمربع از بافت بیضه و تعداد عروق خونی بیضه نیز با عدسی چشمی مشبک انجام شد (۱۵).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنوا و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

مطالعه مقاطع بافتی نشان داد که در گروه کنترل شم تمامی رده‌های سلولی در داخل لوله‌های منی‌ساز بافت بیضه که شامل اسپرماتوگونی نوع A و B، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در مراحل مختلف اسپرماتوزن می‌باشد، قابل تشخیص هستند. در گروه T-D آتروفی لوله‌های منی‌ساز و از بین رفتن رده‌های سلولی یعنی دژنراسیون شدید سلول‌های اسپرماتوزنیک در مقایسه با گروه کنترل شم و گروه T-D+Msc قابل مشاهده بود. در این گروه از هم گسیختگی، سازمان یافتگی نامنظم و واکوئل‌دار شدن اپیتلیوم زایا به همراه حضور سلول‌های زایای نابالغ در حفره میانی و افزایش فضای بین لوله‌ای جلب توجه می‌نماید.

گروه دریافت کننده سلول Msc دراپی تلیوم زایگر لوله‌های منی‌ساز سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسست اولیه، ثانویه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید به خوبی مشخص بودند. در این گروه

مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و ماسون- تری‌کروم برای بررسی تعداد عروق قرار گرفتند.

قطر لوله‌های منی‌ساز با استفاده از عدسی مدرج سوار شده بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای محاسبه ضخامت اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز از قاعده اسپرماتوگونی‌های موجود در روی لایه بازال لوله‌های منی‌ساز تا سطح حفره‌ای لوله منی‌ساز بر اساس میکرومتر با عدسی مدرج که قبلاً کالیبره شده است اندازه‌گیری شد. در این روش لوله‌های منی‌ساز با مقطع گرد یا نزدیک به گرد مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴). هم‌چنین برای تعیین ضریب اسپرمیوزن (SI)، میانگین درصد لوله‌های منی‌ساز دارای اسپرم محاسبه گردید. برای محاسبه شاخص تمایز لوله‌ای (TDI) میانگین درصد لوله‌های منی‌ساز که شامل سه یا بیش از سه رده سلول‌های اسپرماتوزن تمایز یافته از سلول اسپرماتوگونی نوع A می‌باشد، محاسبه گردید. برای محاسبه ضریب بازسازی (RI) میانگین درصد سلول‌های اسپرماتوگونی فعال به سلول‌های اسپرماتوگونی غیر فعال بررسی شد. اندازه‌گیری میانگین ضخامت کپسول (در هر نمونه بافتی در پنج محل به طور اتفاقی بر حسب میکرومتر با عدسی مدرج قبلاً کالیبره شده اندازه‌گیری شد) و تعداد سلول‌های سرتولی فعال (که در این روش هر کدام از تجمع‌های اسپرماتوزوئیدهای در حال تکامل در بخش حفره‌ای لوله‌های منی‌ساز به عنوان یک سلول سرتولی فعال در نظر گرفته شد) این شمارش

نسبت به گروه T-D بهبود بیشتر قابل تشخیص بود، به طوری که گروه دریافت کننده سلول ساختار بافتی طبیعی داشته و به وسیله سلول‌های اسپرمتوژنیک در مراحل مختلف بلوغ مفروش شده بودند (تصویر ۱).

از لحاظ شاخص‌های اسپرمتوژنز نیز درصد ضریب اسپرمیوژنز و ضریب تمایز لوله‌ای و ضریب بازسازی در گروه T-D+Msc در مقایسه با گروه T-D افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). همچنین گروه T-D+Msc کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شم داشت ($P < 0.05$). (جدول ۱).

نتایج مربوط به بررسی تعداد سلول‌های سرتولی فعال گروه کنترل شم نسبت به گروه T-D+Msc افزایش معنی‌داری را داشت ($P < 0.05$). در گروه T-D+Msc در مقایسه با گروه T-D افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). (جدول ۲).

در گروهی که تزریق سلول صورت گرفته سلول‌های رده اسپرمتوژنز به همراه سلول‌های سرتولی فعال نسبت به گروه T-D افزایش نشان دادند. اکثر لوله‌های منی‌ساز حاوی توده‌های اسپرمی در حفره میانی بودند و برخی لوله‌های منی‌ساز از همدیگر فاصله گرفته بودند.

