

## **Histological analysis of testiculopathy induced by experimental babesiosis in mouse**

**Shariati SH<sup>1</sup>, Shalizar-Jalali A<sup>1\*</sup>, Esmaeilnejad B<sup>2</sup>, Mazaheri-Khameneh R<sup>3</sup>**

1- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

3- Department of Surgery and Diagnostic Imaging, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

Received: 2017/09/16 | Accepted: 2018/01/22

### **Abstract:**

**Background:** The babesias are the second common blood parasites in mammalian after trypanosomes and babesiosis as an emerging zoonotic disease has caused great concern. The aim of this study was to examine testicular histological alterations following experimental babesiosis induction by *Babesia bigemina* in mouse.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 24 adult male mice were randomly divided into four equal groups including untreated control, sham (receiving 2.0 ml normal saline intraperitoneally at the time of babesiosis induction), splenectomy and experimental babesiosis. Groups Experimental babesiosis was induced in splenectomized mice through 2.0 ml intraperitoneal injection of the infected heparinized blood sample belonging to a cow with confirmed *B. bigemina* infection. All animals were euthanized after 5 days and testicular histology was evaluated following confirmation of infection using microscopic and molecular analyses.

**Results:** The experimental babesiosis caused a significant reduction in the cross-sectional area, quality, maturation and number of seminiferous tubules cross-sections as well as severe testicular morphological alterations such as distinct hypospermatogenesis and spermatogenic maturation arrest compared to control, sham and splenectomy groups.

**Conclusion:** Findings of this study show that *B. bigemina* infection can lead to testicular damage in mice probably through microcirculatory disruption and blood flow reduction.

**Keywords:** Histology, Testis, Mouse, *Babesia bigemina*

**\* Corresponding Author.**

**Email:** a.shalizar@urmia.ac.ir

**Tel:** 0098 911 116 6004

**Fax:** 0098 443 277 1926

**Conflict of Interests: No**

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2018; Vol. 22, No 1, Pages 15-24*

# ارزیابی بافت‌شناختی آسیب بیضه ناشی از بازیوز تجربی در موش سوری

سید حمید شریعتی<sup>۱</sup>، علی شالیزار جلالی<sup>۲</sup>، بیژن اسماعیل‌نژاد<sup>۲</sup>، رامین مظاہری خامنه<sup>۳</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: بازیاهای دومین انگل خونی شایع در پستانداران پس از ترپانوزو ماها می‌باشند و بازیوز به عنوان یک بیماری مشترک نوپدید بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف اصلی مطالعه حاضر ارزیابی تغیرات بافت‌شناختی بیضه متعاقب القاء بازیوز تجربی توسط بازی‌با بازی‌مینا در موش سوری بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ موش سوری نر بالغ به صورت تصادفی به چهار گروه مساوی شامل شاهد فاقد تیمار، شم (حیوانات ۰/۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی را به صورت داخل صفاتی همزنان با القاء بازیوز تجربی دریافت می‌کردند)، برداشت طحال و بازیوز تجربی تقسیم شدند. بازیوز تجربی به واسطه تزریق داخل صفاتی ۰/۰ میلی لیتر نمونه خون آلوده حاوی هپارین گاوی که واجد آلوگی تأیید شده با بازی‌با بازی‌مینا بود به موش‌هایی که قبل طحال آن‌ها به روش جراحی خارج گشته بود، القاء گردید. تمامی حیوانات پس از گذشت ۵ روز از شروع مطالعه آسان‌گشی شدند و ساختار بافتی بیضه متعاقب تأیید آلوگی به واسطه بررسی‌های ریزیبنی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بازیوز تجربی کاهش قابل توجهی در سطح مقطع عرضی، کیفیت، بلوغ و تعداد مقاطع لوله‌های اسپرم‌ساز به همراه تغیرات مورفو‌لولوژیک شدید در بافت بیضه مانند کاهش بارز اسپرم‌ماتوژن و توقف بلوغ اسپرم‌ماتوژنیک را در مقایسه با گروه‌های شاهد، شم و برداشت طحال سبب گردید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر آشکار ساخت که آلوگی با بازی‌با بازی‌مینا در موش سوری احتمالاً به واسطه اختلال در روند خون- رسانی عروق خونی کوچک و کاهش جریان خون می‌تواند به آسیب بیضه منجر شود.

