مقاله پژوهشی

اثرات مایع رویی حاصل از کشت جداگانه و هم زمان سلول‌های فیبروبلاست و ماکروفاژ بر روی اختلالات پارامترهای اسپرم القا شده به وسیله ی پیچش- واپیچش بیضه در رت های نر بالغ

منصوره میرزایی گله کلایی[۱] رسول شهروز[۱*] علی شالیزار جلالی[۱]، فرشید صراف زاده رضایی[۲] ، نریمان مصفا[۳]

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: ایسکمی و خونرسانی مجدد منجر به تولید بیش از اندازه گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. در مطالعه حاضر آثار محافظتی مایع رویی حاصل از کشت سلول در اختلال کیفیت اسپرم القاء شده توسط پیچش- واپیچش (Torsion-Detorsion (T-D بیضه رت‌های بالغ مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۴۲ سر رت بالغ در ۷ گروه تقسیم شدند. ۱-گروه کنترل سالم: تحت عمل جراحی قرار نگرفت. ۲-گروه لاپاراتومی: تحت عمل جراحی لاپاراتومی بدون T-D پیچش- واپیچش قرار گرفتند. ۳-گروه T-D: تحت عمل جراحی و T-D قرار گرفتند. ۴-گروه T-D+DMEM: پس از T-D محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) تزریق شد. گروه‌های ۵ الی ۷ به ترتیب شامل T-D+F، T-D+M، T-D+FM متعاقب T-D به ترتیب مایع رویی حاصل از کشت فیبروبلاست، ماکروفاژ و کشت هم زمان ماکروفاژ- فیبروبلاست تزریق شد. تمام تزریق‌ها به میزان ۱۰ میکرولیتر یک بار پس از T-D در شبکه بیضه‌ای انجام شد. ۳۵ روز بعد از عمل جراحی پارامترهای کیفیت اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌های حاصله با روش آماری آنووا یک طرفه و تست تعقیبی توکی بین گروه‌ها در سطح ($P<۰/۰۵$) مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج: گروه‌های تجربی دریافت کننده مایع رویی کشت فیبروبلاست و ماکروفاژ بهبود پارامترهای اسپرم نسبت به گروه T-D و T-D+DMEM را نشان دادند. در گروه T-D+FM آثار بهبودی توسط مایع رویی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه توانایی بالای مایع رویی حاصل از کشت جداگانه‌ی فیبروبلاست و ماکروفاژ در بهبود پارامترهای اسپرم بعد از عمل پیچش- واپیچش بیضه را نشان داد.

کلمات کلیدی: پیچش- واپیچش بیضه، فیبروبلاست، ماکروفاژ، کیفیت اسپرم، رت

مقدمه

ناباروری یک مسئله ی بهداشتی است که شیوع آن رو به افزایش می باشد که ۱۵-۱۰ از زوج ها را در دنیا تحت تاثیر قرار می دهد .سازمان بهداشت جهانی گزارش کرده است که بیش از ٪۲۵ از زوجین در کشورهای در حال توسعه تجربه ناباروری دارند (۱). شیوع ناباروری در سراسر جهان بین میزان ۷-۳ ٪ متفاوت می‌باشد (۲). اگرچه علل زیادی برای آزواسپرمی وجود دارد، ولی در مجموع اتیولوژی این اختلال به سه دسته کلی علل پیش بیضه ای، بیضه ای، پس بیضه ای تقسیم می شود.

علل پیش بیضه آزواسپرمی شامل اختلالات آندوکرینی هستند که اثر منفی بر روی اسپرماتوژنز دارد. علل پیش بیضه‌ای نارسایی ثانویه نامیده شده، و معمولاً به دلیل بیماری ها یا شرایط پاتولوژیکی غدد درون ریز حاصل می‌شود. علل بیضه ای به طور گسترده به عنوان نارسایی بیضه‌ای اولیه شناخته شده که از

*نویسنده مسئول: رسول شهروز، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران.
Email: r.shahrooze@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-1470-010X

اختلالات درونی اسپرماتوژنز می‌باشد که به دنبال آسیب مستقیم به بیضه متعاقب واریکوسل، عدم نزول بیضه، پیچش بیضه، ارکیت ناشی از اوریون، اثر گنادوتوکسیک داروها، اختلالات ژنتیکی و علل ایدیوپاتیک می‌باشد. علل پس بیضه شامل انسداد سیستم مجرایی در هر ناحیه ای از دستگاه تولید مثل جنس نر می‌باشد و در ارتباط با انسداد در مسیر انتقال اسپرم یا اختلال در انزال است (۳).

تورشن (Torsion) یک وضعیت اورژانسی اورولوژی می‌باشد، که اغلب نوزادان، کودکان و نوجوانان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این وضعیت همچنین نیازمند جراحی فوری برای جلوگیری از آسیب به بیضه می‌باشد. پیچش- واپیچش بیضه منجر به تغییرات سطح تولید هورمون و ناباروری می‌شود. ایسکمی و خونرسانی مجدد بیضه منجر به تولید بیش از اندازه گونه‌های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) و شکست زنجیره ی DNA در اسپرم می‌گردد (۴).

گونه‌های فعال اکسیژن یا رادیکال های آزاد به هنگام هیپوکسی تولید می شوند و ممکن است موجب آسیب بافت ها از طریق استرس اکسیداتیو گردد. تحت شرایط طبیعی بدن انسان می تواند رادیکال های آزاد را به واسطه مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانتی آنزیمی حذف نماید. در حین پیچش- واپیچش بیضه تعادل بین ROS و مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانتی سلولی مختل می‌شود که ممکن است بر روی فعالیت های بیولوژیکی سلول‌ها، تولید هورمون و اسپرماتوژنز اثر بگذارد. علاوه بر این، اثر زیان آور مهم خون رسانی مجدد، تشدید استرس اکسیداتیو و تسریع آپوپتوز می‌باشد (۵).

پروتئین هایی که توسط نوع خاصی از سلول‌ها در شرایط کشت ترشح می شوند سکرتوم Secretom نامیده می‌شود، که نقش مهمی در تنظیم بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی از طریق مکانیسم های پاراکرین/اتوکرین ایفا می کنند. آن ها جهت کمک به شناخت بیماری های نادر، تمایز، پروتئولیز، آپوپتوز، شناسایی بیومارکرهای بالقوه و اهداف درمانی بسیار مورد توجه می باشند. به نظر می رسد که آن ها توسط ۱۰٪ از ژنوم انسانی رمزگذاری می شوند (۶). پروتئین های ترشحی در ارتباط با طیف گسترده ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی به خوبی شناخته شده‌اند، آن ها دارای نقش کلیدی در هوموستاز، رشد، تمایز، پروتئولیز، آپوپتوز، علامت دهی و تکامل ماتریکس خارج سلولی می باشند (۷, ۸).

استفاده از مایع رویی محیط کشت سلول Conditioned medium (CM)حاوی سکرتوم دارای مزایای زیادی نسبت به استفاده از سلول‌های بنیادی می‌باشد. زیرا CM می تواند به راحتی تولید شده و پس از خشک و فریز شدن (Freeze– dried)، بسته بندی و حمل شود. علاوه براین عاری از سلول بوده و نیاز به تطابق داشتن فرد دهنده و گیرنده جهت اجتناب از مشکلات رد پیوند نمی‌باشد(۹). امروزه استفاده از CM برای درمان بیماری ها بسیار مورد توجه می‌باشد و ممکن است در آینده نزدیک به سرعت توسعه یابد (۱۰).

انفوزیون سیستمیک مایع رویی حاصل از کشت سلول های مزانشیمی در موش های دیابتی سطح گلوکز خون را در مرحله اولیه بعد از انفوزیون پایین می آورد و سطح مقدار انسولین سرم و پپتید- C را افزایش می دهد. درمان با مایع رویی حاصل از کشت سلول های مزانشیمی، پرولیفراسیون سلول های B در جزایر تخریب شده را تحریک می کند به دنبال رژنراسیون جزایرتخریب شده، عملکرد آن بهبود می یابد و به طور موثر پیشرفت دیابت را کنترل می کند (۱۱).

فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs) Fibroblast growth factor به عنوان فاکتورهای هورمونی شناخته شده که نقش کلیدی در تنظیم رشد و تکامل اعضای تولید مثلی از جمله بیضه دارد و در میان ۲۳ عضو این خانواده فاکتورهای-FGF , FGF-21 9 , FGF-8, FGF-4, FGF-2, FGF-1 بیشتر دخیل می باشند (۱۲). گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی۲ (FGFr2) نقش واضح و روشنی در تکثیر و تمایز سلول‌های سرتولی بازی می کند (۱۳).

فاکتور رشد فیبروبلاستی ۹ (FGF-9) در ارگانوژنز و بلوغ بیضه نقش ضروری دارد فقدان این فاکتور سبب معکوس شدن جنسیت مرد به زن می شود. FGF-9 در فضای بینابینی بیضه در روز ۱۸-۱۷ بارداری و در سلول های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول های لایدیگ در روزهای پس از تولد بالاترین بیان را دارند. گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱و ۴ (FGFr1,4) Fibroblast Growth Factor receptor 1,4 در حین مراحل جنینی و پس از تولد در بیضه بیان می شوند. اما گیرنده های فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ و ۳ (FGFr2,3) Fibroblast Growth Factor receptor 2,3 به طور گسترده در زمان تکامل مراحل جنینی تظاهر می یابند به طوری که گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ در لوله های سمینیفروس در طی روزهای ۱۸-۱۶ بارداری و گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۳ در فضای

بینابینی بیضه در طی روزهای ۱۸-۱۷ بارداری بیشتر بیان می شوند. در مراحل بعد از تولد به طور گسترده در روزهای ۶۵-۳۵ در سلول های اسپرماتید و لایدیگ گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ و در تمامی بافت بیضه گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۳ تظاهر می یابند. مطالعات حاکی از آن است که FGF-9 با بیان گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲و۳ و احتمالاً تکامل بیضه در ارتباط است (۱۴).

ماکروفاژها سلول های ایمنی ذاتی هستند که در همه اعضای بدن به طور ضروری وجود دارند. بطور برجسته در کنار نقش های گوناگون ماکروفاژها در پاسخ ایمنی ذاتی، آن ها اعمالی تروفیک در هومئوستاز و رژنراسیون بافتی دارند و در خیلی از اعمال اعضای اختصاصی بدن از جمله گنادها مشارکت دارند. ماکروفاژهای بیضه ای با سلول های لایدیگ کاملاً در ارتباط هستند و یک نقش مهم در تکامل و رژنراسیون این سلول ها و تولید تستوسترون بازی می کنند. جمعیتی از سلول های ماکروفاژی در فضای بینابینی بین لوله های سمینیفروس ساکن هستند و مشخص شده است که در ارتباط مستقیم با لوله های اسپرماتوگونیا و در مجاورت سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا هستند و بررسی شده است که این سلول های ماکروفاژی بر روی محیط سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا و نقش عملکردی آن ها اثر دارند (۱۵).

ماکروفاژهای بیضه ای به طور موضعی مقدار کمی کورتیکوسترون تولید می کنند که بیان ژن های التهابی لایه بازال را ساپرس می کند. کورتیکوسترون موجود در محیط بیضه عملکرد ایمونوساپرسیو در بافت بیضه را بهبود می بخشد و این استروئید نقش مهم در ایجاد و حفظ ویژگی های ایمنی در بافت بیضه بازی می کند (۱۶).

با توجه به خصوصیات و اثرات فاکتورهای رشد ترشحی سلول‌ها، این مطالعه با هدف ارزیابی اثر مایع رویی حاصل از کشت جداگانه و هم زمان سلول‌های فیبروبلاست و ماکروفاژ ر روی بهبود اختلال پارامترهای اسپرم حاصل از پیچش- واپیچش بیضه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۲۲۰-۱۸۰ گرم استفاده شد، درجه حرارت حیوان خانه حدود ۲ ± ۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در آن رعایت شد. رت ها درون قفس تمیز نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب وغذا داشتند.

رت ها به طور تصادفی در ۷ گروه شش تایی قرارگرفتند:

۱-گروه کنترل سالم: تحت عمل جراحی قرار نگرفتند.

۲-گروه لاپاراتومی: تحت عمل جراحی لاپاراتومی بدون پیچش– واپیچش قرار گرفتند.

۳-گروه T-D: تحت عمل جراحی پیچش– واپیچش قرار گرفتند.

۴-گروه T-D+DMEM: تحت عمل جراحی پیچش– واپیچش قرار گرفتند و ۱۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM در شبکه بیضه ای تزریق شد.

۵- گروه T-D+F: تحت عمل جراحی پیچش– واپیچش قرار گرفتند و ۱۰ میکرولیتر مایع رویی حاصل از کشت فیبروبلاست در شبکه بیضه ای تزریق شد.

۶- گروه T-D+M: تحت عمل جراحی پیچش– واپیچش قرار گرفتند و ۱۰ میکرولیتر مایع رویی حاصل از کشت ماکروفاژ در شبکه بیضه ای تزریق شد.

۷-گروه T-D+FM: تحت عمل جراحی پیچش– واپیچش قرار گرفتند و ۱۰ میکرولیتر مایع رویی حاصل از کشت هم زمان ماکروفاژ- فیبروبلاست در شبکه بیضه ای تزریق شد.

روش ایجاد پیچش– واپیچش بند بیضه

جهت انجام جراحی، موش ها با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (Trittau Germany-50461) (۴۰mg/kg) و زایلازین (Alfasan-Holland- 1608238-01) (۵mg/kg) بیهوش شدند و پس از آماده سازی، برای ایجاد ایسکمی و تورشن بیضه از طریق برش خط میانی شکم باز گردیده و طناب اسپرماتیک و بیضه چپ از محل خود خارج شده و طناب اسپرماتیک ۷۲۰ درجه در خلاف جهت عقربه های ساعت به مدت ۱ ساعت تحت پیچش قرار گرفت. جهت برقرار ماندن پیچش بیضه از نخ بخیه کاتگوت ۰/۳ استفاده شد. بدین ترتیب با قطع جریان خون، ایسکمی بوجود آمد. پس از ۱ ساعت با باز کردن آن در خلاف جهت پیچش و برقراری مجدد جریان خون، رپرفیوژن برقرار شد. بعد از جراحی، در گروه های دریافت کننده محیط رویی سلول‌ها، پس از القای رپرفیوژن (واپیچش)، تزریق انجام گردید سپس بیضه به داخل فضای شکمی و کیسه اسکروتوم برگردانده شد و

خط میانی برش جراحی به وسیله ی نخ بخیه نایلون ۰/۳ بخیه شد و رت ها در قفس های جداگانه برای مدت ۳۵ روز نگهداری شدند (۱۷).

کشت فیبروبلاست

ابتدا پوست ناحیه کشاله ران حیوان پس از بیهوشی با تزریق داخل صفاقی کتامین (۴۰mg/kg) و زایلازین (۵mg/kg) برداشته شد و سپس با دوز بالای ماده بیهوشی آسان کشی شدند. قطعات خرد شده پوست در محیط کشت DMEM حاوی تریپسین ۰/۲۵٪ برای ۴-۳ دقیقه انکوبه شد و اپیدرم پوست از درم تحت شرایط استریل جدا شده و قطعات کوچک درم در پلیت های ۶ خانه ای قرار داده شدند. سپس بر روی هر کدام از این قطعات یک قطره سرم فتوس گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum چکانده شد و در دمای ۳۷°C رطوبت اتمسفر و ۵٪ CO_2 برای ۲ - ۱ ساعت انکوبه شد تا قطعات به کف چاهک های پلیت بچسبند. نمونه های بافتی برای ۵ –۴ روز با محیط کشت ۱۲٪ DMEM انکوبه گردیدند. در نهایت سلول‌ها با یک مورفولوژی شبیه فیبروبلاست‌ها از حاشیه نمونه ها شروع به مهاجرت نموده و زمانی که کولونی ها (۴-۵ پس از کاشتن در کف پلیت) آماده شدند سلول‌ها از کف چاهک ها با استفاده از تریپسین کنده شده و ساب کالچر (Subculture) یا پاساژ گردیدند (۱۸).