تعداد سلول‌های لیدیک گروه T-D+Msc نیز نسبت به گروه کنترل شم کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) دیده شد، اما گروه T-D+Msc در مقایسه با گروه T-D افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). (جدول ۲).

بررسی‌های آماری نشان داد که قطر لوله‌های منی‌ساز برحسب میکرومتر در گروه تحت درمان با Msc نسبت به گروه T-D افزایش معنی‌داری داشت. همچنین گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل شم اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$). نشان نداد (جدول ۳). در میانگین ضخامت اپیتلیوم زایگر در گروه T-D+Msc اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما افزایش معنی‌داری در گروه T-D +Msc نسبت به گروه T-D وجود داشت ($P < 0.05$). (جدول ۳).

ضخامت کپسول بیضه نیز در گروه T-D+Msc و کنترل شم نسبت به گروه T-D افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). همچنین میان گروه T-D+Msc و کنترل شم اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود نداشت (جدول ۳).

در شمارش عروق نیز کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) در گروه T-D نسبت به گروه کنترل شم و دریافت کننده T-D+Msc مشاهده شد. هرچند در گروه دریافت کننده سلول، افزایش عروق نسبت به کنترل شم دیده شد اما اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نبود (نمودار ۱) (تصویر ۲).

جدول ۱: مقایسه میانگین ضرایب اسپرمتوژنز در گروه‌های مختلف آزمایشی (میانگین ± انحراف معیار)

گروه‌ها	ضریب بازسازی	ضریب اسپرمیوژنز	تمایز لوله ای
کنترل شم	۸۴/۸۳ ± ۰/۷ a	۸۵/۸۳ ± ۰/۶ a	۸۵/۸۳ ± ۰/۶ a
پیچش - واپیچش	۲۸ ± ۰/۵ b	۴۱ ± ۰/۹ b	۲۹/۶۶ ± ۰/۷ b
مزانسیم (Msc+T-D)	۶۱/۶۶ ± ۱/۶ c	۵۵/۵ ± ۰/۵ c	۶۳ ± ۰/۷ c

حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$)

جدول ۲: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های سرتولی، لیدیک در گروه‌های مختلف آزمایشی (میانگین ± انحراف معیار)

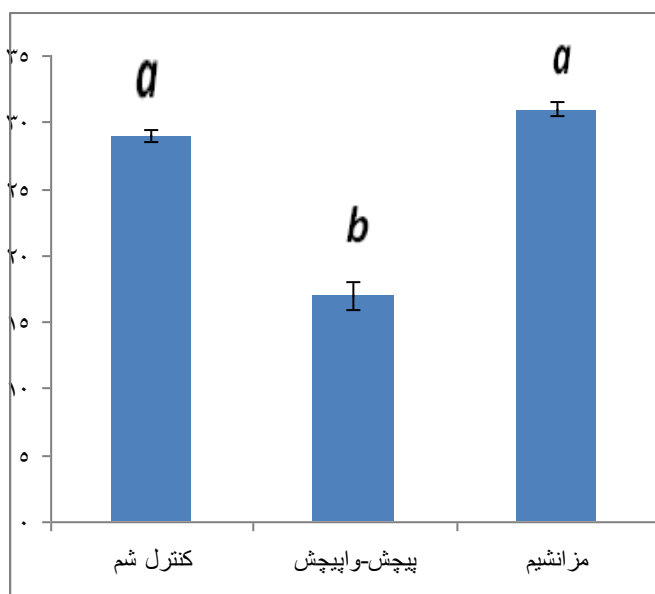
گروه‌ها	تعداد سلول‌های سرتولی فعال	تعداد سلول‌های لیدیک
کنترل شم	75 ± 0.7 a	30.7 ± .3 a
پیچش - واپیچش	34/5 ± .7 b	316/6 ± .5 b
مزانشیم (Msc+T-D)	51/33 ± .9 c	288/2 ± .3 c

حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$)