واژگان کلیدی: بافت‌شناسی، بیضه، موش، بازی‌با بازی‌مینا

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۹۷، صفحات ۱۵-۲۴

علایم بیماری در میزبان مهره‌دار شامل افزایش ناگهانی درجه حرارت بدن، کاهش اشتها، کم خونی شدید، همولیز داخل عروقی، هموگلوبینمی و هموگلوبینوری می‌باشد [۴]. در همین راستا، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که آلوگی تجربی با بازی‌با بازی‌مینا در موش‌های صحرایی به واسطه ایجاد اختلال در فرآیند خون‌رسانی، تغیرات چشمگیری را در ساختار بافتی کبد و کلیه و نیز فراستجه‌های بیوشیمیایی موجب می‌گردد [۵]. به علاوه، گزارشات متعددی نقش بارز کم خونی‌های همولیتیک و نیز اختلالات عروقی و خون- رسانی را در کاهش باروری و آسیب‌های بافتی بیضه مورد تایید قرار می‌دهند [۶-۸]. باتوجه به این امر که بازیوز ممکن است دستگاه تولید مثلی انسان و حیوان را تحت تاثیر قرار دهد [۹] و نیز با درنظر گرفتن لزوم به کارگیری راهبردهای درمانی کارا، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تغیرات خصوصیات بافتی بیضه متعاقب القاء بازیوز تجربی توسط بازی‌با بازی‌مینا در موش انجام پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه تجربی تصادفی شده شاهددار، ۲۴ سر موش سوری نر بالغ از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت

## مقدمه

بازیوز یک بیماری انگلی زئونوز می‌باشد که توسط تک‌یاخته داخل سلولی اجباری بازی‌با ایجاد می‌شود. تاکنون بیش از ۱۱۰ گونه برای این جنس شناسایی شده است که در طیف وسیعی از مهره‌داران به ویژه نشخوارکنندگان اهلی و وحشی، تک- سمی‌ها، سگ‌سانان، گربه‌سانان، چوندگان، پوندگان و انسان گزارش شده‌اند [۱]. اولین مورد آلوگی انسان به بازیوز در سال ۱۹۵۷ در یوگسلاوی سابق تشخیص داده شد و تا سال ۱۹۹۵ بیش از ۴۰۰ مورد انسانی از این بیماری گزارش گردیده است. بیشترین گزارشات انسانی از آمریکای شمالی (اغلب بازی‌با میکروتسی)، اروپا و جنوب شرق آسیا شامل ژاپن و تایوان (بیشتر بازی‌با دایورجنس) می‌باشد [۱-۳].

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- گروه جراحی و تصویربرداری تشخیصی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

\* نشان نویسنده مسئله؛

بخش بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۱۹۲۶

دوره‌نیس: ۰۹۱۱۱۱۶۰۰۴

پست الکترونیک: a.shalizar@urmia.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۱/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۵

بزرگنمایی ۱۰۰ با روغن امرسیون مورد بررسی قرار گرفتند.

### استخراج DNA

جهت استخراج DNA ۱۲۵ میکرولیتر از نمونه خون به ۲۵۰ میکرولیتر مخلوط بافر لیزکننده [ساکاروز ۰/۳۲ مولار، تریس HCl ۰/۰۱ مولار، کلرید منیزیم ۰/۰۰۵ مولار و ۱ درصد تریتون X-۱۰۰ pH=۷/۵] اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۱۰۰ سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل ۳ بار با ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده شستشو و سانتریفوژ شد. درنهایت، رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر PCR [کلرید پتاسیم ۵۰ میلی مولار، تریس HCl ۱۰ میلی مولار، pH=۸] درصد تریتون X-۱۰۰ و پروتئیناز K به میزان ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر بافر [pH=۸/۳] شناور شد. سپس، به مدت ۱ ساعت در ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شده و درنهایت نمونه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت اطمینان از وجود DNA، محصول حاصل از استخراج DNA انگل ابتدا روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید. در تحقیق حاضر دو جفت پرایمر استفاده شد [۱۳] که اطلاعات مربوط به آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است. جفت پرایمر اولیه جهت تکثیر یک قطعه ژنی متعلق به ژن 18S rRNA ۱۸۰ ریبوزومی استفاده گردید. اندازه قطعه از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اولیه ۷۳۸ جفت باز بود. ابتدا عملیات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی کنترل مثبت انجام گرفت تا با پرایمر پاسخ مناسبی به نمونه‌های مثبت داده شود. به همین دلیل عملیات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی نمونه‌های DNA و خون آلوده با استفاده از پرایمر انجام گرفت. برای انجام کار از کیت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Cinnagen, Iran) استفاده شد. طبق دستور کارخانه سازنده برای هر نمونه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای حجم ۱۲/۵ میکرولیتر طراحی شده بود. بدین صورت که ۱/۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر بافر، ۳ میکرولیتر DNA نمونه، ۰/۵ میکرولیتر آنژیم Reverse DNA Taq polymerase و ۰/۵ میکرولیتر آنژیم Forward متعلق به ژن 18S rRNA ۱۸۰ ریبوزومی، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۶/۵ میکرولیتر از آب مقطر خود کیت در میکروتیوب‌های مخصوص باهم مخلوط شده و سپس محلول حاصل تحت برنامه‌ای که در جدول شماره ۲ آورده شده است، در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تاریکی، دمای ۲۵±۲ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵۰±۱۰ درصد نگهداری شدند. تمام حیوانات در شرایط غذیه‌ای یکسان با ذرت، گندم، جو و پلت به نسبت‌های برابر غذیه شدند و امکان دسترسی آزاد به آب نیز برای تمامی آن‌ها وجود داشت. تمامی موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی در جریان انجام این مطالعه نیز بر اساس دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی صورت پذیرفت.

