قابل چاپ است

بررسی تغییرات هورمونی، بیومتری و بافت‌شناسی بیضهٔ قوچ متعاقب عمل پیوند آلوگرافت

آیتک بخشایش‌خیابانی[۱]، غلامعلی مقدم[۲*]، بابک قاسمی‌پناهی[۳]، حسین دقیق‌کیا[۲]، آرش جوانمرد[۳]

۱- دانشجوی دکتری علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

سلول‌های بنیادی، سلول‌های غیرتمایزیافته‌ای با قابلیت تبدیل به تمام سلول‌های تخصص‌یافته هستند که وجود آن‌ها برای حیات فرد ضروری است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی هورمونی، بیومتری و بافت‌شناسی بیضه بعد از پیوند آلوگرافت در قوچ بود. بدین منظور در مجموع از تعداد ۲۰ رأس برهٔ نر نژاد قزل به عنوان دهنده و گیرنده سلول و همچنین برای تایید تاثیر تاموکسیفن و شاهد استفاده شد. آزواسپرمی در هر دو بیضه بره‌های گیرنده ایجاد شده و سلول‌های بنیادی از بافت چربی بره‌های دهنده استخراج و کشت داده شد. انتقال سلول‌ها در هر دو بیضه صورت گرفت. محیط اسکروتوم و ابعاد بیضه در مراحل قبل و بعد از آزواسپرمی و بعد از پیوند اندازه‌گیری شد. خون‌گیری از گوسفندان هم در ۳ مرحله انجام شد. ۴۹ روز بعد از پیوند، یکی از بیضه‌های گوسفندان برداشت شده و به آزمایشگاه بافت‌شناسی منتقل گردید. بالاترین و پایین‌ترین اندازه محیط اسکروتوم به ترتیب مربوط به گروه کنترل در ۹ ماهگی (۳۵/۳۲ سانتی‌متر) و گروه تیمار در ۷ ماهگی بود که تفاوت آماری معنی‌دار داشتند (p<۰/۰۵). اثر اعمال فاکتور، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل تیمار و زمان، بر تمامی صفات مورد مطالعه نیز معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). همچنین القای آزواسپرمی با استفاده از تاموکسیفن منجر به تخریب شدید بافت پوششی زایا در لوله‌های اسپرم‌ساز شد. چون پیوند سلول‌های بنیادی منجر به القای موفقیت‌آمیز اسپرم‌زایی در لوله‌های اسپرم‌ساز گوسفندان آزواسپرم شد، لذا، می‌توان از عمل فوق برای انتقال سلول‌های بنیادی از دام برتر به عنوان پایه دهنده به جهت تولید اسپرم فعال در حیوان دیگری از همان گونه استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: بیضه، پیوند آلوگرافت، سلول‌های بنیادی چربی، قوچ، تغییرات هورمونی.

مقدمه

نقایص مادرزادی، ناهنجاری‌های ژنتیکی، بیماری‌های عفونی، اختلالات غدد درون ریز و قرار گرفتن در معرض گنادوتوکسین‌ها از علل مختلف آزواسپرمی است (Oryan *et al*., 2008; Berookhim and Schlegel, 2014). امروزه،

برای درمان ناباروری مردان پیوند سلول معرفی شده است (O'brien *et al*., 2010). بین روش‌های مختلف سلول درمانی، پیوند سلول‌های بنیادی برای بازیابی عملکرد و ساختار اندام‌ها یا بافت‌ها به یک استراتژی درمانی جدید تبدیل شده است (Zhang *et al*., 2014). سلول‌های بنیادی به وسیله دو خصوصیات شناسایی می‌شوند: خود تجدیدکنندگی و توانایی تمایز. انواع مختلف سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی جنینی یا سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده کاندید درمان سلول‌های بنیادی هستند، اما سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایمن‌ترین روش می‌باشد و به راحتی نیز در دسترس می‌باشد (Rahmanifar *et al*., 2016). سلول‌های بنیادی مزانشیمی تقریباً از هر اندامی از جمله چربی، کبد، طحال، لوزالمعده، کلیه، ریه، عضله و مغز جدا می‌شوند (Lin *et al*., 2012). با این حال، سلول‌های بنیادی مغز استخوان و بافت‌های چربی به دلیل توانایی تمایزشان به استخوان، چربی، غضروف، عضله، سلول‌های عصبی، سلول-های کبدی، سلول‌های تولیدکننده انسولین و پوست در شرایط مناسب داخل بدن، به ترتیب پتانسیل بیشتری برای ترمیم بافت دارند (Zhang *et al*., 2014; Kazemi *et al*., 2016). از جمله مزایای استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی، سهولت دسترسی و برداشت آن به وسیله روش‌هایی است که نسبت به برداشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان درد بسیار کمتری دارد (Mehrabani *et al*., 2015).

جداسازی سلول‌های بنیادی و پیوند آن‌ها به عدم انقراض حیوانات کمک خواهد کرد مخصوصاً اگر حیوانی با ارزش ژنتیکی بالا باشد، اهمیت این مسئله دوچندان خواهد شد. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌توانند برای مدت طولانی و بدون از بین رفتن ظرفیت تمایز آن‌ها در محیط کشت نگهداری شوند و گسترش یابند و منجر به استفاده فزاینده مقادیر زیادی سلول در اهداف سلول درمانی شوند(Mehrabani *et al*., 2015) .

با توجه به مطالب ذکرشده، هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی هورمونی، بیومتری و بافت شناسی بیضه قوچ بعد از پیوند آلوگرافت بود.

مواد و روش‌ها

- **حیوانات استفاده‌شده:** در طرح پژوهشی حاضر از تعداد ۲۰ رأس برهٔ نر نژاد قزل ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز استفاده‌گردید که در طی آن ۵ رأس به عنوان دهنده سلول، ۵ رأس به عنوان گیرنده سلول، ۵ رأس برای تایید آزوسپرمی (ارزیابی تاثیر تاموکسیفن) و ۵ رأس هم به عنوان شاهد در نظر گرفته‌شدند. لازم به ذکر است که بره-های مذکور ۲ ماهه بوده و وزن مشابه داشتند و از بین ۹۰ رأس به صورت ساده تصادفی انتخاب شدند.