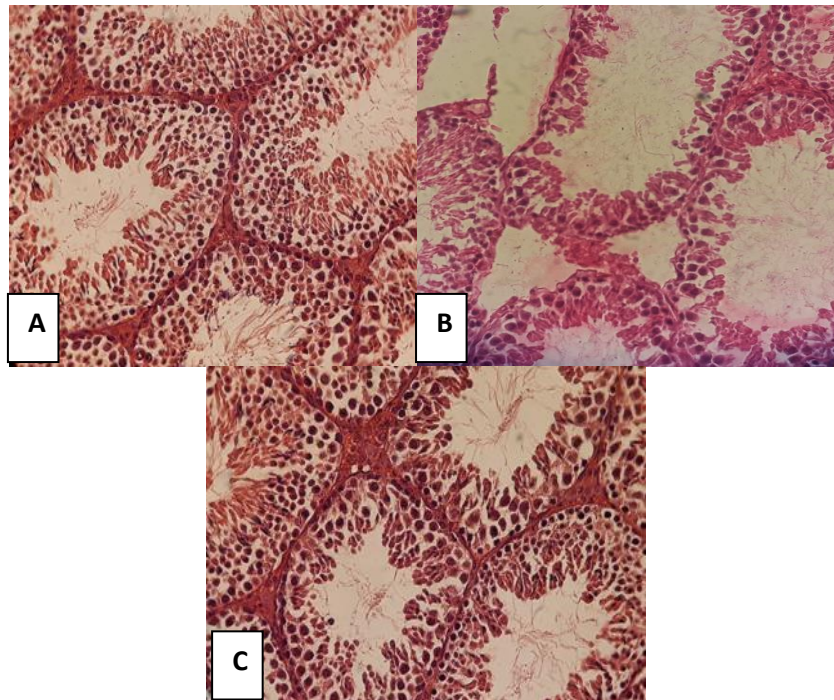
جدول ۳: مقایسه میانگین تعداد ضخامت کپسول بیضه، قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم در گروه‌های مختلف آزمایشی (میانگین ± انحراف معیار)

گروه‌ها	ضخامت کپسول	ضخامت اپیتلیوم	قطر لوله‌های منی‌ساز
کنترل شم	18/16 ± .4 a	62/16 ± .6 a	209/83 ± 1/0.7 a
پیچش - واپیچش	10/83 ± .7 b	34/83 ± .4 b	150/33 ± 1/4 b
مزانشیم (Msc+T-D)	17/66 ± .4 a	63/83 ± .4 a	202/5 ± .6 a

حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$)

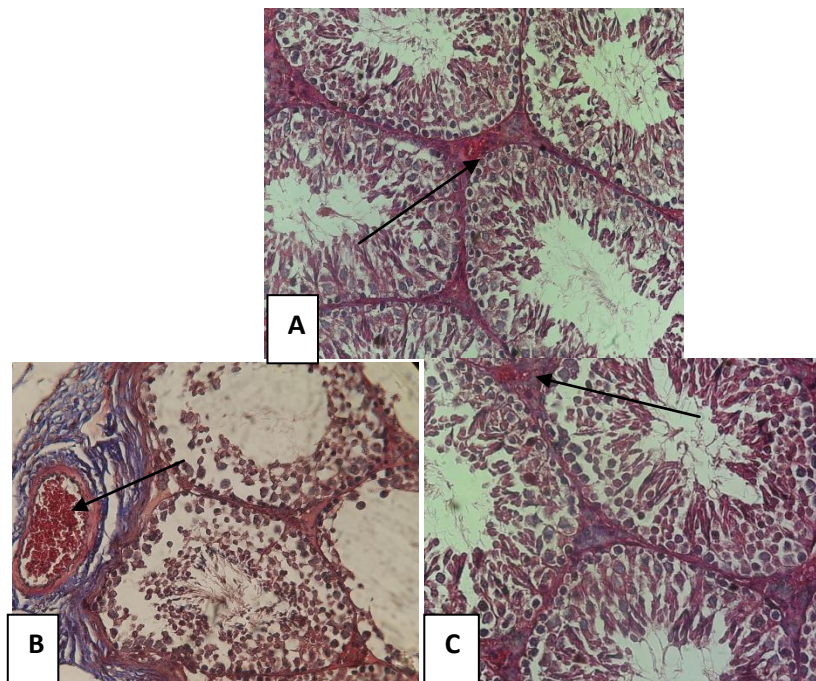


نمودار ۱: بررسی تعداد عروق در سطح ۱ میلی متر مربع از بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی ($P < 0.05$)
حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$)



تصویر ۱: با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین با بزرگ‌نمایی $\times 400$. A: گروه کنترل شم (Con-sham). B: گروه پیچش - واپیچش. C: (T-D). گروه دریافت کننده مزانشیم (T-D+Msc) دریافت کننده مزانشیم