### گروه‌بندی حیوانات

متعاقب یک هفته سازگاری با شرایط محیط، حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه مساوی شش تایی تقسیم شدند. جهت القاء بازیبوز در گروه بازیبوز تجربی، ۰/۲ میلی لیتر از خون آلوده گاوی که به‌واسطه ارزیابی‌های ریزیبنی و نیز مولکولی، آلدگی با بازیبزا بازیمینا که شایع ترین گونه بازیبا در ایران است [۱۰]، در آن مورد تایید قرار گرفته بود، به صورت داخل صفاقی به موش‌هایی که ۴۸ ساعت قبل طحال آن‌ها به روش جراحی خارج شده بود تزریق گردید [۵]. برای این مطالعه گروه شاهد بدون تیمار و گروه شم که ۰/۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی را به صورت داخل صفاقی همزمان با القاء بازیبوز تجربی دریافت می‌کردند (در این دو گروه هیچ گونه مداخله جراحی صورت نمی‌پذیرفت) و گروهی که تنها متحمل برداشت طحال می‌شد نیز در نظر گرفته شد. برداشت طحال از طریق رهیافت کناری قدامی زیردنده‌ای سمت چپ انجام گرفت. پس از این که عروق طحال لیگامان زده شدند، بافت پیوندی در ناف طحال جدا گشته و مراقبت ویژه‌ای به کار گرفته شد تا قسمت انتهایی لوزالمudedه آسیب نیبد و طحال جدا گردید. پوست و عضلات محل جراحی توسط الگوی تکی ساده بخیه زده شد. موش‌های موجود در تمامی گروه‌ها پس از گذشت ۵ روز از شروع مطالعه [۱۱]، متعاقب بیهوشی با کاتامین (Alfasan) Holland به میزان ۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن [۱۲] آسان‌کشی شده و پس از کالبدگشایی، بیضه‌ها با رعایت اصول استریل به سرعت برداشته شدند.

### ارزیابی ریزیبنی آلوده‌گی انگی

پس از تهیه گسترش از خون‌های جمع آوری شده و رنگ-آمیزی گیمسا ۵۰ میدان میکروسکوپی جهت جستجوی اجرام بازیابی مورد مشاهده قرار گرفت و در موارد مثبت، نوع انگل نیز مورد بررسی مجدد قرار گرفت. گسترش‌های نازک خون به مدت ۵ دقیقه در متابول فیکس شده و سپس با گیمسای ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و برای تعیین آلوده‌گی به انگل بازیبا با

الکتروفورز در بافر TBE به مدت ۷۰ دقیقه در ولتاژ ۸۰ ولت به انجام رسید. ژل پس از الکتروفورز با دستگاه ترانس‌لومیناتور در زیر نور UV بررسی گردید.

انجام گردید. پس از دومین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اندازه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای در محدوده ۲۱۱ جفت باز بود. پس از پایان PCR ۸ میکرولیتر از محصول روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بر ماید منتقل گردید و

جدول شماره ۱- توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

توالی پرایمر	جفت پرایمر اولیه
BI-AMA-FO: 5'-GTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGT-3'	
BI-AMA-RO: 5'-GGCGTCAGACTCCAACGGGGAACCG-3'	
BI-AMA-FI: 5'-TACTGTGACGAGGGACGGATC-3'	جفت پرایمر ثانویه
BI-AMA-RI: 5'-CCTAAAAGCAGATTGAGT-3'	

جدول شماره ۲- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مشخصه	چرخه				دما (سانتی گراد)	
	داناتوره شدن ابتدایی		(توسعه)	(اتصال)		
	E	A				
	۷۲	۷۲	۶۸	۹۵	۹۵	
	۱۰	۱	۱	۰/۵	۵	
					زمان (دقیقه)	

اسپرم دیده نمی‌شود، ولی تعداد زیادی اسپرماتید گرد دیده می‌شود؛ ۶ تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می‌شود؛ ۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمی‌شود. تعداد زیادی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود؛ ۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود؛ ۳: هیچ اسپرماتوسیت اولیه‌ای دیده نمی‌شود، فقط اسپرماتوقونی دیده می‌شود؛ ۲: هیچ سلول زایای وجود ندارد، فقط سلول سرتولی دیده می‌شود؛ و ۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می‌شود و لوله‌ها آتروفیک می‌باشند.

**ارزیابی‌های آماری**  
نتایج بر اساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد بیان شدند و با توجه به کمی و پیوسته بودن داده‌ها تعداد گروه‌های مستقل مورد ارزیابی و نیز متعاقب اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها، نتایج این مطالعه با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS ویرایش ۱۸ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار  $P < ۰/۰۵$  برای تعیین سطح معنی- داری بین گروه‌ها درنظر گرفته شد.