- **القای آزواسپرمی:** آزواسپرمی در هر دو بیضه تعداد ۱۰ رأس از بره‌ها (گیرنده) با استفاده از داروی تاموکسیفن (ایران هورمون، ایران) خوراکی با دوز ۶۷۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن، به مدت ۴۰ روز القا شد (Olfati *et al*., 2018). بیضه‌های ۵ راس برای تایید آزواسپرمی به روش جراحی درآورده‌شده و به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی ارسال گردید و از محلول فرمالین بافر (آرمان سینا، ایران) ۱۰ درصد برای تثبیت آن‌ها استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی تمام مقاطع بافتی مربوط به بیضه، از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (مرک، آلمان) استفاده شد و

تغییرات مورفولوژیکی مورد نظر با استفاده از بزرگنمایی‌های x۱۰ و x۴۰ میکروسکوپ نوری (المپیوس، ژاپن)، توسط متخصص بافت‌شناسی، ارزیابی شد (Olfati *et al*., 2018).

- **آماده‌سازی سلول‌ها برای انتقال**: از بافت چربی ۵ راس بره نر به عنوان دهنده سلول، به طریق بیوپسی نمونه‌گیری شده و در ادامه عمل جداسازی و کشت انجام گردید. بدین منظور ابتدا هر نمونه چندین بار با PBS (Phosphate buffered solution) حاوی ۱ درصد پنی‌سیلین+ استرپتومایسین برای حذف سلول‌های مرده و گلبول‌های قرمز خون شست‌وشو داده شد و در ادامه با قیچی به قطعات ریز تقسیم گردیده و با استفاده از آنزیم کلاژنازII (سیگما، آلدریچ)، به مدت یک شب هضم شد. سپس مواد رویی حاصله دور ریخته شد و پلت سلولی بدست آمده در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) شرکت سیگما آلدریچ و ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) شرکت سیگما آلدریچ شناور شد. در ادامه سلول‌ها در فلاسک‌های کشت ریخته‌شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و حضور ۵ درصد CO_2، در دستگاه گرمخانهٔ مرطوب، گرمخانه‌گذاری شدند. لازم به ذکر است که هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت فوق تعویض می‌گردید و سلول‌های نچسبیده به فلاسک محیط کشت، حذف می‌شدند. در نهایت هم تایید ماهیت سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی به وسیله میکروسکوپ نوری معکوس (نیکون، ژاپن) و فلوسیتومتری انجام شد (Mohebbi *et al*., 2023).

ابتدا سلول‌ها تریپسینه شده و با PBS در سانتریفیوژ ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شده و سپس ۱×۱۰^{۶} سلول در PBS λ100 شناور خواهند شد. آنتی‌بادی‌های کونژوگه فلوروکروم مناسب شامل CD44، CD90 و CD31 به هر لوله اضافه خواه شد. لوله‌ها در دمای اتاق و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شده و با ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به دور ریخته شده و PBS400 λ به همه‌ی لوله‌ها اضافه شد. آنتی‌ژن‌های سطحی سلول توسط فلوسیتومتری آنالیز شد

- **پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به بیضه بره‌های گیرنده**

ابتدا سلول‌های حاصله در مرحله قبل با استفاده از PBS دو بار شستشو داده شدند و سپس با استفاده از تریپسین (گیبکو، کانادا)، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و به مدت ۲ دقیقه گرمخانه‌گذاری (۳۷ درجه سانتی‌گراد) شدند. اثر تریپسین بلافاصله با استفاده از FBS خنثی شد و سپس عمل سانتریفیوژ (بهداد، ایرانی) با دور ۱۸۰۰rmp به مدت ۸ دقیقه انجام گردید. پلت به دست آمده با محلول DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) مخلوط شد و نهایتا سلول‌های مورد نظر با غلظت نهایی ۴۵×۱۰^{۶}–۴۶ cells/ml برای پیوند به بیضه گوسفند گیرنده آماده گردیدند (Mohebbi *et al*., 2023). انتقال سلول‌های بیضه به شبکه عروقی بیضه گیرنده‌ها تحت شرایط بیهوشی و آسپتیک انجام شد. قبل از عمل، در طول شب، به گوسفند گیرنده غذا و آب داده نشد. بیهوشی موقت با استفاده از زایلازین (mg/kg ۲) انجام شد و پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی با استفاده از پروب سونوگرافی به شبکه عروقی بیضه گوسفندان انجام شد. هدایت سوزن CSF (Cerebro-spinal fluid) در بافت بیضه در سونوگرافی با پروب اولترا اسکن ۹۰۰ MHz5 مشخص گردید و تعداد ۳۰×۱۰^{۶} سلول بنیادی مزانشیمی چربی با استفاده از سر سوزن نمره ۱۸ و طول ۱۲ سانتیمتر (سوزن CSF) درمدت ۵ دقیقه وارد شبکه عروقی بیضه گوسفند گیرنده، شد (Mohebbi *et al*., 2023).

- **مطالعه بیومتریک بیضه**: جهت مطالعه بیومتریک بیضه بره‌ها، محیط اسکروتوم و ابعاد بیضه در طی۳ مرحله، قبل از ایجاد آزواسپرمی (روز اول خوراندن قرص تاموکسیفن)، بعد از ایجاد آزواسپرمی (۴۰ روز بعد از خوراندن قرص تاموکسیفن) و بعد از انجام پیوند (۴۹ روز بعد از عمل پیوند) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری محیط اسکروتوم با استفاده از متر نواری و در پهن‌ترین نقطه انجام شد. اندازه‌گیری ابعاد بیضه از جمله طول بیضه (محور پشتی- شکمی)، بیضه به‌اضافه اپیدیدیم، طول بیضه و سر اپیدیدیم، ضخامت (محور قدامی- خلفی) و پهنا (محور میانی- جانبی)، با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد (Rozenberger, 1992).