تهیه مایع رویی سلول فیبروبلاست

سلول‌ها ۳ مرتبه پاساژ یافتند و زمانی که به میزان ۸۰٪ کف پلیت را پر نمودند مایع رویی جمع آوری و دور ریخته شد و پلیت حاوی سلول‌ها دو مرتبه با Phosphate- buffered solution (PBS) شستشو و برای ۲۴ ساعت در محیط کشت DMEM بدون سرم فتوس گاوی (FBS) انکوبه شدند. بعد از این زمان محیط رویی جمع آوری و در دو مرحله با دور ۵۰۰g و ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محیط به دست آمده توسط دستگاه خشک کن انجمادی freez drier تغلیظ و فیلتر شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید (۱۹).

کشت ماکروفاژ

ماکروفاژهای حفره صفاق به وسیله لاواژ با ۳mL محلول فسفات بافری (PBS) سرد در ۳ مرحله به دست آمد. سپس سلول‌ها با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه گردید پلت های سلولی پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷°C با محیط کشت ۱۰٪ DMEM کشت یافتند، بعد از ۲ ساعت انکوباسیون محیط کشت برداشته شد و دور ریخته شد تا سلول‌هایی که به کف پلیت نچسبیدند خارج شوند، ۴ روز بعد از کشت مایع رویی جمع آوری گردید (۲۰).

تهیه مایع رویی سلول ماکروفاژ

بعد از ۴ روز از کشت، مایع محیط کشت روی سلول‌ها برداشته شد، سلول‌ها با محیط کشت بدون سرم فتوس گاوی Fetal Bovine Serum (FBS) برای ۲۴ ساعت کشت یافتند. بعد از این مدت مایع رویی محیط کشت برداشته شد و با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شده و مایع رویی سپس توسط دستگاه خشک کن انجمادی تغلیظ و فیلتر شد و تا زمان استفاده، در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید (۲۱).

کشت هم زمان ماکروفاژ– فیبروبلاست

کشت هم زمان ماکروفاژ– فیبروبلاست در پلیت های ۶ خانه ای با دانسیته $۲/۵ \times ۱۰^{۴}$ هر کدام از سلول‌های ماکروفاژ و فیبروبلاست کشت یافتند. مایع رویی بعد از سه روزجمع آوری (روش تهیه مایع رویی مشابه با روش تهیه مایع رویی حاصل از کشت جداگانه سلول های فیبروبلاست و ماکروفاژ می باشد) و با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی در میکروتیوب ۱mL ریخته شد و تا زمان استفاده، در دمای ۲۰°C- نگهداری شد (۲۲).

تهیه ی اسپرم از اپی دیدیم

۳۵ روز پس از عمل جراحی و شروع آزمایش، رت ها با تزریق داخل صفاقی دز بالای کتامین و زایلازین آسان کشی شدند، دم اپی دیدیم از بافت بیضه جدا گردید. سپس در قسمت دم اپی‌دیدیم چند برش ایجاد و داخل یک میلی لیتر محیط کشت Human Tubular Fluid (HTF) قرار داده شد. این محیط کشت حاوی دم اپی دیدیم داخل انکوباتور ۳۷°C و با ۵٪ CO_2 به مدت ۵ ساعت خروج اسپرم از دم اپیدیدیم برخلاف موش سوری (۰/۵ ساعت) به ۵ ساعت زمان نیاز دارد قرار داده شد تا امکان خروج اسپرم از دم اپی دیدیم فراهم آید. لازم به ذکر است که میکروتیوب حاوی محیط کشت، پیش از شروع عملیات، داخل انکوباتور قرار داده شده بود. سوسپانسیون حاوی اسپرم جهت بررسی پارامترهای اسپرم استفاده شد.

شمارش اسپرم

برای شمارش اسپرم ها از سوسپانسیون حاوی اسپرم، رقت ۱ به ۲۰ تهیه گردید. به این صورت که در یک میکروتیوب ۱ میلی لیتری، ۱۹۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته شد و سپس به آن ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی اسپرم افزوده شد. به منظور

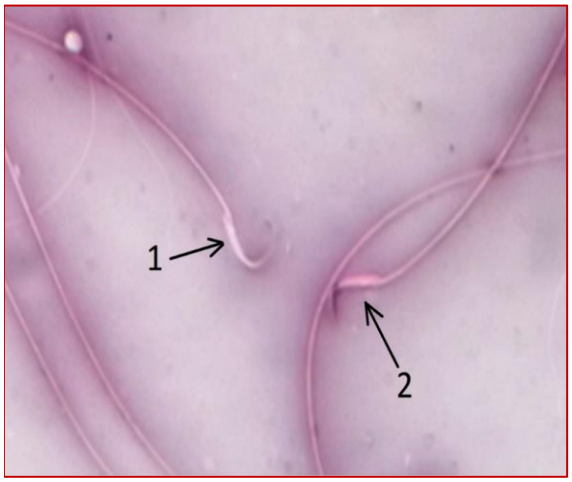
شمارش تعداد اسپرم از لام هموسیتومتر استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده اسپرم بر روی لام هموسیتومتر قرار گرفته و به مدت ۵ دقیقه بدون حرکت گذاشته شد تا تحرک اسپرم ها کاهش یابد. تعداد اسپرم ها در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول n ×۵۰۰۰۰× d و توسط میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۴۰۰X محاسبه گردید که n تعداد اسپرم های شمارش شده در ۵ ناحیه از محل شمارش لام هموسیتومتر و d عکس رقت سوسپانسیون حاوی اسپرم می‌باشد (۲۳).

ارزیابی تحرک اسپرم

ابتدا رقت ۱ به ۲۰ از سوسپانسیون حاوی اسپرم تهیه نموده برای ارزیابی تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی اسپرم مورد نظر را روی لام نئوبار که لامل سنگی بر روی آن قرار داده شده است گذاشته شد و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰X (۲۰۰X) درصد تحرک اسپرم ها بررسی گردید.(۲۳)

ارزیابی قابلیت زنده ماندن اسپرم

به منظور ارزیابی قدرت زیست پذیری اسپرم ها از رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی اسپرم روی یک لام تمیز با ۲۰ میکرولیتر محلول ائوزین مخلوط شد و پس از گذشت ۲۰ الی ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر محلول رنگی نگروزین به آن اضافه گردید. بعد از تهیه ی گسترش از محتویات لام و خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی۴۰۰X، درصد اسپرم های زنده (رنگ نگرفته) و مرده (رنگ صورتی) به دست آمد (۲۳) (شکل۱).