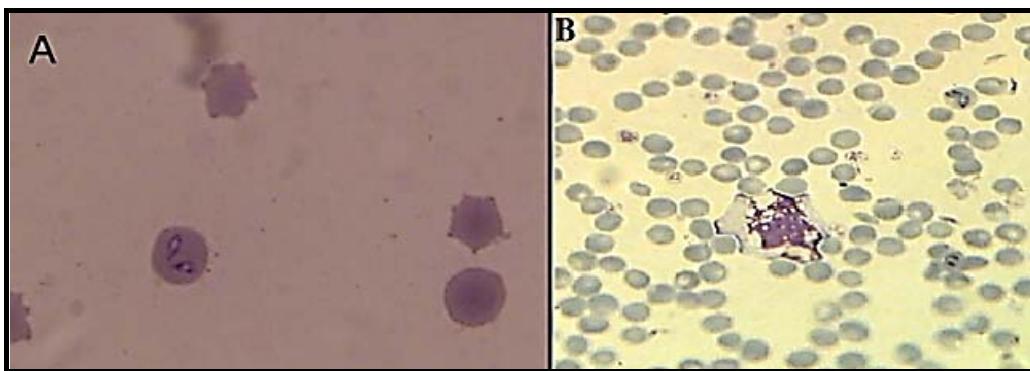
#### نتایج

متعاقب انجام آزمایشات میکروسکوپی و ارزیابی‌های مورفولوژی، بازیابی بازیمینا در خون گاو و موش به صورت گلابی- شکل در گلوبول‌های قرمز مشاهده شد (شکل شماره ۱). بر اساس

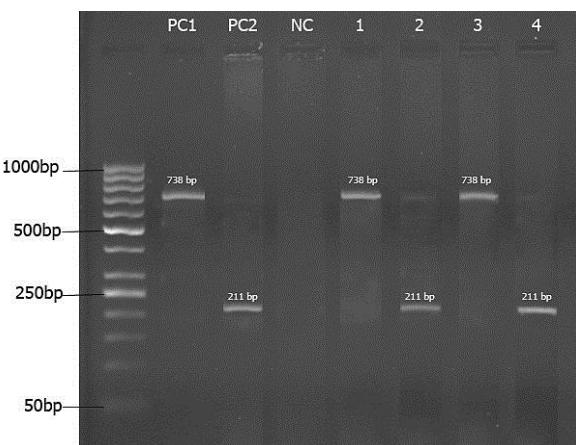
بررسی‌های بافت‌شناسی نمونه‌های بافتی بیضه پس از ثبو، به همراه مشخصات درون ظروف مخصوص قرار گرفتند و بعد از طی مرافق پاساژ بافتی با استفاده از پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. سپس، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرومتر از قالب‌های پارافینی تهیه گردید و درنهایت روش رنگ‌آمیزی هماتو- کسیلین-اوزین جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی قطر لوله‌های اسپرم ساز بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی با استفاده از عدسی چشمی مدرج صورت پذیرفت. شمارش تعداد مقاطع لوله‌های اسپرم ساز در واحد سطح بیضه نیز با استفاده از عدسی چشمی شبک انجام گرفت. سطح مقطع عرضی لوله‌های اسپرم ساز ( $A_C$ ) با استفاده از فرمول  $A_C = \pi D^2 / ۴$  که  $\pi$  برابر با  $۳/۱۴۲$  و  $D$ ، میانگین قطر لوله‌های اسپرم ساز می‌باشد، محاسبه گردید [۱۴]. به منظور مطالعه کیفیت لوله‌های اسپرم- ساز از روش Johnsen استفاده شد [۱۵]. برای این منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله اسپرم ساز در هر حیوان استفاده شد و به هر لوله نمرات یک تا ۱۰ تعلق گرفت. همچنین، درصد لوله‌های اسپرم ساز با بلوغ بالا (نمرات ۹ و ۱۰) نیز مورد محاسبه قرار گرفت [۱۶]. بر اساس الگوی زیر به هر مقطع عرضی لوله اسپرم ساز، نمره داده شد: ۱۰: اسپرماتوئنر کامل، تعداد زیادی سر اسپرم که در حاشیه حفره میانی گرد و منظم قرار دارند؛ ۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد، ولی حفره میانی گرد و منظم دیده نمی‌شود؛ ۸: تعداد اسپرم خیلی کم است؛ ۷:

روش PCR تایید شدند (شکل شماره ۲).

بررسی‌های PCR از نمونه خون یک قطعه ۵۲۰ جفت بازی از گونه‌های بازی بازی تکثیر شد. تمام نمونه‌های مثبت میکروسکوپی به