- **عمل خون‌گیری**: خون‌گیری از گوسفندان مورد نظر نیز در طی ۳ مرحلهٔ قبل و بعد از ایجاد آزوسپرمی و بعد از پیوند انجام شد. بدین منظور، قبل از خون‌گیری، ابتدا مشخصات کامل هر دام ثبت شد و سپس از ورید وداج آن مقدار ۵ میلی‌لیتر خون بوسیله لوله‌های خلادار حاوی مادهٔ ضدانعقاد EDETA، اخذ گردید. در ادامه لوله‌های حاوی خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ -۳۰۰۰ سانتریفیوژ (Geneus20 - امریکا) گردیدند و پلاسما های بدست آمده تا زمان انجام آزمایشات سنجش هورمونی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس (امرسان، ایران) نگه‌داری شدند. اندازه‌گیری هورمون‌های LH (Luteinizing hormone) و FSH (Follicle-Stimulating Hormone) به کمک کیت (پیشتاز طب، ایران) و اندازه‌گیری هورمون تستوسترون به کمک کیت ایده‌ال تشخیص آتیه و با استفاده از دستگاه الایزا (Stat-fax 2100 امریکا) انجام گرفت.

- **بررسی هیستولوژیکی بافت بیضه**: با توجه به این‌که سیکل اسپرماتوژنز در گوسفند ۴۹ روز می‌باشد، ۴۹ روز بعد از پیوند، یکی از بیضه‌های گوسفندان مورد نظر به روش جراحی باز برداشته شد و پس از تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد و طی مراحل برش بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، از نظر بافت شناسی، بررسی گردید (Kaffashi Elahi *et al.*, 2011).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌ها پس از بررسی همگنی واریانس و نرمالیته باقی‌مانده‌ها از طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل (۲×۳)، مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

- **تاثیر تاموکسیفن و پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در بیومتری بیضه**: اشکال ۱- الف، ۱- ب و ۱- ج به ترتیب نشان‌دهنده اندازه بیضه بعد از مصرف تاموکسیفن، بعد از پیوند آلوگرافت و اندازه بیضه نرمال (کنترل) می‌باشد. همانطور که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود، تزریق تاموکسیفن منجر به کاهش اندازه بیضه (مساحت: ۲۹/۲۹۷ سانتی‌متر مربع، محیط: ۲۲/۹۰۲ سانتی‌متر و ارتفاع: ۹/۴۵۲ سانتی‌متر) نسبت به بیضه نرمال (۱- ج) با مساحت ۶۶/۸۵۲ سانتی‌متر مربع، محیط ۳۱/۶۹۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۲/۳۷۹ سانتی‌متر، شده است. از طرفی هم مشاهده می‌شود که پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی باعث افزایش اندازه بیضه بعد از پیوند آلوگرافت (۱- ب) اندازه بیضه بعد از مصرف تاموکسیفن (۱- الف) شده‌است، به‌طوری‌که مساحت، محیط و ارتفاع بیضه گوسفند آزواسپرمی‌شده به ترتیب ۶۳/۶۰۰ سانتی‌متر مربع، ۳۰/۹۵۱ سانتی‌متر و ۱۲/۵۷۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شده‌است.

شکل ۱- الف) اندازه بیضه بعد از مصرف تاموکسیفن ب) اندازه بیضه بعد از پیوند آلوگرافت ج) اندازه بیضه نرمال (کنترل)

- **اثر تیمار و زمان نمونه‌گیری روی بیومتری بیضه:** نتایج جدول ۱ نشان داد که تفاوتی بین عملکرد گروه تیمار و کنترل برای تمام صفات مشاهده شد. آنالیز داده‌ها نشان داد اثر زمان نمونه‌گیری بر روی تجمیع گروه‌ها (کنترل و تیمار) برای ۵ ماهگی و ۷ ماهگی تفاوت معنی‌داری نداشت این در حالی بود که به لحاظ مقداری، عملکرد تمامی صفات مورد مطالعه برای زمان ۹ ماهگی بالاتر از زمان ۵ و ۷ ماهگی بود و تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$).

- **اثر متقابل تیمار در زمان:** بالاترین و پایین‌ترین میزان اندازه محیط اسکروتوم به ترتیب برای گروه کنترل در ۹ ماهگی (۳۵/۳۲ سانتی‌متر) و گروه تیمار در ۷ ماهگی مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). در ماه ۷ تفاوت معنی‌داری بین اندازه محیط اسکروتوم گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در ماه‌های ۵ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تیمار از نظر اندازه محیط اسکروتوم مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در ماه‌های ۷ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین اندازه بیضه راست با اپیدیدیم گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در ماه‌های ۷ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین اندازه بیضه راست بدون اپیدیدیم گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که بیشترین اختلاف عملکردی بین تیمار کنترل و تیمار در ماه ۷ بود.

در ماه‌های ۷ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین محور قدامی-خلفی بیضه راست گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که بیشترین اختلاف عملکردی بین تیمار کنترل و تیمار در ماه ۷ بود. در ماه‌های ۷ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین محور داخل به خارج بیضه راست گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بطوری‌که بیشترین اختلاف عملکردی

جدول ۱- اثر تیمار، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل تیمار × زمان، روی صفات بیومتریک بیضه (سانتی‌متر)