شکل ۱- نشان دهنده زیست پذیری اسپرم، (۱) سر اسپرم بی رنگ (سفید) اسپرم زنده و (۲) سر اسپرم رنگ گرفته (صورتی) اسپرم مرده را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی ائوزین نگروزین بزرگ نمایی ۴۰۰x

بررسی وضعیت بلوغ هسته اسپرم

برای این منظور از رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. اساس این رنگ آمیزی بر این مبنا استوار است که در طی مرحله ی اسپرمیوژنز، پروتامین در کروماتین هسته جایگزین هیستون می‌شود که این امر موجب تراکم و فشردگی کروماتین هسته اسپرم می‌شود. پس از تهیه گسترش از اسپرمی که از ناحیه دم اپی دیدیم استحصال گردید، لام ها در هوا خشک و ثبوت نمونه ها توسط ماده ثبوتی گلوتارالدئید ۳٪ در بافر فسفات ۰/۲ مولار(pH: ۷/۲) انجام شد. نمونه توسط محلول آنیلین بلو ۵٪ ترکیب شده با اسید استیک ۴٪ (pH:۳/۵) به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند، سپس لام ها مورد شستشو قرار گرفته و با میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ×۴۰۰ بررسی شدند. تعداد ۱۰۰ عدد اسپرم از هر لام شمارش و نتایج بر حسب درصد بیان شد. اسپرم های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی بوده و اسپرم های بالغ از رنگ پذیری کمتری برخوردار بودند (۲۳) (شکل۲).

بررسی آسیب DNA و یا DNA تک رشته ای

برای این منظور رنگ آمیزی آکریدین اورنج مورد استفاده قرار گرفت. در این روش رنگ آمیزی هنگام بررسی لام ها توسط میکروسکوپ فلورسنت، DNA سالم به رنگ سبز، DNA دو رشته ای ناپیوسته به رنگ زرد و DNA تک رشته ای به رنگ قرمز دیده می‌شود. پس از تهیه گسترش از سوسپانسیون حاوی اسپرم و خشک شدن در هوا ثبوت نمونه ها توسط محول کارنوی به مدت ۲ ساعت صورت گرفت و سپس رنگ آکریدین اورنج (AO) با غلظت ۰/۱۹ میلی گرم در بافر سیترات فسفات به مدت ۱۰ دقیقه برای رنگ آمیزی لام ها به کار رفت. پس از شستشو، لام ها توسط میکروسکوپ فلورسنت در یک محیط تاریک با فیلتر ۴۹۰-۴۵۰nm بررسی شدند و نتایج بر حسب درصد بیان شد (۲۳) (شکل۳).

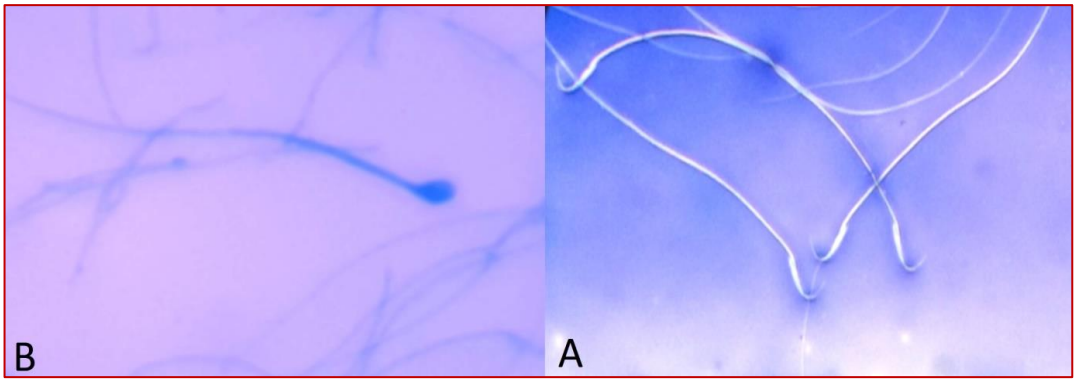
ارزیابی مورفولوژیک اسپرم ها

به وسیله دو روش رنگ آمیزی آنیلین بلو و ائوزین- نگروزین بررسی شدند. در این مطالعه میانگین تعداد اسپرم های طبیعی در گروه های مختلف مورد شمارش قرار گرفت.

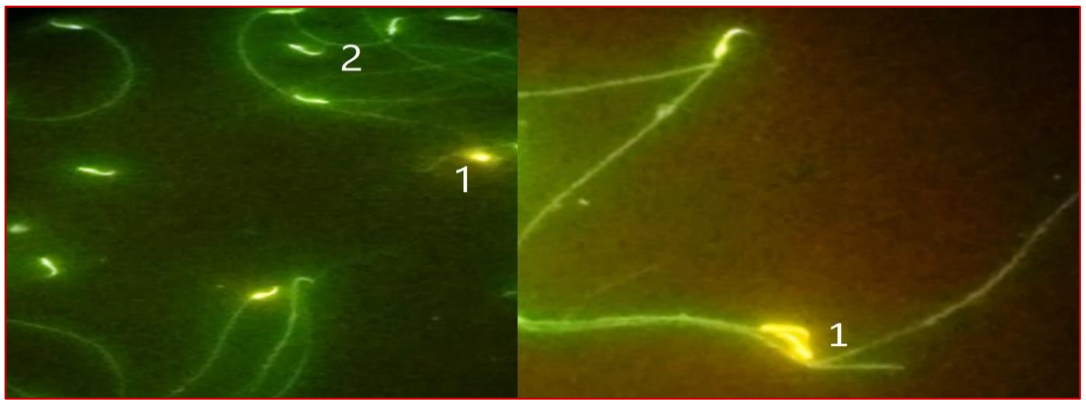
بررسی آماری

مقایسه آماری داده‌های حاصل از پارامترهای کیفیت اسپرم توسط نرم افزار آماری SPSS (Version 18; Inc.,

(Chicago, USA) و بـــه روش آماری آنووا یک طرفه و تست تعقیبی توکی در سـطح (P<۰/۰۵) مـورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل۲- نشان دهنده بلوغ کروماتین هسته اسپرم. سر اسپرم به رنگ سفید نشان دهنده وجود کروماتین بالغ (تصویر A) و سر اسپرم به رنگ آبی نمایان‌گر اسپرم با کروماتین نابالغ (تصویر B) می‌باشد. رنگ آمیزی آنیلین بلو، بزرگ نمایی ۴۰۰x



شکل۳- نشان دهنده آسیب DNA اسپرم. سر اسپرم با رنگ زرد نشان دهنده اسپرم با DNA آسیب دیده (۱) و سر اسپرم با رنگ سبز اسپرم سالم (۲) را نشان می‌دهد. رنگ آمیزی آکریدین اورنژ(AO)، بزرگ نمایی ۴۰۰x

نتایج

نتایج حاصل از شمارش میانگین تعداد اسپرم در ۳۵ روز بعد از عمل جراحی نشان داد که در گروه های T-D و T-D+DMEM نسبت به کنترل سالم و لاپاراتومی میانگین تعداد اسپرم به طور معنی دار (P<۰/۰۵) کاهش یافته که تزریق محیط کشت جداگانه فیبروبلاست و ماکروفاژ موجب افزایش معنی دار میانگین تعداد اسپرم نسبت به گروه های T-D و T-D+DMEM گردید (P<۰/۰۵)، ولی تزریق مایع محیط هم کشتی فیبروبلاست- ماکروفاژ تأثیری در افزایش میانگین تعداد اسپرم نسبت به گروه های T-D و T-D+DMEM نداشته و با آن گروه -ها فاقد اختلاف معنی دار بود (جدول ۱).

شمارش میانگین تعداد اسپرم های متحرک پیشرونده در این کار نشان داد که در گروه های T-D و T-D+DMEM نسبت به گروه های کنترل سالم و لاپارتومی به طور معنی دار کاهش یافته (P<۰/۰۵)، ولی در گروه های دریافت کننده جداگانه مایع محیط کشت فیبروبلاست و ماکروفاژ به طور معنی دار (P<۰/۰۵) نسبت به گروه های T-D و T-D+DMEM افزایش نشان داد (P<۰/۰۵). این افزایش در گروه ماکروفاژ تا اندازه گروه کنترل سالم نبود، ولی با آن گروه اختلاف معنی دار نشان نداد.