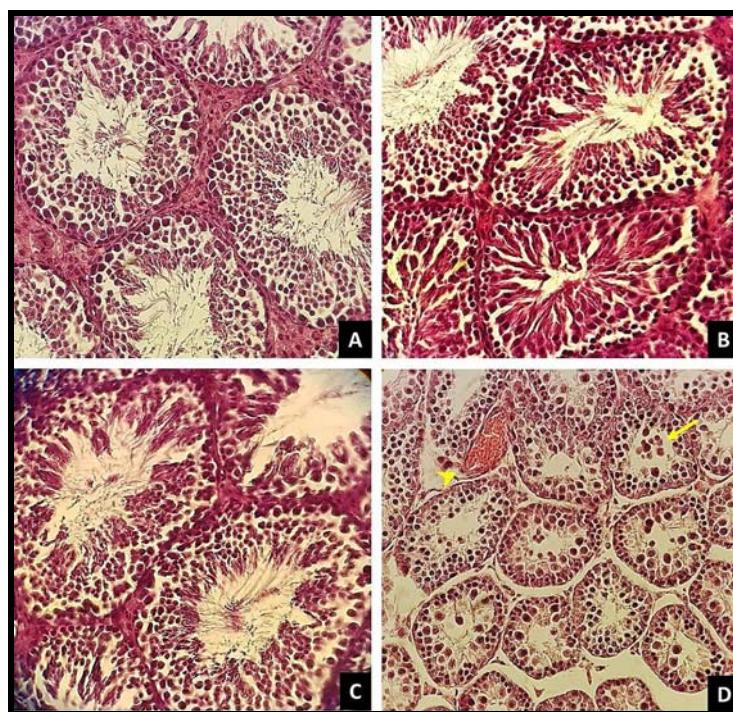
شکل شماره ۱- بازی بازی بازی مینا در گلوبول‌های قرمز خون گاو (A) و موش (B)، رنگ آمیزی گیمسا (درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر)



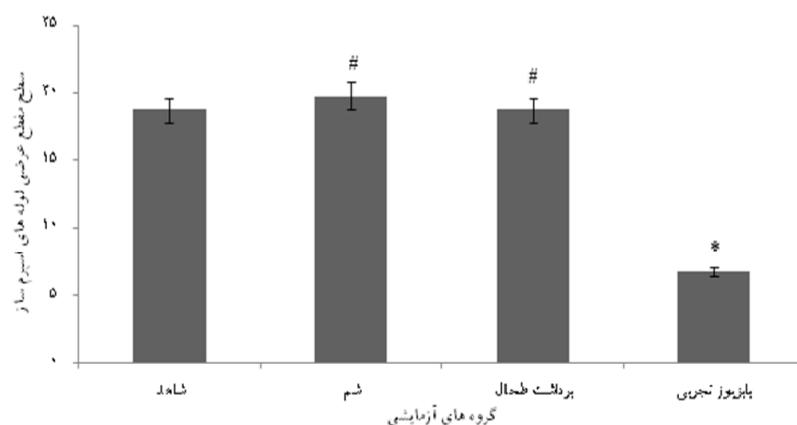
شکل ۲: محصولات بازی بازی مینا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اولیه و پرایمر درونی، خط M: مارکر ملکولی (۱۰۰ جفت باز)، خطوط PC1 و PC2 کنترل مثبت، خط NC: کنترل منفی، خطوط ۱-۲: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از گاو آلوده، خط ۳ و ۴: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از موش آلوده

بلوغ در اپیتیلوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه همراه بود. بررسی‌های استریولوژیک نیز مشخص ساخت که بازیوز تجربی کاهش معنی‌داری را در سطح مقاطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز (نمودار شماره ۴) و تعداد مقاطع لوله‌های اسپرم‌ساز در واحد سطح بیضه (نمودار شماره ۵) در مقایسه با گروه‌های شاهد، شم و برداشت طحال موجب می‌گردد. همچنین، ارزیابی کیفیت و بلوغ لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه نشان داد که بازیوز تجربی کاهش معنی‌داری را در کیفیت (نمودار شماره ۶) و بلوغ (نمودار شماره ۷) لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در مقایسه با گروه‌های شاهد، شم و برداشت طحال موجب می‌گردد.

ارزیابی‌های بافت‌شناسی بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که القاء بازیوز تجربی تغییرات مورفو‌لولوژیک چشمگیری را در بافت بیضه موش موجب می‌گردد (شکل شماره D-۳). در لوله‌های اسپرم‌ساز آتروفی شده بیضه این حیوانات کاهش مشهود اسپرم‌اتوژن و توقف بلوغ همراه با تجمع سلول‌های اسپرم‌اتوژنیک در حفره میانی لوله‌های اسپرم‌ساز در کنار افزایش فضای بین‌توبولی و پرخونی عروقی قابل مشاهده بود. در گروه شاهد (شکل A-۳)، شم (شکل B-۳) و برداشت طحال (شکل C-۳) لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه اسپرم‌اتوژنر فعالی را نشان می‌دادند که این امر با آرایش سازمان یافته سلول‌های اسپرم‌اتوژنیک در مراحل مختلف