		محیط اسکروتوم (سانتی‌متر)	بیضه راست با اپیدیدیم (سانتی‌متر)	بیضه راست بدون اپیدیدیم (سانتی‌متر)	محور قدامی–خلفی بیضه راست (سانتی‌متر)	محور داخل به خارج بیضه راست (سانتی‌متر)	بیضه چپ با اپیدیدیم (سانتی‌متر)	بیضه چپ بدون اپیدیدیم (سانتی‌متر)	محور قدامی–خلفی بیضه چپ (سانتی‌متر)	محور داخل به خارج بیضه چپ (سانتی‌متر)
تیمار	کنترل	۲۸/۱^{a}	۱۲/۶۷^{a}	۱۱/۱۸^{a}	۶/۵۷^{a}	۶/۸۳^{a}	۱۱/۸۹^{a}	۱۰/۴۳^{a}	۵/۶۷^{a}	۵/۶۲^{a}
	تیمار	۲۳/۵۵^{b}	۹/۶۹^{b}	۶/۸۷ ^{b}	۴/۶۸^{b}	۴/۳۶^{b}	۸/۶۳^{b}	۶/۷۱^{b}	۴/۶۱^{b}	۴/۶۵^{b}
	SEM	۰/۶۲۱	۰/۴۳۵	۰/۳۹۴	۰/۲۲۶	۰/۲۴۷	۰/۳۸۳	۰/۵۵۶	۰/۲۱۷	۰/۲۳۹
	p-value	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۸۲
زمان	۵ ماهگی	۲۲/۳۶ ^{b}	۹/۴^{b}	۷/۵۷^{b}	۴/۵۸^{b}	۴/۵۶^{b}	۸/۴۵^{b}	۷/۰۲^{b}	۴/۵۳^{b}	۴/۶۸^{b}
	۷ ماهگی	۲۰/۵۶^{b}	۹/۱۶^{b}	۷/۱۹^{b}	۴/۳۶^{b}	۴/۶۴^{b}	۸/۴۰^{b}	۶/۹۶^{b}	۴/۲۶^{b}	۳/۹۲^{b}
	۹ ماهگی	۳۴/۵۶^{a}	۱۴/۹۸^{a}	۱۲/۳۲^{a}	۷/۹۳^{a}	۷/۵۸^{a}	۱۳/۹۲^{a}	۱۱/۷۳^{a}	۶/۶۳^{a}	۶/۸۰^{a}
	SEM	۰/۷۶۱	۰/۵۳۳	۰/۴۸۳	۰/۲۷۷	۰/۳۰۲	۰/۴۶۹	۰/۶۸۱	۰/۲۶۵	۰/۲۹۳
	p-value/***/	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	کنترل–۵ ماهگی	۲۲/۲۶^{b}	۹/۴۲^{c}	۸/۰۸^{bc}	۴/۷۰^{c}	۴/۶۶^{c}	۸/۳۸^{cd}	۷/۲۶^{bc}	۴/۶۸^{b}	۴/۸۰^{b}
	کنترل –۷ ماهگی	۲۶/۷۲^{b}	۱۲/۵۰^{bc}	۱۰/۹۲^{b}	۶/۴۶^{b}	۶/۹۲^{b}	۱۱/۲۶^{b}	۱۰/۰۴^{ab}	۵/۶۶^{ab}	۵/۴۰^{ab}
	کنترل–۹ ماهگی	۳۵/۳۲^{a}	۱۶/۰۸^{a}	۱۴/۵۴^{a}	۸/۵۴^{a}	۸/۹^{a}	۱۶/۰۲^{a}	۱۴/۰۰^{a}	۶/۶۸^{a}	۶/۶۶^{a}
	تیمار–۵ ماهگی (قبل از مصرف تاموکسی‌فن)	۲۲/۴۶^{b}	۹/۳۸^{c}	۷/۰۶^{c}	۴/۴۶^{c}	۴/۴۶^{c}	۸/۵۲^{c}	۶/۷۸^{bc}	۴/۳۸^{bc}	۴/۵۶^{b}
	تیمار –۷ ماهگی (بعد از مصرف تاموکسی‌فن)	۱۴/۴^{c}	۵/۸۲^{d}	۳/۴۶^{d}	۲/۲۶^{d}	۲/۳۶^{d}	۵/۵۴^{d}	۳/۸۸^{c}	۲/۸۶^{c}	۲/۴۴^{c}
	تیمار–۹ ماهگی (بعد از پیوند آلوگرافت)	۳۳/۸^{a}	۱۳/۸۸^{ab}	۱۰/۱۰^{b}	۷/۳۲^{ab}	۶/۲۶^{bc}	۱۱/۸۲^{cd}	۹/۴۶^{b}	۶/۵۸^{a}	۶/۹۴^{a}
	SEM	۱/۰۷۶	۰/۷۵۴	۰/۶۸۳	۰/۳۹۲	۰/۴۲۷	۰/۶۶۳	۰/۹۶۳	۰/۳۷۵	۰/۴۱۴
	p-value	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۲۰	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۱۳

a,b,c : وجود حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف می‌باشد (p<۰/۰۵).

بین تیمار کنترل و تیمار در ماه ۷ بود. در ماه‌های ۷ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین صفت بیضه چپ با اپیدیدیم گروه کنترل با تیمار مشاهده شد (p<۰/۰۰۵)، به‌طوری‌که بیشترین اختلاف عملکردی بین تیمار کنترل و تیمار در ماه ۷ بود.

در ماه‌های ۷ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین بیضه چپ بدون اپیدیدیم گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین اختلاف عملکردی بین تیمار کنترل و تیمار در ماه ۷ بود. بالاترین و پایین‌ترین میزان محور قدامی–خلفی بیضه چپ به ترتیب برای گروه کنترل در ماه ۹ (۶/۶۸ سانتی‌متر) و گروه تیمار (۲/۸۶ سانتی‌متر) در ماه ۷ مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). در ماه ۷ تفاوت معنی‌داری بین محور قدامی–خلفی بیضه چپ گروه کنترل با تیمار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در ماه‌های ۵ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تیمار از نظر محور قدامی–خلفی بیضه چپ مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

در ماه ۷ تفاوت معنی‌داری بین محور داخل به خارج بیضه چپ گروه کنترل (۵/۴ سانتی‌متر) با تیمار (۲/۴۴ سانتی‌متر) مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). این در حالی بود در ماه‌های ۵ و ۹ تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تیمار از نظر محور داخل به خارج بیضه چپ مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). برای این صفت علی‌رغم عملکرد بهتر گروه تیمار با گروه کنترل اما تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