همانند پارامتر قبلی در این مورد نیز تزریق مایع محیط هم کشتی فیبروبلاست- ماکروفاژ فاقد تأثیر مثبت بوده و با گروه های T-D و T-D+DMEM فاقد اختلاف معنی دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه آماری پارامترهای مربوط به کیفیت اسپرم در بین گروه های مختلف کنترل و تجربی (میانگین ± انحراف معیار)

گروه آزمایشی	تعداد اسپرم (X/ ۱۰^۶)	تحرک اسپرم (٪)	قدرت زیست پذیری (٪)	اسپرم های طبیعی (٪)
کنترل سالم	۸۲/۲±۱/۰۴^b	۸۸±۵/۵۲^b	۹۳/۶±۳/۶۴^c	۹۶±۲/۳۴^c
لاپاراتومی	۷۴/۹±۱/۷۶^b	۷۸/۴±۷/۷۶^b	۹۰±۵/۱۴^{bc}	۹۳/۲±۴/۰۸^c
T-D	۰/۵۸±۱/۲۶^a	۹±۱۵/۳۱^a	۷/۸۳±۱۲/۱۷^a	۱۱/۶۶±۱۸/۱۱^{ab}
T-D+DMEM	۷/۶۳±۱/۰۵^a	۲۹±۱۹/۰۷^a	۲۸/۴±۱۹/۶۶^a	۳۸/۴±۲۲/۷۷^b
T-D+F	۶۷/۷±۲/۲۷^b	۷۱±۷/۳۹^b	۷۸/۷۵±۵/۸۵^{bc}	۸۳±۶/۶۸^c
T-D+M	۵۶/۳±۷/۷۶^b	۶۳±۶/۲۴^b	۶۹/۳۳±۸/۰۸^b	۷۲/۳۳±۷/۵^c
T-D+FM	۰/۶۶±۱/۱۵^a	۴±۶/۹۲^a	۵±۸/۶۶^a	۶±۱۰/۳۹^a

حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

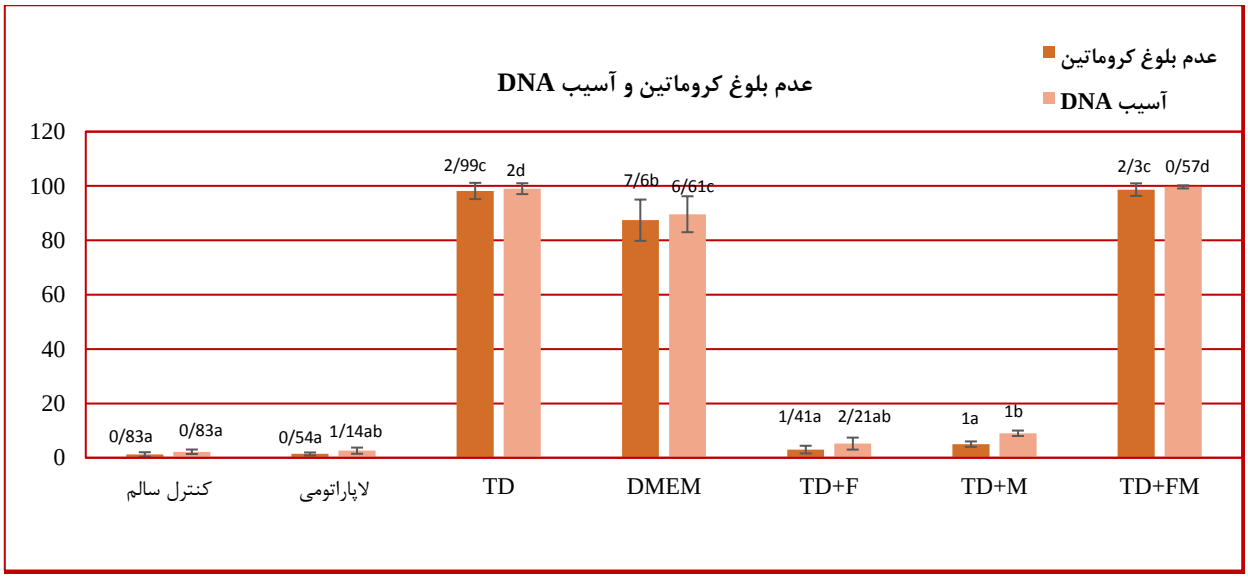
بررسی میزان زیست پذیری اسپرم نشان داد که در گروه های T-D و T-D+DMEM که در آن ها عمل پیچش- واپیچش بدون درمان صورت گرفته است نسبت به گروه های کنترل سالم و لاپاراتومی دارای کاهش معنی دار بود (P<۰/۰۵)، ولی در گروه های دریافت کننده مایع رویی محیط کشت فیبروبلاست و ماکروفاژ نسبت به گروه های T-D و T-D+DMEM افزایش معنی دار نشان داد (P<۰/۰۵)، که این افزایش در گروه فیبروبلاست تا حد کنترل سالم بوده و با آن گروه فاقد اختلاف معنی دار بود. در این پارامتر نیز استفاده از مایع رویی محیط هم کشتی فیبروبلاست- ماکروفاژ فاقد تاثیر مثبت بوده و با گروه های T-D و T-D+DMEM فاقد اختلاف معنی دار بود.

نتایج شمارش میانگین تعداد اسپرم های طبیعی از نظر شکل ظاهری نشان داد که در گروه های T-D و T-D+DMEM نسبت به گروه های کنترل سالم و لاپاراتومی تعداد اسپرم های طبیعی به طور معنی دار کاهش یافته و در گروه های فیبروبلاست و ماکروفاژ افزایش معنی داری در میانگین تعداد اسپرم های طبیعی نسبت به گروه های T-D و T-D+DMEM مشاهده گردید (P<۰/۰۵)، ولی گروه هم کشتی فیبروبلاست- ماکروفاژ افزایشی در میانگین تعداد اسپرم های طبیعی نسبت به گروه کنترل T-D مشاهده نشد و با آن گروه فاقد اختلاف معنی دار بود، ولی نسبت به گروه T-D+DMEM دارای اختلاف معنی بود (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

شمارش میانگین تعداد اسپرم های حاوی کروماتین نابالغ و DNA آسیب دیده نشان داد که در گروه هایT-D و T-D+DMEM نسبت به کنترل سالم و لاپاراتومی به طور معنی دار افزایش یافته، ولی در گروه های دریافت کننده مایع محیط کشت فیبروبلاست و ماکروفاژ به طور معنی دار نسبت به گروه های T-D و T-D+DMEM کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). در حالی که،

در گروه هم کشتی فیبروبلاست- ماکروفاژ میانگین تعداد اسپرم های حاوی کروماتین نابالغ وDNA آسیب‌دیده افزایش نشان داد، طوری که با گروه های T-D و T-D+DMEM فاقد اختلاف معنی دار بود (نمودار ۱).

شدیداً کاهش یافته در حالیکه CM فیبروبلاست و ماکروفاژ موجب افزایش تعداد اسپرم های زنده گردیدند و در این مورد نیز CM گروه هم کشتی سلول‌ها نتیجه ای مشابه گروه TD را نشان داد. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با مولکول های مجاور وارد



نمودار ۱- مقایسه آماری آسیب DNA و عدم بلوغ کروماتین در بین گروه های مختلف کنترل و تجربی
(میانگین±انحراف معیار) اعداد نوشته شده بالای ستون ها مقادیر انحراف معیار می‌باشد.
حروف نامشابه در هر ستون هم رنگ نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