A: گروه کنترل شم (Con-sham). نمایی از ارتباط تنگاتنگ لوله های منی ساز و رده سلولهای اسپرماتوژنزدر اپیتلیوم لوله های منی ساز بافت بیضه، B: گروه پیچش - واپیچش (T-D). در این گروه لوله های منی ساز از هم گسیخته شده اند و بافت بیضه انسجام طبیعی خود را از دست داده است. C: گروه دریافت کننده مزانشیم (T-D+Msc). بافت بیضه دارای انسجام طبیعی و رده سلولهای اسپرماتوژنزدر اپیتلیوم لوله های منی ساز بافت بیضه قابل مشاهده است



تصویر ۲: برشی عرضی از بافت بیضه با رنگ آمیزی ماسون تری کروم نشان دهنده عروق خونی (فلش). با بزرگ‌نمایی $\times 400$. A: گروه کنترل شم (Con-sham). B: گروه پیچش - واپیچش (T-D). C: گروه دریافت کننده مزانشیم (T-D+Msc). گروه کنترل شم (Con-sham). در گروه کنترل لوله های منی ساز و عروق خونی بحالت نرمال می باشد. B: گروه پیچش - واپیچش (T-D). کاهش عروق، تخریب و بی

نظمی لوله‌های منی ساز در این گروه مشاهده گردید، C: گروه دریافت‌کننده مزانشیم (T-D+Msc)، بافت همبند بینابینی بیضه در این گروه از لحاظ ساختار مشابه گروه کنترل بوده و سلول‌ها، رشته‌ها و عروق خونی از یک تراکم و نظم طبیعی برخوردار بودند

بحث

توجه به این که ارتباط مثبتی بین قطر لوله‌های منی‌ساز و اسپرماتوژنز وجود دارد و آتروفی لوله‌های منی‌ساز نیز نشانه اختلالات اسپرماتوژنز در بافت بیضه است (۲۱)، در این مطالعه نیز افزایش قطر لوله‌های منی‌ساز متناسب با ضرایب اسپرماتوژنز در گروه درمانی نسبت به گروه پیچش - واپیچش مشاهده گردید. از آنجا که سلول‌های سرتولی در تکامل و بلوغ سلول‌های جنسی نقش مهمی دارند (۲۲)، بنابراین، افزایش سلول‌های سرتولی فعال در گروه تحت درمان در بالا بردن ضرایب RI, TDI, SI عامل مؤثر می‌باشند. همچنین در این تحقیق افزایش تعداد سلول‌های لیدیک نیز در گروه دریافت‌کننده سلول‌های مزانشیمی، نشان‌دهنده نقش این سلول‌ها در بهبود عملکرد بافت بیضه بوده که می‌تواند باعث افزایش توان باروری گردد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، می‌توان گفت سلول‌های مزانشیمی می‌توانند در کاهش استرس اکسیداتیو مؤثر باشند. از طرفی همان‌طور که گفته شد سلول‌های مزانشیمی در شرایط پاتولوژیکی به بافت‌های آسیب‌دیده مهاجرت می‌کنند و در بهبود زخم و ترمیم بافت نقش مؤثری را ایفا می‌کنند و از طریق ترشح فاکتور رشد آندوتلیالی عروقی می‌توانند رگ‌زایی را به دنبال داشته باشند (۲۳). این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های اندوتلیال عروقی تمایز یافته و برای سلول‌های درمانی بیماری‌های عروقی به کار گرفته شوند (۲۴). کیتنگ و همکاران در پژوهشی نشان دادند

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق سلول‌های مزانشیمی بعد از پیچش - واپیچش بند بیضه باعث افزایش در میانگین تعداد سلول‌های لیدیک، سرتولی فعال و نیز شاخص‌های اسپرماتوژنز می‌شود. چنین به نظر می‌رسد که نقش سلول‌های مزانشیمی در این رابطه علاوه بر تولید فاکتورهای رشد و ترمیم (۱۶)، در زمینه تحریک آنژیوژنز نیز دارای اهمیت باشد. چرا که مرحله اول در روند ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده، تحریک آنژیوژنز مطرح است (۱۷). همچنین بر اساس مطالعه‌های انجام شده مشخص شده است که سلول‌های مزانشیمی می‌توانند از تولید پراکسید هیدروژن ممانعت نموده و با کاهش التهاب و آپوپتوز، روند بهبود را پیش ببرند. در پیچش بیضه لکوسیت‌ها به عنوان پیش‌برنده قوی استرس اکسیداتیو به دنبال خون‌رسانی مجدد می‌باشند (۱۸). سلول‌های مزانشیمی موجب افزایش سایتوکین‌های ضد التهابی از طریق مهار لنفوسیت T می‌شوند (۱۹).