– **تاثیر تاموکسیفن و پیوند آلوگرافت بر میزان هورمون‌های خونی**: داده‌ها پس از بررسی همگنی واریانس و نرمالیته باقی-مانده ها از طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل (۲×۳) مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج آنالیز آماری نشان داد اثر اعمال فاکتور، زمان نمونه برداری و اثر متقابل تیمار × زمان بر تمامی صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده است اثر اعمال تیمار بر صفات LH، FH و تستوسترون معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). بطوری‌که در هر سه صفت مقدار تیمار شاهد بیشتر از گروه تیمار بود. اثر اعمال زمان نمونه‌گیری بر صفات LH، FH و تستوسترون معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). مقادیر این پارامترها در ۹ ماهگی بطور معنی‌داری بیشتر از ۵ و ۷ ماهگی بود. اثر متقابل تیمار در زمان برای صفات LH و تستوسترون معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). این در حالی بود که اثر متقابل تیمار در زمان برای صفت FH معنی‌دار نبود. تفاوت معنی‌داری بین میزان LH تیمار کنترل و شاهد در ماه‌های ۷ و ۹ مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). این در حالی بود که در ماه ۵ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است. تفاوت معنی‌داری بین میزان تستوسترون تیمار کنترل و شاهد در ماه ۷ مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). این در حالی بود که در ماه‌های ۵ و ۹ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

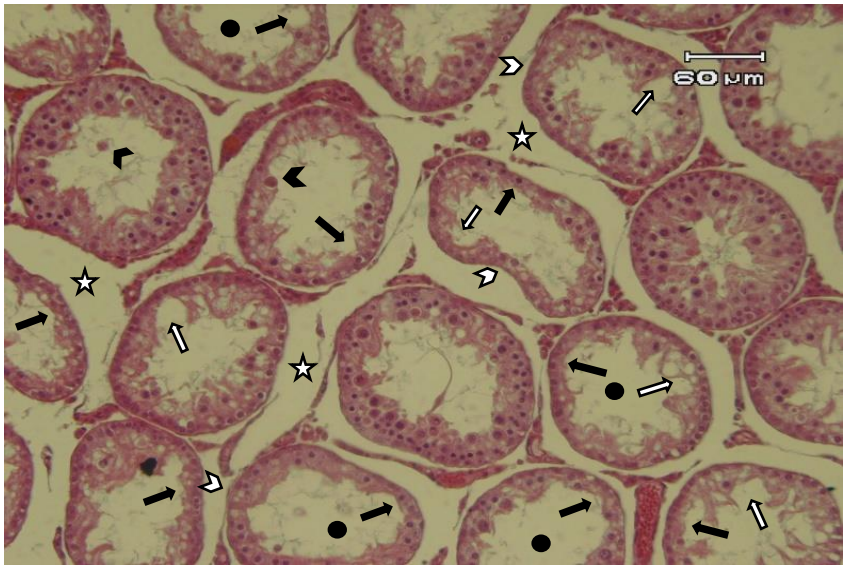
جدول ۲– اثر تیمار، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل تیمار بر زمان، روی هورمون‌های تولیدمثلی

		هورمون لوتئینی (ng/ml)	هورمون محرکه فولیکولی (ng/ml)	تستوسترون (ng/ml)
تیمار	کنترل	۰/۷۹۴۵^{a}	۱/۳۵۵^{a}	۳/۵۵۱^{a}
	تیمار	۰/۷۴۹^{a}	۱/۰۲۷^{b}	۳/۰۳۶۸^{a}
	SEM	۰/۰۰۷۲	۰/۰۹۵۹	۰/۱۱۰۴
	p-value	۰/۰۰۰۲	۰/۰۲۳۶	۰/۰۰۳۱
زمان	۵ ماهگی	۰/۷۵۶۲^{b}	۰/۷۴۴^{b}	۲/۲۹۵۳^{b}

	۷ ماهگی	۰/۷۵۳^{b}	۱/۰۱۰۹^{b}	۲/۶۶۶۵^{b}
	۹ ماهگی	۰/۸۰۷^{a}	۱/۸۱۷۶^{a}	۴/۹۲۰۲^{a}
	SEM	۰/۰۰۸۸	۰/۱۱۷۵	۰/۱۳۵۲۸
	p-value	۰/۰۰۰۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
تیمار×زمان	کنترل-۵ ماهگی	۰/۷۴۱۲^{c}	۰/۷۷۵۸	۲/۲۳۷۵^{c}
	کنترل -۷ ماهگی	۰/۷۹۱۴^{b}	۱/۳۰۹۶	۳/۱۲۰۴^{b}
	کنترل-۹ ماهگی	۰/۸۵۱^{a}	۱/۹۷۹۲	۵/۲۹۵۶^{a}
	تیمار-۵ ماهگی	۰/۷۷۱۲^{b}	۰/۷۱۲۲	۲/۳۵۳۲^{bc}
	تیمار -۷ ماهگی	۰/۷۱۴۶^{c}	۰/۷۱۲۲	۲/۲۱۲۶^{c}
	تیمار-۹ ماهگی	۰/۷۶۳۲^{bc}	۱/۶۵۶	۴/۵۴۴۸^{a}
	SEM	۰/۰۱۲۵	۰/۱۶۶۱	۰/۱۹۱۳
	p-value	۰/۰۰۰۱	۰/۲۹۳۷	۰/۰۲۸۳

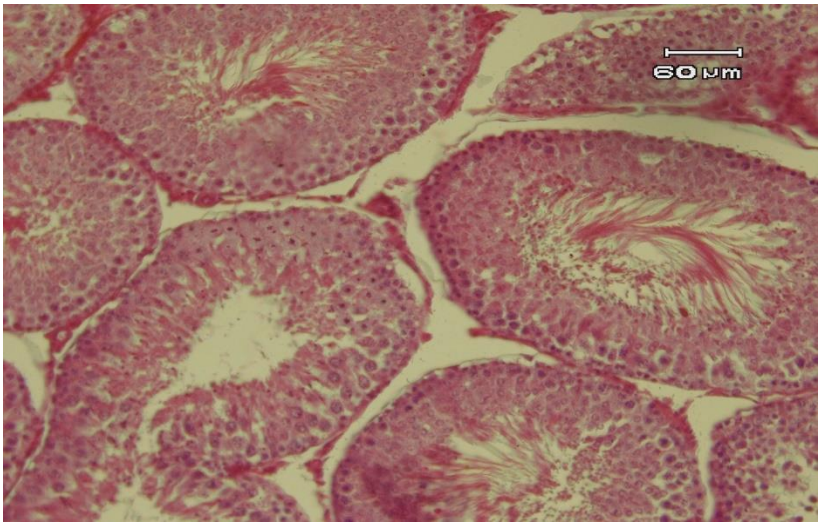
a,b,c: وجود حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف می‌باشد (p<۰/۰۵).