بحث

آسیب بیضه ای مربوط به ایسکمی- رپرفیوژن به دلایل مختلف مثل: فتق مغابنی احتباسی، پیچش بیضه در دوران طفولیت اتفاق می افتد. علت اصلی آسیب بیضه بعد از ایسکمی تولید رادیکال های آزاد اکسیژن در حین رپرفیوژن می‌باشد. رادیکال های آزاد اکسیژن لیپیدهای غشایی، پروتئین ها و DNA را اکسید می کند که منجر به اختلال در عملکرد و گاهی اوقات مرگ سلولی می‌شود (۲۴). Saeid Azizollahi و همکاران جزئیات اطلاعات اثرات تورشن بیضه را بر روی پارامترهای بیضه ای و اپی دیدمی توضیح دادند، آن ها نشان دادند که تورشن می تواند سبب آزواسپرمی دائم در موش شود (۲۵). در مطالعه حاضر هیپوکسی ایجاد شده در ایسکمی ناشی از تورشن بیضه و برقراری مجدد گردش خون و متعاقب آن و افزایش رادیکالهای آزاد موجب پایین آمدن متابولیسم کلی سلول‌های بافت بیضه گردیده و در نهایت قدرت زیست پذیری اسپرماتوزوئید را کاهش داده و به همین دلیل در گروه‌های TD و TD+DMEM تعداد اسپرم‌های زنده

واکنش می شوند که آسیب ناشی از القا استرس اکسیداتیو را در ارگانل ها و مولکول های سلولی فعال می کند. در سال ۲۰۰۸Reda Z Mahfouz و همکاران، زیست پذیری، آپوپتوز و گونه‌های فعال اکسیژن در اسپرماتوزوآی انسان را قبل و بعد از القای استرس اکسیداتیو بررسی کردند. آن ها نتیجه گرفتند که سطوح داخل سلولی ROS احتمالاً بر روی کیفیت اسپرم از طریق اثراتش بر روی زیست پذیری اسپرم تاثیر می گذارد (۲۶). همچنین در مطالعه حاضر TD باعث شد که احتمالاً در عملکرد میتوکندری های اسپرماتوزوئید ها نیز اختلال ایجاد شده و در گروه‌های درمان نشده افت شدید تعداد اسپرم های متحرک مشاهده گردید در حالی‌که CM فیبروبلاستی و ماکروفاژی با داشتن فاکتورهای رشد موجب بازسازی ساختاری و افزایش توان آنتی اکسیدانتی سلول‌های سری اسپرماتوژنز گردیده و عملکرد میتوکندری را نیز بهبود بخشیدند. در پستانداران تحرک یکی از مهم ترین پارامترهای ارزیابی کیفیت مایع منی می‌باشد. حرکت تاژک اسپرم حاصل فعالیت ATP آز دینئین موجود در آکسونم وابسته به تولید ATP حاصل از گلیکولیز و فسفوریلاسیون

اکسیداتیو میتوکندریایی می‌باشد. در سال ۲۰۰۹ S Volpe و همکاران ارتباط بین تحرک و عملکرد میتوکندری در اسپرماتوزوآی گوشتخواران را بررسی کردند آن ها دریافتند که تنفس میتوکندریایی برای حفظ تحرک اسپرم نمی تواند کافی باشد اما احتمالاً برای بقای اسپرم در مجرای تناسلی جنس ماده مهم می‌باشد (۲۷). در سال ۲۰۱۰ Dolly J. Holt و همکاران سیگنال دهی سلول- سلول را در کشت هم زمان ماکروفاژها و فیبروبلاست ها در پاسخ به جسم خارجی را مورد بررسی قرار دادند. آن ها نتیجه گرفتند که کشت هم زمان ماکروفاژهای اولیه با فیبروبلاست محصول (Macrophage Chemotactic Protein- 1 MCP-1) را به طور معنی داری افزایش داد. TNF-α به عنوان یک فاکتور میتوژنی فیبروبلاستی می‌باشد که ممکن است منجر به سطوح بالای MCP-1 در کشت هم زمان شود. افزایش تولید MCP-1 منجر به تغییر فیبروبلاست به فنوتیپ فیبروتیکی می‌باشد به طوریکه فیبروبلاست های فیبروتیکی سبب افزایش تولید TNF-α القا شده توسط MCP-1 می‌شود (۲۸). هیپوکسی ناشی از تورشن و رادیکالهای آزاد ایجاد شده در اثر رپرفیوژن (برقراری مجدد گردش خون) باعث گردید که در مطالعه حاضر روند اسپرماتوژنز مختل شده و تولید اسپرم در طول دوره آزمایشی در گروه TD و TD+DMEM شدیداً نسبت به گروه های کنترل سالم و لاپاراتومی کاهش یابد ولی فاکتورهای رشد موجود در CM فیبروبلاستی و ماکروفاژی باعث گردید که تعداد اسپرم متعاقب TD افزایش یابد و این افزایش تا اندازه گروه های سالم بود، در حالیکه CM مربوط به گروه هم کشتی احتمالاً به علت داشتن TNF-α بالا در حد گروه TD بوده و با این گروه فاقد اختلاف معنی دار بود. تعداد ماکروفاژهای بافت بینابینی بیضه با توجه به سن در بیضه در نوسان می‌باشد. این ماکروفاژها اینترلوکین– ۱ (IL-1) و فاکتور نکروز توموری (TNF-α) را تولید می کنند . IL-1B سلول‌های بیشتری را برای ورود به سیکل سلولی و سنتز DNA بکار می گیرند. IL-1 a و TNF α همچنین به طور معنی دار سنتز DNA در سلول‌های لیدیگ را تحریک می کنند. بنابراین IL-1 ممکن است یک نقش مهم در پرولیفراسیون سلول‌های لیدیگ در حین تکامل پیش از بلوغ در رت های نابالغ بازی کند (۲۹). بنابراین به نظر می رسد که در مایع رویی حاصل از کشت تک ماکروفاژ، احتمالاً ماکروفاژها به واسطه‌ی ترشح اینترلوکین– ۱ (IL-1) و TNF-α در مرحله‌ی پیش از بلوغ در رت های نابالغ سبب تحریک سلول‌های لیدیگ و ترشح هورمون های دخیل در اسپرماتوژنز می‌شود و بهبود پارامترهای اسپرم می‌شود. اما در هم کشتی سلول ماکروفاژ با فیبروبلاست افزایش بیش از اندازه‌ی تولید دو فاکتور MCP-1 و TNF-α مترشحه سبب اثرات منفی بر روی پارامترهای اسپرم می‌شود. در سال ۱۹۸۵ JAMES B و همکاران اثر CM ماکروفاژ بیضه ای را پس از اضافه کردن به سلول‌های لیدیگ در شرایط آزمایشگاهی بررسی نمودند. آن ها نتیجه گرفتند که هم CM ماکروفاژ بیضه ای و هم ماکروفاژهای پریتونئالی اثر مثبت بر روی سلول‌های لیدیگ و تولید تستوسترون داشتند و از نظر آماری معنی دار بوده ولی اثر ماکروفاژهای پریتونئالی کم تر از ماکروفاژهای بیضه ای بوده است در سال ۲۰۱۵ Defalco و همکاران نقش ماکروفاژهای بیضه ای را نشان دادند. این سلول های ماکروفاژی در مجاورت سلول های پیشرو اسپرماتوگونی و در سطحی از لوله های سمینیفروس هستند که اسپرماتوگونی غیرمتمایز قرار دارند. آن ها دریافتند که این ماکروفاژها، فاکتورهای محرک تمایز و تکثیر از قبیل (CSF1) Colony – Stimulatig Factor 1 و آنزیم های درگیر در بیوسنتز رتینوئیک اسید

Retinoic Acid (RA) را بیان می کنند. تخلیه ماکروفاژها منجربه اختلال در تمایز اسپرماتوگونی ها می شود. این یافته، نقش غیرمنتظره ماکروفاژها در تمایز اسپرماتوگونی در بیضه را آشکار کرد (۳۱).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که هیپوکسی حاصل از تورشن و افزایش رادیکالهای آزاد روی جایگزینی پروتامین به جای هیستون در روند تراکم هسته اسپرم اختلال ایجاد کرده و به طور فاحش در گروه‌های TD و TD+DMEM و نیز گروه دریافت کننده CM هم کشتی سلول‌ها افزایش اسپرم های نابالغ را نشان داد و چون عدم تراکم هسته موجب آسیب پذیری DNA نیز می‌گردد تغییرات شکستگی DNA به موازات عدم بلوغ هسته در گروه‌های مذکور مشاهده گردید. در حالیکه، گروه‌های دریافت کننده CM فیبروبلاستی و ماکروفاژی دارای تعداد بسیار کم اسپرم های آسیب دیده از نظر بلوغ هسته و DNA بودند، طوری که میزان آنها تقریباً نزدیک به گروه‌های سالم بود. استرس های محیطی، موتاسیون های ژنی و ناهنجاری های کروموزومی همگی می توانند عوامل بیوشیمیایی موثر در اسپرماتوژنز را مختل نمایند که سرانجام منجر به ناهنجاری های ساختاری کروماتین گردد، که با فرآیند باروری ناسازگار می‌باشد (۳۲).

