JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۱۸۶-۱۸۱

مطالعه تغییرات هیستولوژیک بیضه موش سوری تیمار شده با جنتامایسین به صورت داخل بیضه‌ای

وحید اکبر نژاد[۱]، پرویز تاجیک[۱]، منصوره موحدین[۳]، رضا یوسفی[۱،۲،*]، نیلوفر حاج صادقی[۱]

۱. گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. انجمن علمی دانشجویی مامایی و بیماریهای تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۳. گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:* **v_akbarinejad@ut.ac.ir

چکیده

متوقف کردن و حذف روند اسپرماتوژنز خودی در گیرنده یکی از مراحل اصلی در روند پیوند سلولهای بنیادی اسپرماتوگونیال می‌باشد. نتایج مطالعات حاکی از آثار سمی جنتامایسین بر تزاید و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تأثیر جنتامایسین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال جهت ایجاد آزواسپرمی در موش به انجام رسید. تعداد ۱۲ سر موش نر بالغ به صورت تصادفی در سه گروه آزمایشی قرار گرفتند: در گروه شاهد، موش‌ها هیچگونه تیماری دریافت نکردند. در گروه شاهد تزریق، موش‌ها به میزان ۰/۰۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به صورت داخل بیضه‌ای دریافت کردند. در گروه درمان، موش‌ها به میزان ۰/۰۲ میلی لیتر جنتامایسین با غلظت ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر به صورت داخل بیضه‌ای دریافت کردند. ۲ ماه پس از انجام تزریقات، بیضه‌ها برداشت شده وزن آنها ثبت و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت، مقطع گیری، رنگ آمیزی و در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند. تفاوتی بین گروه‌ها در رابطه با وزن بیضه‌ها و تلفات وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). علیرغم کاهش سلول‌های رده جرم در بیضه موش‌های دریافت کننده‌ی سرم فیزیولوژی و جنتامایسین، اسپرماتوژنز تا رده‌ی اسپرم‌های بالغ همچنان ادامه داشت و تفاوت هیستوپاتولوژیک مشهودی بین این دو گروه مشاهده نشد. در نتیجه، مطالعه حاضر نشان داد که تزریق داخل بیضه‌ای جنتامایسین نمی‌تواند به عنوان یک روش مطمئن جهت ایجاد آزواسپرمی در موش به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: جنتامایسین، آزواسپرمی، موش

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 5(3)181-186, 2014

A study on histological changes of testis in mice treated with intratesticular gentamicin

Akbarnejad, V.,[1] Tajik, P.,[1], Movahedin[3], M., Youssefi, R.,[1,2,*], Haj Sadeghi, N.[1]

1. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

2. Theriogenology Association, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**** Corresponding author:*** **v_akbarinejad@ut.ac.ir**

Abstract

Arrestment of spermatogenesis in the recipient is an important step in spermatogonial stem cell transplantation. Studies have shown toxic effects of gentamicin on proliferation and differentiation of bone marrow stem cells. The present study was conducted to evaluate the effect of intratesticular administration of gentamicin on induction of azospermia in mice. Twelve male mice were randomly assigned to three experimental groups: in control group, the mice received no treatment. In saline group, the mice received 0.02 ml saline intratesticularly. In gentamicin group, the mice received 0.02 ml gentamicin (40 mg/ml) intratesticularly. Two months after treatment, the testes were removed and their weight was recorded. Then, the specimens were fixed in 10% formalin solution, stained and evaluated using light microscope. There was no difference among experimental groups in testicular weight and mortality ($P > 0.05$). Although germ cells were depleted in saline and gentamicin groups, spermatogenesis was not arrested in none of these groups based on histopathological examination. In conclusion, the results indicated that intratesticular administration of gentamicin might not serve as an effective method for induction of azospermia in mice.

Key words: Gentamicin, Azoospermia, Mouse

مقدمه

سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه تنها سلول‌های بنیادی بدن هستند که قدرت خود افزایی و انتقال ژن به نسل‌های بعد را دارند (۲ و ۱). این سلول‌ها در طول حیات مرتباً تقسیم شده و با تولید اسپرماتوزوئیدها قدرت باروری جنس نر را حفظ می‌کنند (۲ و ۱). تکنیک پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک روش مطمئن برای تأیید بنیادی بودن این سلول‌ها و از طرفی مقدمه‌ای برای اصلاح نژاد دام‌ها و تولید حیوانات ترانس ژنیک و همچنین حفظ گونه‌های در معرض خطر انقراض می‌باشد. در مقایسه با سایر روش‌های ایجاد حیوانات ترانس ژنیک مانند انتقال هسته و دستکاری سلول‌های بنیادی رویانی، روش دستکاری ژنتیکی و انتقال سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال ساده‌تر و کارآمدتر می‌باشد. به منظور موفقیت در پیوند سلولهای اسپرماتوگونیال در ابتدا می‌بایست این سلولها را در شرایط آزمایشگاه جداسازی کرد، که مطالعات متعدد در موش نشان دهنده این مطلب است که کشت سلول‌های اسپرماتوگونیال در محیط مناسب به همراه استفاده از سلول‌های تغذیه کننده‌ی مناسب و با افزودن فاکتورهای رشد ضروری پیش از پیوند سبب بهبود موفقیت پیوند و افزایش کلونی زایی می‌شود (۴ و ۳). هرچند که سلولهای پیوند زده شده می‌توانند در بیضه گیرنده پیوند جایگزین شوند، اما میزان موفقیت به خالی بودن فضای بین سلولهای سرتولی در فرد گیرنده دارد و یکی از مراحل اصلی در موفقیت پیوند سلولهای بنیادی اسپرماتوگونیال متوقف کردن و حذف روند اسپرماتوژنز خودی می‌باشد تا امکان جایگزینی سلولهای بنیادی در بازال لامینا وجود داشته باشد (۷ و ۵،۶).