آسیب بافتی ناشی از ایسکمی و خون‌رسانی مجدد در بیضه باعث کاهش در شاخص‌های اسپرماتوژنز و همچنین موجب القاء دژنراسیون در اپیتلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود (۲۰). این مطالعه نیز نشان داد که ضرایب اسپرماتوژنز در گروه تحت درمان با مزانشیم نسبت به گروه پیچش - واپیچش افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$)، که با نتایج حاصل از مطالعه‌های قبلی هم‌خوانی دارد (۳). با

مطالعه حاضر تحت پایان نامه دوره دکترا انجام گرفته و منابع مالی آن به وسیله دانشگاه ارومیه تأمین گردید. از معاونت محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده و کارشناس محترم آزمایشگاه بافت‌شناسی و کشت سلول دانشکده دامپزشکی گروه علوم پایه دانشگاه ارومیه، که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدرانی می‌نماییم.

که پیوند سلول‌های مزانشیمی در ایسکمی ایجاد شده در پای رت، رگزایی را به دنبال داشته است (۲۵). هم‌چنین گزارش‌ها حاکی از آن است که سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان باعث القا آنژیوژنز در بیماری‌های ایسکمیک قلبی شده است (۲۶). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که میانگین تعداد عروق خونی در گروه دریافت‌کننده مزانشیم در مقایسه با گروه پیچش - واپیچش دارای افزایش جبرانی بوده و این یافته مطالعه‌های قبلی را تأیید می‌کند. بنابراین می‌توان گفت که سلول‌های مزانشیمی می‌توانند علاوه بر کاهش استرس اکسیداتیو از طریق تولید فاکتورهای مؤثر در رگزایی نیز باعث آنژیوژنز شده و روند بهبود و ترمیم در بافت بیضه را پیش ببرند.

نتیجه‌گیری

سلول‌های مزانشیمی با افزایش آنژیوژنز موجب اصلاح الگوی گردش خون در بافت بیضه شده و از این طریق توان آنتی‌اکسیدانته بافت بیضه را بالا برده و در نتیجه باعث بهبود شرایط ایسکمی و القاء ترمیم در بافت بیضه می‌شوند. برای بررسی بیشتر میزان آنژیوژنز پیشنهاد می‌شود که مطالعه‌های مولکولی در زمینه بیان ژن‌های مرتبط با فاکتورهای رشد و آنژیوژنز مترشحه از سلول‌های مزانشیمی در شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از پیچش- واپیچش بیضه انجام گیرد.

تقدیر و تشکر

REFERENCES

- 1.Hamed GM, Ahmed RM, Emara MM, Mahmoud MH. Effect of erythropoietin on experimental unilateral testicular torsion detorsion in rat model. *Life Science Journal* 2011; 8(2): 405-12.
- 2.Shimizu S, Saito M, Dimitriadis F, Kinoshita Y, Shomori, K, Satoh I, Satoh K. Protective effect of schaemic post conditioning on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular Ischaemia- reperfusion injury. *International Journal of Andrology* 2011; 34(3): 268-75.
- 3.Vakili A, Eianali M, Bandegi A. The protective effects of saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. *Tehran University Medical Journal* 2011; 7(69): 405-12.
- 4.Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P. Human bone marrow stromal cells suppress Tlymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10): 3838-43.
- 5.Sabbaghi MN, Bahrami AR, Feizzade B, Kalantar SM, Matin M, Kalantari M, et al. Trial evaluation of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation in revival of spermatogenesis in testicular torsion. *Middle East Fertility Society Journal* 2012;17: 243-9.
- 6.Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood* 2007; 109(10): 4245-8.
- 7.Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce LDOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2539-49.
- 8.Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10): 795-803.
- 9.Azizollahi S , Aflatoonian R, Sadighi Gilani M, Behnam B, TajikN , Asghari-Jafarabadi M, Asgari HM , Koruji M. Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stemcells transplantation in testicular torsion-detorsion mice. *J Assist Reprod Genet* 2016; 17: 240-55.
- 10.Vitzthum VJ .WILEY AS. The proximate detremnants of fertility in population exposed to chronic hypoxia .*High Med Bio* 2003; 4: 125-39.
- 11.Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QA, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. *Biol Reprod* 2001; 65: 718-25
- 12.Qin Y, Liu L, He Y, Wang C, Liang M, Chen X, et al. Testicular Busulfan Injection in Mice to Prepare Recipients for Spermatogonial Stem Cell Transplantation Is Safe and Non-Toxic. *Journal Pone* 2016; 14; 83-8.
- 13 Malek Soleimani Mehranjani , Majid Mahdiyeh , Sedighe Hoseini , Atena Sadat Azimi . The Effect of Vitamin E on the In Vitro differentiation of adult rat bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblast during sodium arsenite exposure . *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2016; 22(4): 276-85.
- 14.Nejati V, Khanshi F. Effect of hydroalcoholic extract of plantago major leaf on the testis morphology, sperm parameters and testosterone level in streptozotocin-induced diabetic rats. quarterly of the. *Horizon of Medical Sciences* 2014; 20(1): 49-55.
- 15.Khayatnouri MH, Safavi SE, Safarmashaei S, Mikailpourardabili B, Babazadeh D. Effect of Saffron on histomorphometric changes of testicular tissue in Rat. *Am J Anim Vet Sci* 2011; 6: 153-9.
- 16.Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33(3): 211-5.
- 17.Le Blanc K. Mesenchymal stem cells. Basic science and future clinical use. *Lakartidningen* 2002; 99(12):1318-21, 1324.
- 18.Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26(1): 151-62.
- 19.Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P. Human bone marrow stromal cells suppress Tlymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10): 3838-43.

20. Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction* 2007; 13(3): 11-9.
21. Predes FS, Monterio JC, Paula TA, Dmatta SLP. Evaluation of rat testes treated with arctiumlappa 1: Morphometric study. *Braz J Morphol Sci* 2007; 24(4):112-7.
22. Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi Sh, Nejati V. Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed* 2013; 3(4): 347-55.
23. Hamano K1, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001; 65: 845-7.30
24. Chang YJ, Hwang SM, Tseng CP, Cheng F, Huang S, Hsu L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs* 2010; 192(2): 93-105.
25. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006; 13(6): 419-25.
26. Song L, Tuan R. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb* 2004; 18: 980-2.

Protective effect of Bone marrow mesenchymal cells on Testis Histologic and Histomorphometric properties in Mice following Spermatic cord Torsion-Detorsion

Khaneshi F, Shahrooz R*, Ahmadi A, Mazaheri Khamene R, Imani M

Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 12 Sep 2017

Accepted: 10 may 2018

Abstract

Background & Aim: According to the disturbance in testis circulation and subsequently the anemia of an organ, it can disrupt fertility. In this study, the protective effect of mesenchymal gastric lavage cells on testicular histomorphometry after the torsion of Torsion-Detorsion (T-D) of the testicular band was investigated in a comparative manner.

Methods: In this experimental study, 30 adult mice were randomly divided into three equal groups; the control group was Sham, in this group only the abdominal cavity was opened and then closed. Torsion Torsion Group (T-D), in this group, the fracture torsion was performed in the left testicular fracture. After the circulating blood was restored to the rat's ellipse, a phosphate buffer of 10 μ L was injected. Mesenchymal cell group (T-D + Msc), after torsion of the defect in mice, the mesenchymal cells were injected into half a million volumes, 10 microliters, of the testicular network. At the end of the treatment period (35 days), after sampling the testicular tissue of the left side and stabilizing the sample, paraffin sections were stained with Hematoxylin Eosin and Masonium trichrome (for cervical counts), then the tissue parameters were evaluated. The data were analyzed using ANOVA test and Tukey post hoc test.

Results: Our results showed that mesenchymal treatment (T-D + MSc) had a significant increase in the mean spermatogenesis, active serotylated cells and leydig cells, diameter of the menisis tubes, epithelium thickness and testis capsule compared with the defect torsion group (TD) $P < 0.05$). In the study of the number of arteries in the T-D group, there was a significant decrease in the T-D + MSc group ($p < 0.05$).

Conclusion: Using of Mesenchymal cells can improve the process of repairing the damage caused by torsion defect in the testicles by increasing angiogenesis and tissue repair.

Key words: Microsurgery, Testis, Testicular Defect Torsion, Mesenchymal Cell

Corresponding Author: Shahrooz R, Department of Basic Veterinary Sciences, Histology & Embryology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: r.shahrooze@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:

Khaneshi F, Shahrooz R, Ahmadi A, Mazaheri Khamene R, Imani M. Study of Protective Effect of Mesenchymal Genesis on Histological and Microscopic Features of Testicular Tissue after Torsion Tumor-Wrap in White Rats. Armaghane-danesh 2018; 23 (2): 202-213.