- **بررسی هیستولوژیکی بافت بیضه از نظر تاثیر تاموکسیفن**: نتایج بررسی هیستولوژیکی نمونه‌های بافتی تهیه شده از بافت بیضه بعد از القای آزواسپرمی در آزمایشگاه در شکل ۲ نشان داده شده‌است. همانطور که مشاهده می‌شود، القای آزواسپرمی با استفاده از تاموکسیفن و به مدت ۴۰ روز منجر به تخریب شدید بافت پوششی زایا در لوله‌های اسپرم‌ساز شده است به نحوی که جمعیت سلول‌های اسپرماتوگونی به شدت کاهش یافته است و اثری از رده‌های اسپرماتید (کروی و کشیده) در اغلب لوله‌ها مشاهده نمی‌شود. کاهش ارتفاع بافت پوششی زایا و واکوئله شدن آن در اکثر لوله مشهود است و افزایش فضای لومن و وجود سلول‌های بزرگ کنده شده در لوله‌ها مشاهده می‌شود. کاهش حجم لوله‌ها و چروکیده شدن دیواره آن‌ها به همراه ادم در بافت بینابینی منجر به افزایش فضای بینابینی شده است.



شکل ۲- یافته‌های مربوط به بررسی هیستولوژیکی نمونه‌های بافتی تهیه شده از بافت بیضه بعد از القای آزواسپرمی (فلش توپر: کاهش ارتفاع بافت پوششی زایا، فلش توخالی: واکوئله شدن، دایره توپر: افزایش فضای لومن، سرفلش توپر: سلول‌های بزرگ کنده شده، سرفلش توخالی: چروکیده شدن دیواره لوله‌ها، ستاره: ادم در بافت بینابینی) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، بزرگ‌نمائی ×۲۰۰).

- بررسی هیستولوژیکی بافت بیضه بعداز پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی: نتایج بررسی هیستولوژیکی نمونه‌های بافتی تهیه شده از بافت بیضه بعد پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی در آزمایشگاه در شکل ۳ نشان داده شده است.همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌کنید، پس از پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به بیضه آزواسپرمی شده، ساختار لوله‌های اسپرم ساز کاملا به شکل نرمال است و تمامی جمعیت‌های سلول-های رده اسپرماتوژنیک در اکثر لوله‌ها قابل مشاهده است.



شکل ۳- یافته‌های مربوط به بررسی هیستولوژیکی نمونه‌های تهیه شده از بافت بیضه بعد از پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، بزرگ‌نمائی ×۲۰۰)

بحث و نتیجه‌گیری

تاموکسیفن یک آنتاگونیست استروژن غیراستروئیدی است که به طور رقابتی گیرنده‌های استروژن را مسدود کرده و عملکرد آگونیست‌ها را مهار می‌کند، اما به دلیل خاصیت آگونیستی خاص خود، برخی از پاسخ‌های استروژنی را نیز القا می‌کند (Hoffmann and Schuler, 2000). تجلی این اقدامات مختلف به گونه، اندام و نوع بافت و سلول بستگی دارد (Motrich *et al.*, 2007). مکانیسم‌های دقیق این دوگانگی کاملاً درک نشده است، اما ممکن است مربوط به تحریک گیرنده‌های استروژنی متنوع در سلول‌های گوناگون باشد (Hoffmann and Schuler, 2000). بسیاری از محققین معتقدند که، تاموکسیفن اثراتی بر عملکرد نهایی غدد جنسی، شمارش اسپرم و نتایج حاملگی دارد (Parker *et al.*, 1986). باتوجه به احتمال نقش استروژن در اسپرماتوژنز و موقعیت گیرنده‌های استروژنی در بیضه (Pagano *et al.*, 2001) و با علم به این‌که تاموکسیفن یک داروی آنتی‌استروژنی است، که اثرات خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های

استروژنی اعمال می‌کند، این احتمال وجود دارد که تاموکسیفن باعث ایجاد اختلال در اسپرماتوژنز و کاهش باروری اسپرم گردد (Chen *et al*., 2007).

پیوتر و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثرات تخریبی تاموکسیفن را بر روی مجاری تناسلی موش‌های نر نژاد NMRI مورد بررسی قرار دادند که نتایج پژوهش حاضر در خصوص تاثیر تاموکسیفن در ایجاد آزواسپرمی در قوچ با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Piotr *et al*., 2007).

دانل و همکاران در سال ۲۰۰۱، تاثیرات تاموکسیفن را بر کیفیت و میزان باروری اسپرم، بررسی کردند. طبق نتایج حاصله، تزریق داروی تاموکسیفن با دوز ۴ mg/kg به موش‌های صحرایی نر، تعداد اسپرم و میزان تحرک آن‌ها را تغییر داد و باعث اثرات منفی بر اسپرماتوژنز و تخریب اسپرماتیدها گردید (Donnell *et al*., 2001). در مطالعه عریان و همکاران در سال ۲۰۰۸، سه گروه از موش‌های صحرایی به مدت ۳۰ روز متوالی به ترتیب ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم تاموکسیفن بر کیلوگرم وزن بدن در حلال (شامل اتانول ۶۰ درصد و سرم فیزیولوژی) دریافت نمودند. نتایج نشان دادند که غلظت تستوسترون خون و تعداد اسپرم اپی‌دیدیم در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی تاموکسیفن، کاهش چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل داشت (Oryan *et al*., 2008). این نتایج با نتایج مطالعه ما مطابقت داشت.