جنتامایسین به دسته آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی تعلق دارد. مشاهده شده است که جنتامایسین آثاری سمی بر تزاید و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارد (۸). بنابراین مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تأثیر جنتامایسین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال جهت ایجاد آزواسپرمی در موش طراحی شد و به انجام رسید.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی تعداد ۱۲ سرموش سوری نر بالغ نژاد Balb/c ۱۰ هفته از پژوهشکده ژنتیک تهیه شد و به منظور سازگاری حیوانات با شرایط محیطی یک هفته در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در شرایط آزمایشگاهی استاندارد (۲۱ تا ۲۷درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد) با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. موش‌ها دسترسی آزاد به غذا به صورت پلیت و آب آشامیدنی سالم داشتند و در بستر پوشال که یک بار در هفته بسترشان تعویض می‌شد نگهداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی در سه گروه آزمایشی قرار گرفتند: در گروه یک (شاهد)، موش‌ها هیچگونه تیماری دریافت نکردند. در گروه دو (شاهد تزریق)، موش‌ها به میزان ۰/۰۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به صورت داخل بیضه‌ای دریافت کردند. در گروه سه (درمان)، موش‌ها به میزان ۰/۰۲ میلی لیتر جنتامایسین با غلظت ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر به صورت داخل بیضه‌ای دریافت کردند. جهت تزریق داخل بیضه‌ای دارو در گروه دو و سه، موش‌ها تحت بیهوشی عمومی (با داروی کتامین و آسه پرومازین) قرار گرفتند و تزریق با سرنگ انسولین با سر سوزن شماره ۳۱ انجام گرفت. ۲ ماه پس از انجام تزریقات، بیضه‌ها جدا شده و در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. قبل از تثبیت بافتی، وزن بیضه‌ها

اندازه گیری و ثبت شد. سپس از نمونه‌ها مقاطع بافتی تهیه و با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

داده‌های وزن بیضه‌ها با استفاده از دستور GLM و تحلیل آماری داده‌های مربوط به تلفات با استفاده از رگرسیون لوجستیک و دستور GENMOD در نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۲ به انجام رسید (۹).

نتایج:

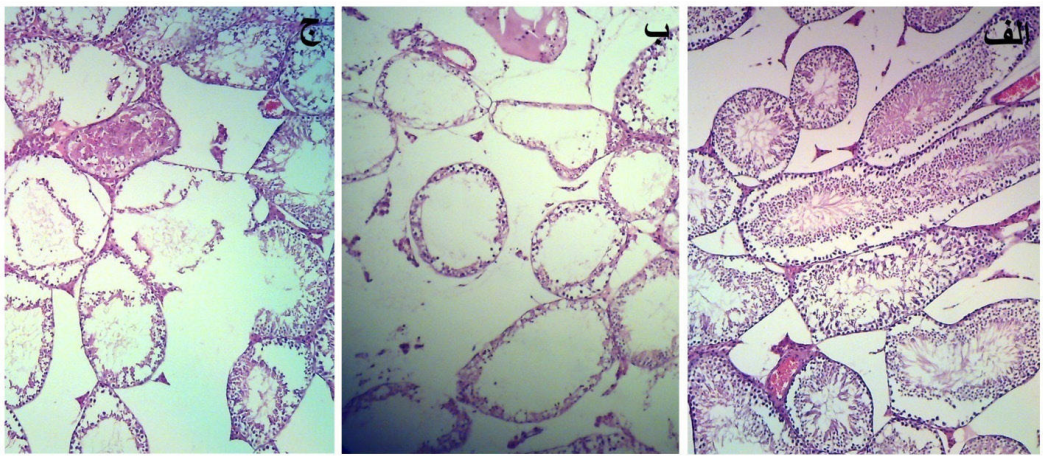
نتایج مطالعه نشان داد که وزن بیضه در بین گروه‌ها تفاوت معناداری نداشت (جدول ۱؛ $P > ۰/۰۵$).

جدول ۱- وزن بیضه موش‌ها در گروه‌های آزمایشی شاهد، شاهد تزریق و درمان با جنتامایسین دو ماه پس از شروع آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین ارائه شده‌اند.