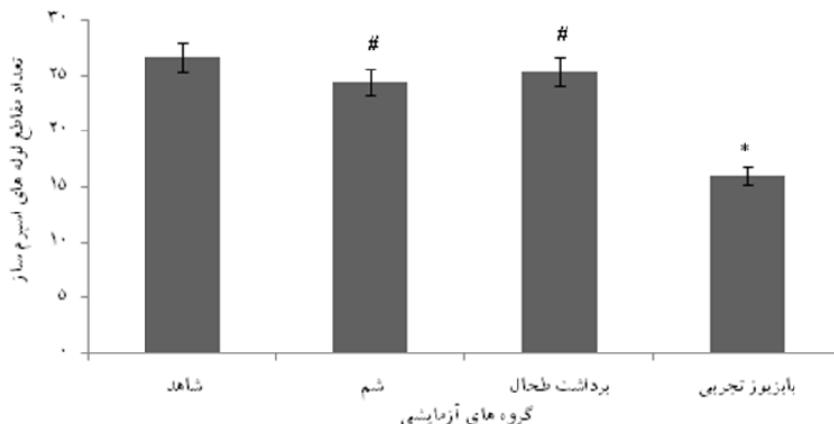
شکل شماره ۳- برش عرضی از بافت بیضه: در گروه شاهد (A)، گروه شم (B) و برداشت طحال (C)؛ لوله‌های اسپرم‌ساز اسپرماتوژنر فعالی را نشان می‌دهند و سلول‌های اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف بلوغ در اپی‌تیلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز قابل رویت می‌باشند. القاء بازیوز تجربی (D)، توقف بلوغ و تجمع سلول‌های اسپرماتوژنیک در حفره میانی لوله‌های اسپرم‌ساز (بیکان)، اختلال در روند طبیعی اسپرماتوژنر، افزایش فضای بین‌توبولی و پرخونی عروقی (سریبکان) را موجب گردیده است. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (درشت نمایی ۴۰۰ برابر).



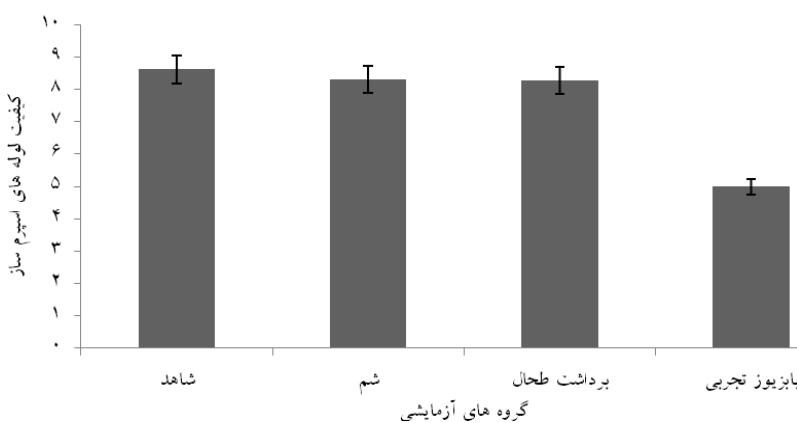
نمودار شماره ۴- مقایسه میانگین سطح مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه ( $10^3 \mu\text{m}^3$ ) در گروه‌های مختلف آزمایشی

\* نشان‌دهنده اختلاف معنی دار با سایر گروه‌ها در سطح  $P < 0.05$  می‌باشد.

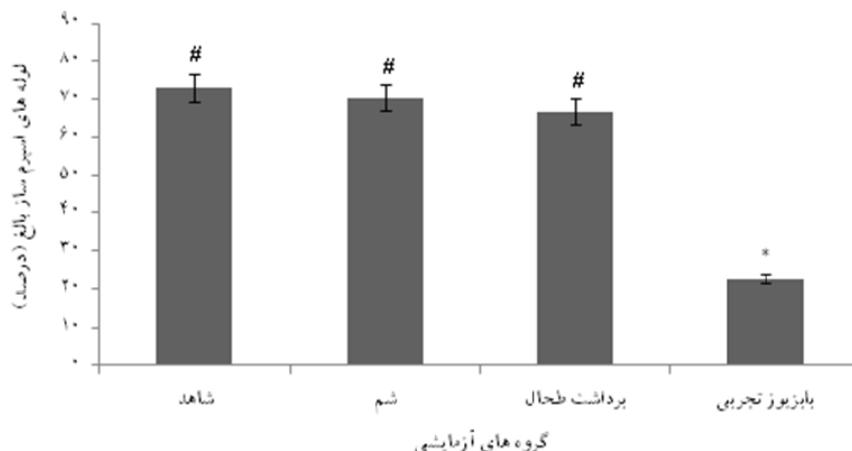
ستون‌های واجد نشانه<sup>#</sup> قادر اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح  $P < 0.05$  می‌باشند.



نمودار شماره ۵- مقایسه میانگین تعداد مکاتع لوله های اسپرم ساز در واحد سطح بیضه ( $\mu\text{m}^2$ ) در گروه های مختلف آزمایشی  
 \* نشان دهنده اختلاف معنی دار با سایر گروه ها در سطح  $P<0.05$  می باشد.  
 ستون های واجد نشانه # فاقد اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح  $P<0.05$  می باشند.



نمودار شماره ۶- مقایسه میانگین کیفیت لوله های اسپرم ساز بیضه در گروه های مختلف آزمایشی بر اساس شاخص Johnsen  
 \* نشان دهنده اختلاف معنی دار با سایر گروه ها در سطح  $P<0.05$  می باشد.  
 ستون های واجد نشانه # فاقد اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح  $P<0.05$  می باشند.