پیوند آلوگرافت به معنی انتقال بافت از یک موجود به موجود دیگری از همان گونه است. در پیوند آلوژنیک، بیمار بافت پیوندی را از فردی غیر از خود یا دوقلوی مشابه خود دریافت می‌کند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بخاطر قابلیت‌های تعدیل سیستم ایمنی بسیار مشهور هستند. به طور خاص، اعتقاد بر این است که خاصیت سرکوب‌کننده سیستم ایمنی آنها اجازه پیوند آلوژنیک یا حتی ژنوژنیک آنها را به گیرنده‌های توانایی ایمنی بدون استفاده از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی می‌دهد (Lin *et al*., 2012). سلول بنیادی مشتق از چربی، به دلیل سهولت جدا شدن از یک منبع بافت فراوان، یک سلول بنیادی مزانشیمی امیدوارکننده برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها است. نشان داده شده است که سلول بنیادی مشتق از چربی فاقد بیان عمده سازگاری بافتی-II است و اثرات سرکوب‌کننده سیستم ایمنی آن با واسطه پروستاگلاندین E2 انجام می‌شود. پیوند آلوژنیک سلول‌های ژرم از بیضه اهداکنندگان به گیرنده‌ها منجر به تولید فرزندان مشتق از اهداکننده به دنبال جفت‌گیری طبیعی در موش و رت شده است (Brinster and Avarbock, 1994, Jiang and Short, 1995). از روش پیوند سلول‌های زایای مردانه برای مطالعه کنترل اسپرماتوژنز بسیار استفاده شده است. اخیراً، این روش برای خوک‌ها (Honaramooz *et al*., 2002)، بزها (Honaramooz *et al*., 2003) و گاوها (Izadyar *et al*., 2003; Stockwell *et al*., 2009) استفاده شده است. در سال ۲۰۰۳، اولین حیوان تولید شده توسط پیوند سلول‌های زایا یک بز بود (Honaramooz *et al*., 2003). پیوند سلول‌های زایای نر به دلیل استفاده بالقوه از آن برای تولید حیوانات تراریخته (Honaramooz *et al*., 2008)، تکثیر پدران برتر (Herrid *et al*., 2009) و حفظ مواد ژنتیکی، در گونه‌های دام مورد توجه قرار می‌گیرد. پاسخ ایمونولوژیک به پیوند سلول‌های زایا با توجه به نتایج متضادی که برای پیوندهای آلوژنیک در گونه‌های جوندگان (Brinster and Avarbock, 1994, Kanatsu-Shinohara *et al*., 2003) و غیر جوندگان (Honaramooz *et al*., 2003) ارائه شده است، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در مقابل، پیوند موفقیت آمیز سلول‌های زایای آلوژنیک در بزها بدون استفاده از گیرنده‌های نابارور یا

سرکوب سیستم ایمنی انجام شد (Honaramooz *et al*., 2003). نتایج مطالعات هرید و همکاران در سال ۲۰۰۹ بعد از پیوند سلول‌های زایای هترولوگ در گاوها نیز مفهوم تحمل ایمنی در بیضه گونه‌های دام را پشتیبانی می‌کند (Herrid *et al*., 2009, Stockwell *et al*., 2009). این مطالعه نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در خوکچه‌های هندی آزواسپرمی می‌تواند با موفقیت باروری را بازیابی کند و اسپرم‌زایی را القا کند. یافته‌های مشابه نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌توانند باروری را در آزواسپرمی ناشی از بوسولفان در موش صحرایی (Cakici *et al*., 2013, Lue *et al*., 2007)، همستر (Tamadon *et al*., 2015) و موش (Lue *et al*., 2007) بازیابی کنند. کاکیچی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی پس از ۱۲ هفته می تواند موش های صحرایی نر نابارور تحت درمان با بوسولفان را بهبود بخشد و باعث تولید اسپرم شود (Cakici *et al*., 2013). لو و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که انجام پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در مدل موش نابارور تحت درمان با بوسولفان ممکن است به سلول های سرتولی، و لایدیگ تمایز یابد (Lue *et al*., 2007). این نتایج با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت.

یافته‌های پژوهش حاضر حاکی از بهبود تغییرات پاتولوژیک در لوله‌های اسپرم‌ساز پس از پیوند سلول بود. پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌تواند تولید انواع سلول‌های ژرمینال را در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه القاء کند که منبع موثری برای درمان آزواسپرمی هستند، بنابراین به‌نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌توانند توانائی مناسبی برای بهبود آزواسپرمی و بازیابی ناباروری داشته‌باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر فراهم نمودن منابع مالی آن و از مهندسین و کارکنان محترم بخش علوم دامی ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان به خاطر فراهم نمودن امکانات موردنیاز و نیز پشتیبانی‌های همه جانبه در انجام این تحقیق سپاسگزارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Berookhim, B.M. and Schlegel, P.N. (2014). Azoospermia due to spermatogenic failure. Urologic Clinics, 41(1): 97-113.
- Brinster, R.L. and Avarbock, M.R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(24): 11303-11307.