گروه	وزن بیضه (گرم)
شاهد	۰/۱۰۸ ± ۰/۰۰۵
شاهد تزریق	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۰۵
درمان جنتامایسین	۰/۰۹۸ ± ۰/۰۰۵

در هیچ یک از گروه‌ها تلفات مشاهده نشد و تفاوتی بین گروه‌ها در رابطه با تلفات وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$).

بیضه موش‌های گروه شاهد محتوی لوله‌های سمینیفروس با اسپرماتوژنز نرمال و تمامی رده‌های سلولی تا اسپرم‌های بالغ بود (شکل ۱-الف). در بیضه موش‌های گروه شاهد تزریق کاهش سلول‌های رده جرم مشاهده گردید اما اسپرماتوژنز تا رده‌ی اسپرم‌های بالغ همچنان ادامه داشت (شکل ۱-ب). در بیضه موش‌های گروه جنتامایسین همانند بیضه موش‌های گروه شاهد تزریق کاهش سلول‌های رده جرم و اسپرماتوژنز محدود تا رده‌ی اسپرم‌های بالغ مشاهده شد. به علاوه، شواهد نکروز ایسکمیک در بیضه موش‌های گروه جنتامایسین مشاهده شد (شکل ۱-ج).



شکل ۱- مقاطع هیستوپاتولوژی بیضه موش گروه شاهد (الف)، شاهد تزریق (ب) و درمان جنتامایسین (ج) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰.

بحث:

با توجه به اهمیت ایجاد آزواسپرمی در گیرنده‌های پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تیمار داخل بیضه‌ای جنتامایسین در ایجاد آزواسپرمی در موش به انجام رسید. علیرغم نکروز ایجاد شده در بیضه‌های تیمار شده با جنتامایسین، اسپرماتوژنز در این دسته از بیضه ها، هر چند به صورت محدود، همچنان ادامه داشت. بنابراین، جنتامایسین احتمالاً نمی‌تواند به عنوان یک داروی مؤثر جهت ایجاد آزواسپرمی در موش‌های گیرنده‌ی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال عمل کند. به علاوه، عدم تفاوت چشمگیر میان موش‌های دریافت کننده‌ی جنتامایسین و سرم فیزیولوژی مبین این مطلب است که احتمالاً ضایعات ایجاد شده به واسطه تزریقات داخل بیضه‌ای و نه به دلیل اثر اختصاصی جنتامایسین حاصل شده اند. در این زمینه، تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان با جنتامایسین نشان داده بود که علیرغم تأثیر منفی بر رشد و تمایز این سلول ها، جنتامایسین اثری بر زنده مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان نداشت (۸).

بر خلاف جنتامایسین، بوسولفان، که یک داروی شیمی درمانی می‌باشد، سلولهایی که با سرعت در حال تکثیر هستند را نابود می‌کند و با موفقیت به منظور ایجاد آزواسپرمی در جوندگان قبل از پیوند به کار گرفته شده است (۱۱ و ۵،۶،۷،۱۰).

در نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که تزریق داخل بیضه‌ای جنتامایسین علیرغم اثر تخریبی بر سلول‌های رده جرم بیضه، نمی‌تواند به عنوان یک روش مطمئن جهت ایجاد آزواسپرمی در موش به کار گرفته شود.

References

1. Dobrinski, I. (2006): Transplantation of germ cells and testis tissue to study mammalian spermatogenesis. Anim. Reprod. 3: 135-145.

2. Oatley, J.M., Brinster, R.L. (2008): Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 24: 263-286.

3. Kubuta, H., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (2004): Growth factors essential for self renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cell. PNAS. 101: 16489-16494.

4. Kubota, H., Brinster, R.L., (2008): Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. Methods Cell Biol. 86: 59-84.

5. Brinster, R.L., Avarbock, M.R. (1994): Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. PNAS. 91: 11303-11307.

6. Brinster, R.L., Zimmerman, J.W. (1994): Spermatogenesis following male germ cell transplantation. PNAS. 91: 11298-11302.

7. Brinster, C.J., Ryn, B.Y., Avarbock, M.R., Karagenc, L., Brinster, R.L. (2003): Restoration of fertility by germ cell

transplantation requires efficient recipient preparation. Biol. Reprod. 69: 412-420.

8. Chang, Y., Goldberg, V.M., Caplan, A.I. (2006): Toxic effects of gentamicin on marrow-derived human mesenchymal stem cells. Clin. Orthop. Relat. Res. 452: 242-249.

9. SAS Institute Inc., (2008): Statistical Analysis System: A User's Guide, version 9.2. Cary, NC.

10. Moisan, A.E., Foster, R.A., Betteridge, K.J., Hahnel, A.C. (2003): Dose-response of RAG2−/−/γc−/mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. Reproduction. 126: 205-216.

11. Ogawa, T., Dobrinski, I., Brinster, R.L. (1999): Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. Tissue Cell. 31: 461-472.