آنالیز معمولی مایع منی یک ارزیابی تقریبی از عملکرد درست اسپرماتوزوآ را نشان می‌دهد، اما همیشه کیفیت DNA اسپرم را منعکس نمی کند. Nasrin Sheikh و همکاران نشان دادند که آسیب های DNA اسپرم در مردان نابارور به طورمعنی داری نسبت به مردان بارور بالاتر می‌باشد و اسپرم هایی با ظاهر غیرطبیعی و سطوح پایین تحرک، ناهنجاری DNA بیشتری نسبت به اسپرم های متحرک و طبیعی دارند (۲۴). در این مطالعه اثرات بیولوژیکی ناشی از هیپوکسی و افزایش رادیکالهای آزاد موجب کاهش اسپرم هایی با شکل ظاهر طبیعی گردید در حالیکه تعداد اسپرم های طبیعی در گروه‌های دریافت کننده CM فیبروبلاستی و ماکروفاژی تا اندازه گروه‌های سالم افزایش نشان داد و با آن گروه‌ها فاقد اختلاف معنی دار بود. تغییرات مشاهده شده در رابطه با شکل ظاهری اسپرم ها، حرکت و زنده مانی آنها بی ارتباط با آسیب DNA و بلوغ هسته نمی‌باشد. فاکتورهای اتیولوژی مختلفی وجود دارد که در ارتباط با قطعه قطعه شدن DNA اسپرم بوده و به ساختار درست کروماتین آسیب می زند. علل آن از شرایط محیطی از قبیل سیگار(۳۳) ، اشعه (۳۴) و شیمی درمانی (۳۵) تا شرایط پاتوفیزیولوژی از قبیل لکوسیتواسپرمیا ، واریکوسل ها (۳۶) و سرطان (۳۷) می‌باشد. اثر بهبود بخشی CM فیبروبلاستی در مطالعه حاضر این است که سلول فیبروبلاست فاکتورهای رشد فیبروبلاستی متعددی را ترشح می کنند که این فاکتورهای رشد به واسطه ی علامت گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF receptors (FGFRs) طیف وسیعی از اعمال بیولوژیکی از جمله تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و تمایز را تنظیم می کند. مسیرهای علامت دهی FGF مسیرRAS/MAP kinase، PI3 kinase/AKT و PLCγ می‌باشد که در این میان مسیر RAS/MAP kinase به طور برجسته ای شناخته شده می‌باشد. مسیر اخیر، کینازهای پروتئینی فعال- میتوژنی (Mitogen-activated protein (MAP پروتئین کینازهای اختصاصی سرین/تریونین می باشند که به تحریک ماتریکس خارج سلولی (میتوژن ها) پاسخ می دهند و فعالیت های مختلف سلولی از قبیل بیان ژن، تقسیم میتوز، تمایز و بقا/آپوپتوز را تنظیم می کند(۳۸). فاکتور رشد (Fibroblast Growth Factor) FGFs یک نقش کلیدی در تنظیم رشد و تکامل اعضای تولید مثلی از جمله بیضه ها دارند در سال ۲۰۱۳ Xin Jiang و همکاران نقش و مکانیسم FGFs را در تکامل بیضه و درمان بیماری های بیضه مطرح نمودند و اثر درمانی آن را در کانسر بیضه و دیابت را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که سیگنال FGFs برای تعیین و تنظیم اعمالی چون تکامل، آنژیوژنز، هماتوپویزیس، تکثیرسلولی، تمایز و مهاجرت سلول‌ها به میزان زیادی حیاتی می باشند (۱۲). فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) یکی از فاکتورهای رشد مترشحه ی فیبروبلاستی می باشند که به عنوان واسطه ی اثر متقابل سلول– سلول در رشد و تکامل بررسی شدند و نقش بالقوه‌ی bFGF بر روی لوله های منی ساز شامل آنژیوژنز لوله ها، تکثیر سلول سرتولی اطراف لوله و واسطه ی اثرات متقابل سلول سرتولی– ژرمینال مورد توجه می‌باشد (۳۹). در سال ۲۰۱۴ Melissa Skibba و همکاران اثر حفاظتی و ممانعت کننده non-mitogenic acidic فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱ را بر روی مرگ سلول های بیضه ای موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین را بررسی نمودند. بیضه موش های دیابتی دچار کاهش وزن و افزایش آپوپتوز در سلول ها می شود. آن ها نشان دادند درمان این موش ها با non-mitogenic acidic فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱ کاهش وزن و آپوپتوز سلول های بیضه در این موش ها را کاهش می دهد. آن ها استفاده از این فاکتور را برای جلوگیری از مرگ سلول های بیضه ای در موش های دیابتی پیشنهاد نمودند (۴۰).

بنابراین، کشت جداگانه‌ی فیبروبلاست به واسطه ی فاکتورهای رشد متعدد از جمله bFGF و مسیرهای علامت دهی باعث بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم در شرایط پاتولوژیکی پس از تورشن می‌شود.

نتیجه‌گیری

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که مایع رویی حاصل از کشت جداگانه ی فیبروبلاست و ماکروفاژ به علت دارا بودن فاکتورهای رشد موثر در اسپرماتوژنز می تواند به طور معنی داری بهبود پارامترهای اسپرم به دنبال تورشن– دتورشن را افزایش دهد اما، مایع رویی حاصل از کشت هم زمان فیبروبلاست- ماکروفاژ تاثیری در بهبود پارامترهای اسپرم بعد از پیچش– واپیچش بیضه احتمالاً به علت داشتن عوامل التهابی ندارد.

با توجه به سهولت تهیه مایع رویی سلول، و عاری از سلول بودن آن مشکلات رد پیوند وجود ندارد. لذا امروزه استفاده از CM برای درمان بسیاری از بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است و ممکن است در آینده نزدیک به سرعت توسعه یابد.

بنابراین، مطالعات جهت استفاده از CM برای درمان بیماری های مختلف در حال جمع آوری می‌باشد. با توجه به بار سنگین مالی ناشی از درمان ناباروری و عوارض موجود در روش های درمانی، و خصوصیات فاکتورهای رشد ترشحی حاصل از سلول‌های فیبروبلاست و ماکروفاژها، مایع رویی حاصل از این دو رده سلولی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