- Cakici, C., Buyrukcu, B., Duruksu, G., Haliloglu, A.H., Aksoy, A., Isık, A., *et al*. (2013). Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. BioMed research international, pp: 1-18.
- Chen, Y., Jefferson, W.N., Newbold, R.R., Padilla-banks, E. and Pepling, M.E. (2007). Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. Endocrinology, 148(8): 3580-3590.
- Donnell, L.O., Robertson, K., Jones, M., Simpson, E. and Henry, P. (2001). Estrogen and spermatogenesis. Endocrine reviews, 22(3): 289-318.
- Rosenberger G., Dirksen G., Grunder H.D., Grunert E., Krause D., Stober M., *et al. (1979). Clinical examination of cattle, pp: 445-453.*
- Herrid, M., Olejnik, J., Jackson, M., Suchowerska, N., Stockwell, S., Davey, R., *et al*. (2009). Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. Biology of Reproduction, 81(5): 898-905.
- Hoffmann, B. and Schuler, G. (2000). Receptor blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. Animal Reproduction Science, 60(2): 295-312.
- Honaramooz, A., Behboodi, E., Blash, S., Megee, S.O. and Dobrinski, I. (2003). Germ cell transplantation in goats. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 64(4): 422-428.
- Honaramooz, A., Megee, S., Zeng, W., Destrempes, M.., Overton, S.A., Luo, J., *et al*. (2008). Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. The FASEB Journal, 22(2): 374-382.
- Honaramooz, A., Megee, S.O. and Dobrinski, I. (2002). Germ cell transplantation in pigs. Biology of Reproduction, 66(1): 21-28.
- Izadyar, F., Den Ouden, K., stout, T., Stout, J., Coret, J., Lankveld, D., *et al*. (2003). Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduction, 126(6): 765-774.
- Jiang, F.X. and Short, R. (1995). Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. International Journal of Andrology, 18(6): 326-330.
- Kaffashi elahi, R., Mousavi, G., Hejazi, S., Nouri, K. and Kalantari, S. (2011). Effects of *Tribulus tertesris* extract on body weight, testis histopathology and size in rats. Veterinary Clinical Pathology, 5(1): 1043-1049. [In Persian]
- Kanatsu-shinohara, M., Ogonuki, N ,.Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, S., Honjo, T., *et al*. (2003). Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. Biology of Reproduction, 68(1): 167-173.
- Kazemi, D., Shams asenjan, K., Dehdilani, N., Parsa, H., Movassagh pour akbari, A. and Akbarzadeh, P. (2016). Isolation, culture expansion and characterization of canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. Veterinary Clinical Pathology, 10(2): 127-142. [In Persian]
- Lin, C.S., Lin, G. and Lue, T.F. (2012). Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. Stem Cells and Development, 21(15): 2770-2778.
- Lue Y., Erkkila K., Liu P.Y., Ma K., Wang C., Hikim A.S. and Swerdloff R.S. (2007). Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. The American Journal of Pathology, 170(3): 899-908.
- Mehrabani, D., Hassanshahi, M.A., Tamadon, A., Zare, S., Keshavarz, S., Rahmanifar, F., *et al*. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. Journal of Human Reproductive Sciences, 8(2): 103-110.
- Mohebbi, M., Moghaddam, G., Qasemi Panahi, B. and Nouri, M. (2023). Isolation and Morphological Characterization of Ovine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Scanning Electron Microscopy (SEM). Iranian Journal of Applied Animal Science, 13(1): 89-95.

- Motrich, R.D., Ponce, A.A. and Rivero, V.E. (2007). Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. Fertility and Sterility, 88(2): 452-461.
- O'brien, K.L.F., Varghese, A.C. and Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. Fertility and Sterility, 93(1): 1-12.
- Olfati, A., Moghaddam, G.h., Khafar, K.R., Mojtahedin, A. Abdolahzadeh, A. (2018). Role of follicle-stimulating hormone and estradiol benzoate in recovering spermatogenesis in tamoxifen-injured rats. Asian Pacific Journal of Reproduction, 7(6): 248-253.
- Oryan, S., Parivar, K. and Asle rousta, M. (2008). Effect of tamoxifen on histological structure of testis in adult male Wistar rats. Medical Sciences Journal, 18(2): 81-84.
- Pagano, G., De biase, A., Deeva, I..B. Degan, P., Doronin, Y.K., Iaccarino, M., *et al*. (2001). The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. Life Sciences, 68(15): 1735-1749.
- Parker, L.N., Gray, D.R., Lai, M.K. and Levin, E.R. (1986). Treatment of gynecomastia with tamoxifen: a double-blind crossover study. Metabolism, 35(8): 705-708.
- Piotr, B., Wrona, Z., Krakowski, L. and Brodzki, A. (2007). Influnce of tamoxifen on sexual impulse and semen biologica values in male dug. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 51(3): 383-91.
- Rahmanifar, F., Tamadon, A., Mehrabani, D., Zare, S., Abasi, S., Keshavarz, S., *et al*. (2016). Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoosper-mic seminiferous tubules by allotransplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 19(6): 653-661.
- Stockwell, S., Herrid, M., Davey, R., Brownlee, A., Hutton, K. and Hill., J.R. (2009). Microsatellite detection of donor-derived sperm DNA following germ cell transplantation in cattle. Reproduction, Fertility and Development, 21(3): 462-468.
- Tamadon, A., Mehrabani, D., Rahmanifar, F., Jahromi, A.R., Panahi, M., Zare, S., *et al*. (2015). Induction of spermatogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermia in hamster. International Journal of Stem Cells, 8(2): 134-145.
- Zhang D., Liu X., Peng J., He D., Lin T., Zhu J., *et al.* (2014). Potential spermatogenesis recovery with bone marrow mesenchymal stem cells in an azoospermic rat model. International journal of molecular sciences, 15(8): 13151-13165.

Investigating hormonal, biometric and histological changes in ram testicles following allograft transplantation

Bakhshayash Khiabani, A.[1], Moghadam, Gh.[2*], Ghasemi Panahi, B.[3], Daghigkia, H.[2], Javanmard, A.[3]

1- Ph.D. Student of Animal Science, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding authors email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

Abstract

Stem cells are undifferentiated cells with the ability to transform into all specialized cells, whose existence is necessary for a person's life. Therefore, the aim of the present study was to investigate the hormonal, biometric and histological change of the testis after allograft transplantation in rams. For this purpose, a total of 20 male lambs were used as cell donors and recipients as well as to confirm the effect of tamoxifen and controls. Azoospermia was induced in both testes of recipient lambs and stem cells were extracted and cultured from the fat tissue of donor lambs. Cells were transferred in both testicles. The circumference of the scrotum and the dimensions of the testis were measured during three stages before and after the induction of azoospermia and after transplantation. Blood sampling was also done in three stages. 49 days after transplantation, one of the testicles was removed and sent to the laboratory for histological evaluation. The highest and lowest scrotal circumference sizes were respectively related to the control group at the age of 9 months (32.35 cm) and the treatment group at the age of 7 months, and there was a significant difference ($p<0.05$). The effect of applying the factor, sampling time and interaction effect of treatment × time on all studied traits was significant ($p<0.05$). Also the induction of azoospermia using tamoxifen led to severe destruction of the germinal epithelium in seminiferous tubules. Since the transplantation of stem cells led to the successful induction of spermatogenesis in the seminiferous tubules of azoospermic sheep, therefore, this technique can be used for the transfer of stem cells from a superior animal as a donor for the production of functional sperm in another animal of the same species.

Conflict of interest: None declared

Keywords: Adipose-derived stem cells, Allograft transplantation, Hormonal changes, Ram, Testis.