نمودار شماره ۷- مقایسه میانگین بلوغ لوله های اسپرم ساز بیضه در گروه های مختلف آزمایشی بر اساس شاخص Johnsen  
 \* نشان دهنده اختلاف معنی دار با سایر گروه ها در سطح  $P<0.05$  می باشد.  
 ستون های واجد نشانه # فاقد اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح  $P<0.05$  می باشند.

## بحث

مطالعه حاضر این روند را مورد تایید قرار می‌دهند. به علاوه، اختلال در سیالیت و نفوذپذیری غشاء‌های سلولی به دنبال قوع آسیب‌های اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه غشاء می‌تواند زمینه دژنراسیون سلول‌های زایای بیضه را فراهم آورد [۲۸] که این امر کاهشی محسوس را در فراسنجه‌های استریو-لوژیک مانند سطح مقطع عرضی لوله‌ای اسپرم‌ساز و تعداد مقاطع این لوله‌ها در واحد سطح بیضه و نیز کیفیت و بلوغ لوله‌های اسپرم‌ساز بافت بیضه رقم خواهد زد که نمایان‌گر شدت آسیب وارد شده به بافت بیضه در نتیجه از بین رفترن سلول‌های زایا متعاقب آلدگی با بازیا بازیمنا می‌باشد [۱۴]. به علاوه، ثابت گردیده است که کم خونی موجب برانگیختن پاسخ‌های ایمنی می-گردد [۲۹] و بر این اساس چنین برمی‌آید که افزایش نفوذ سلول-های ایمنی که خود از متابع تولید سطوح بالای گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند [۳۰]. به واسطه پی‌ریزی تنش‌های اکسیداتیو در بروز آسیب‌های چشمگیر باقی مشاهده شده متعاقب القاء بازیوز تجربی نقشی قابل توجه ایفاء می‌کند. از سوی دیگر، فعالیت نوتروفیل‌ها و تحریک ترشح سیتوکین‌های پیش‌التهابی توسط این سلول‌ها و نیز افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط لکوستیت‌ها موجب افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های زایای بیضه می‌گردد که این روند نیز قادر است نقش قابل ملاحظه‌ای در بروز اختلالات اسپرماتوژنیک متعاقب کم خونی ناشی از بازیوز ایفاء کند [۳۱]: همچنان‌که تحقیقات به عمل آمده پیشین نیز از افزایش میزان آپوپتوز در بیضه موش‌های صحرایی متعاقب بروز اختلال در فرآیند خون‌رسانی بیضه حکایت دارند [۳۲]. علاوه‌بر این، به خوبی آشکار شده است که بروز تنش‌های سمی اکسیداتیو متعاقب افزایش شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن به واسطه کاهش سطوح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کلیدی در سلول‌های لیدیگ به کاهش ترشح تستوسترون منجر می‌گردد [۳۳]. با توجه به این که اسپرماتوژندر انسان و جوندگان در صورت بروز نقص در حمایت اندوکرینی دچار اختلالات شدید می‌گردد [۳۴]. اختلالات اسپرماتوژنیک مشاهده شده در موش‌های آلد شده با بازیا بازیمنا می‌تواند با سطوح پایین آندروژن‌ها در ارتباط باشد [۳۵]. همچنین، با توجه به نقش اساسی سلول‌های سرتولی در تکامل ساختاری و روند بلوغ سلول‌های زایا در بافت بیضه [۳۶]، چنین به نظر می‌رسد که اختلال در اتصال وابسته به آندروژن سلول‌های سرتولی به سلول‌های زایای بیضه متعاقب القاء بازیوز می‌تواند روند طبیعی اسپرماتوژنر را مختل نماید [۳۷] و به ازهم‌گسیختگی اپی‌تیلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه و تغیرات ساختاری مشهود در این بافت منجر گردد. نتایج حاصل از مطالعات پیشین