عدم انجام آزمایش IVF جهت تکمیل ارزیابی پارامترهای اسپرم از محدودیت های این روش بوده است چون این مقاله حاصل بخشی از رساله ی دکترا بوده که به دلیل انجام تست های دیگر موجود در موضوع این بخش از کار انجام نشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از رساله ی دکترا با عنوان "اثرات مایع رویی حاصل از کشت جداگانه و هم زمان سلول‌های فیبروبلاست و ماکروفاژ بر روی اختلالات پارامترهای اسپرم القا شده به وسیله ی پیچش- واپیچش بیضه در رت های نر بالغ" می‌باشد که با حمایت بخش بافت شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه اجرا شده است. کد اخلاقی این مقاله AECVU-178-2018 می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1.Solaiman Afroughi MP. Prevalence and Risk Factors of Infertility in a Sample of Iranian Couples. J Biom Biostat. 2018;9(4).
2.Direkvand-Moghadam A, Delpisheh A, Khosravi A. Epidemiology of female infertility; a review of literature. Biosci Biotechnol Res Asia. 2013;10(2):559-67.
3. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. Clinics. 2013;68:15-26.
4.Kabay S, Ozden H, Guven G, Burukoglu D, Ustuner MC, Topal F, et al. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimental testicular torsion and detorsion injury. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 2014;18(4):321-6.
5.Fehér ÁM, Bajory Z. A review of main controversial aspects of acute testicular torsion. Journal of Acute Disease. 2016;5(1):1-8.
6.Pavlou MP, Diamandis EP. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? Journal of proteomics. 2010;73(10):1896-906.
7.Stastna M, Van Eyk JE. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. Proteomics. 2012;12(4-5):722-35.
8.Luo J, Yu L, Guo Y, Li M. Functional classification of secreted proteins by position specific scoring matrix and auto covariance. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2012;110(1):163-7.
9.Fukuoka H, Suga H, Narita K, Watanabe R, Shintani S. The latest advance in hair regeneration therapy using proteins secreted by adipose-derived stem cells. The American Journal of Cosmetic Surgery. 2012;29(4):273-82.
10. Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, et al. The relative contribution of paracine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. PloS one. 2013;8(3):e59020.
11. PANG Y-p, CHENG Y, HAO H-j, LIU J-j, Jing S. Infusion of mesenchymal stem cells culture supernatant ameliorates hyperglycemia disorders in STZ-induced diabetes mellitus rats. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army. 2015;40(6):449-53.
12. Jiang X, Skibba M, Zhang C, Tan Y, Xin Y, Qu Y. The roles of fibroblast growth factors in the testicular development and tumor. Journal of diabetes research. 2013;2013.
13. Kim Y, Bingham N, Sekido R, Parker KL, Lovell-Badge R, Capel B. Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(42):16558-63.
14. Lai M-S, Wang C-Y, Yang S-H, Wu C-C, Sun HS, Tsai S-J, et al. The expression profiles of fibroblast growth factor 9 and its receptors in developing mice testes. Organogenesis. 2016;12(2):61-77.
15. Mossadegh-Keller N, Gentek R, Gimenez G, Bigot S, Mailfert S, Sieweke MH. Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. Journal of Experimental Medicine. 2017;214(10):2829-41.
16. Wang M, Fijak M, Hossain H, Markmann M, Nüsing RM, Lochnit G, et al. Characterization of the micro-environment of the testis that shapes the phenotype and function of testicular macrophages. The Journal of Immunology. 2017;198(11):4327-40.

17. Ikebuaso AD, Yama OE, Duru F, Oyebadejo S. Experimental testicular torsion in a rat model: effects of treatment with Pausinystalia macroceras on testis functions. Journal of reproduction & infertility. 2012;13(4):218.
18. Mirzaei M, Bayat M, Mosafa N, Mohsenifar Z, Piryaei A, Farokhi B, et al. Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. Photomedicine and laser surgery. 2007;25(6):519-25.
19. Jeong D, Han C, Kang I, Park HT, Kim J, Ryu H, et al. Effect of concentrated fibroblast-conditioned media on in vitro maintenance of rat primary hepatocyte. PloS one. 2016;11(2):e0148846.
20. Zeng Q, Chen W. The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin–oxidized alginate hydrogel. Biomaterials. 2010;31(22):5772-81.
21. Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. Neurological sciences. 2002;23(4):189-94.
22. Watanabe S, Ogura N, Akutsu M, Kawashima M, Hattori T, Yano T, et al. Pro-inflammatory Cytokine Production in Co-culture of Human Monocytes and Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint. International Journal of Oral-Medical Sciences. 2017;15(3-4):107-13.
23. World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen2010. p.21-157.
24. Sheikh N, Amiri I, Farimani M, Najafi R, Hadeie J. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2008;6(1):13-8.
25. Azizollahi S, Aflatoonian R, Sedigi-Gilani MA, Jafarabadi MA, Behnam B, Azizollahi G, et al. Recruiting testicular torsion introduces an azoospermic mouse model for spermatogonial stem cell transplantation. Urology journal. 2014;11(3):1648-55.
26. Mahfouz RZ, du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. Fertility and sterility. 2010;93(3):814-21.
27. Volpe S, Leoci R, Aiudi G, Lacalandra G. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. Reproduction in domestic animals. 2009;44:275-8.
28. Holt DJ, Chamberlain LM, Grainger DW. Cell–cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts. Biomaterials. 2010;31(36):9382-94.
29. Khan SA, Khan SJ, Dorrington JH. Interleukin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in immature rat Leydig cells in vitro. Endocrinology. 1992;131(4):1853-7.
30. YEE JB, HUTSON JC. Effects of testicular macrophage-conditioned medium on Leydig cells in culture. Endocrinology. 1985;116(6):2682-4.
31. DeFalco T, Potter SJ, Williams AV, Waller B, Kan MJ, Capel B. Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. Cell reports. 2015;12(7):1107-19.
32. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. Journal of assisted reproduction and genetics. 2010;27(1):3-12.
33. Potts R, Newbury C, Smith G, Notarianni L, Jefferies T. Sperm chromatin damage associated with male smoking. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1999;423(1):103-11.
34. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. Human reproduction update. 2001;7(4):394-403.
35. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment 1. International journal of andrology. 2002;25(5):255-61.
36. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertility and sterility. 2003;79:1597-605.
37. Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, et al. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertility and sterility. 2001;75(3):469-75.
38. Yun Y-R, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. Journal of tissue engineering. 2010;1(1):218142.
39. Mullaney BP, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. Endocrinology. 1992;131(6):2928-34.
40. Skibba M, Zhang C, Jiang X, Xin Y, Cai L. Preventive effect of non-mitogenic acidic fibroblast growth factor on diabetes-induced testicular cell death. Reproductive Toxicology. 2014;49:136-44.

Original Article

The Effects of Fibroblast and Macrophage Separated and Co-Culture Conditioned Medium on Sperm Parameters Disorders Induced by Testicular Torsion-Detorsion in Adult Rats

Mirzaei M [1], Shahrooz R [1*], Shalizar Jalali A [1] , Sarrafzadeh-Rezaei F [2], Mosaffa N [3]

1. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Department of Surgery and Diagnostic Imaging, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Department of Immunology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 12 Feb 2019 Accepted: 10 Jun 2019

Abstract

Background & Objective: Ischemia and Reperfusion (I/R) lead to the production of excessive reactive oxygen species (ROS). In the present study, the protective effects of the cell culture conditioned medium (CM) on sperm quality disorder induced by torsion-detorsion (T-D) in adult rat's testis was evaluated.

Materials & Methods: In this study, 42 adult rats were divided into seven groups. 1- Normal control group treated without surgery. 2- Laparotomy group, surgery operated without T-D. 3- T-D group, surgery operated along with T-D. 4- T-D+DMEM group, after T-D Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) has been injected. 5-7 groups included T-D+F, T-D+M, and T-D+FM, along with T-D injected conditioned medium of fibroblast, macrophage, and fibroblast-macrophage co-culture respectively. All injections were made at a rate of 10µL once after T-D in the rete testis. After 35 days, sperm quality parameters were evaluated and obtained data were compared between groups by one-way ANOVA statistic method and Tukey test post hoc at $P<0.05$ level.

Results: The experimental groups that received CM of the fibroblast and macrophage compared to groups T-D and T-D+DMEM showed ameliorative effects in comparison with T-D and T-D+DMEM groups. No ameliorative effects were observed in the T-D+FM group.

Conclusion: The results of this study showed the high ability of supernatant of the separate fibroblast and macrophage culture in improving sperm parameters after testicular T-D.

Keywords: Testicular torsion-detorsion, Fibroblast, Macrophage, Sperm quality, Rat

***Corresponding Author: Shahrooz Rasoul,** Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: r.shahrooze@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-1470-010X