بازیا دومین انگل خونی شایع در پستانداران پس از تریپانوزوما می‌باشد و امروزه بازیوز به عنوان یک بیماری مشترک نوپدید بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است [۱۷]. کم خونی همولیتیک به عنوان شاخص ترین نشانه بالینی پیشرفت بیماری می-تواند به اختلال در خون‌رسانی و هپیوکسی بافتی منجر گردد [۱۸] که این امر زمینه آسیب و مرگ سلولی را فراهم می‌آورد [۱۹]. از سوی دیگر، هر چند بهبود روند خون‌رسانی قادر به نجات بافت-های درگیر خواهد بود، اما خود نیز می‌تواند موجبات بروز جراحات بیشتری را فراهم آورد [۲۰] که این نکته نقش بارز پیشگیری از ابتلاء به بازیوز را مدنظر قرار می‌دهد. بررسی‌های متعدد صورت گرفته نشان داده است که اختلال در جریان خون-رسانی بیضه به واسطه کاهش اکسیژن مورد نیاز جهت فعالیت‌های متابولیک، تخلیه اثری ذخیره شده سلولی و نیز تجمع متابولیت-های سمی، آتروفی، تغیرات دژنراتیو و مرگ سلول‌های زایای این بافت را در پی خواهد داشت [۲۱]. از آنجایی که ارزیابی‌های کمی بافت‌شناسی می‌توانند جزئیات قابل توجهی در رابطه با میزان تغییرات ساختاری متعاقب بروز آسیب‌های بافتی ارائه دهند [۲۲]، یافته‌های مطالعه حاضر نیز که در راستای ارزیابی پیامدهای بازیوز تجربی ناشی از بازیا بازیمنا در بافت بیضه موش پی‌ریزی شده بود، دژنراسیون سلول‌های اپی‌تیلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز بافت بیضه را آشکار ساخت؛ به گونه‌ای همسو با گزارشات پیشین با کاهش محسوس فراسنجه‌های استریولوژیکی و شاخص‌های اسپرماتوژنیک همراه بود [۲۲، ۲۳]. همچنین، به خوبی مشخص شده است که کم خونی همولیتیک و تخریب گلوبول‌های قرمز سبب کاهش ظرفیت انتقال اکسیژن و افزایش ذخیره آهن بافتی می‌گردد که این فرآیند به واسطه تشدید تولید رادیکال‌های آزاد زمینه‌ساز جراحات بافتی خواهد بود [۲۴] که این امر با نتایج حاصل از ارزیابی‌های بافت-شناسی مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد. در همین راستا، تحقیقات پیشین نشان داده است که کاهش خون‌رسانی بافتی با افزایش شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن همراه است [۲۵]. این گونه‌های فعال اکسیژن علاوه بر این که به واسطه پراکسیداسیون لبیدی موجبات آسیب غشاء‌های سلولی به صورت مستقیم را فراهم می-آورند، سبب تحریک فعالیت و کمotaکسی لکوستیت‌ها به واسطه فعال‌سازی فسفولیپاز A<sub>2</sub> و افزایش میزان چسبندگی لکوستیت‌ها به اندوتیلیوم عروقی نیز می‌گردد [۲۶]. لکوستیت‌های فعال نیز به واسطه تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پروتازها و الاستازها، افزایش نفوذپذیری عروق خونی کوچک، ادم و مرگ سلول‌های پارانشیمی را رقم خواهند زد [۲۷] که یافته‌های ارزیابی‌های بافت‌شناسی

به فقدان سنجش عیار سرمی و داخل بیضه‌ای تستوسترون اشاره نمود.

### نتیجه‌گیری

در نهایت، چنین به نظر می‌رسد که کم خونی و جراحات عروقی نظیر انسداد عروقی و پرخونی بافتی متعاقب آن در بازپیوز تجربی ممکن است به واسطه ایجاد اختلال در فعالیت‌های متابولیک و روند بلوغ سلول‌های اسپرماتوژنیک، پی‌ریزی تنش‌های اکسیدا-تیو و پاسخ‌های ایمنی و نیز القاء آپوپتوز سلولی منجر به آسیب-های بافتی بیضه در موش‌های آلوده با بازپیازی بازیمینا گردد. از این‌رو، بررسی روند شکل‌گیری تنش‌های اکسیدا-تیو و بروز آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوژنیک و نیز ارزیابی خصوصیات و توان باروری اسپرم متعاقب القاء بازپیوز تجربی در حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند به آشکارسازی دقیق روند بیماری‌زایی منجر گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری دامپزشکی دانشگاه ارومیه به شماره ۱۵۱۵ می‌باشد. بدین‌وسیله، از دانشگاه ارومیه به سبب تأمین مالی این مطالعه صمیمانه قدردانی می‌گردد.

### References:

- [1] Uilenberg G. Babesia-a historical overview. *Vet Parasitol* 2006; 138(1-2): 3-10.
- [2] Ahmed J, Yin H, Schnittger L, Jongejan F. Ticks and tick-borne diseases in Asia with special emphasis on China. *Parasitol Res* 2002; 88(13 Suppl 1): S51-5.
- [3] Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattle. *Vet Parasitol* 2008; 158(4): 295-301.
- [4] Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(3): 451-69.
- [5] Hamoda AF, Radwan M, Rashed R, Amin A. Toxic effect of babesiosis in cattle and chemotherapeutic treatment in Egypt. *Am J Infect Dis Microbiol* 2014; 2(5): 91-6.
- [6] Jankovic Velickovic L, Stefanovic V. Hypoxia and spermatogenesis. *Int Urol Nephrol* 2014; 46(5): 887-94.
- [7] Mozafari AA, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinjad H, Mardani K. Protective effect of ethyl pyruvate on mice sperm parameters in phenylhydrazine induced hemolytic anemia. *Vet Res Forum* 2016; 7(1): 63-8.
- [8] Jalali AS, Behfar M, Nourian A. Testicular torsion treatment as a male reproductive health concern. *J Trauma Treat* 2016; 5(3): 329.
- [9] Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4): 622-36.
- [10] Khamesipour F, Doosti A, Koohi A, Chehelgerdi M, Mokhtari Farsani A, Chengula AA. Determination of the presence of Babesia DNA in blood samples of cattle, camel and sheep in Iran by PCR. *Arch Biol Sci* 2015; 67(1): 83-90.
- [11] Akel T, Mobarakai N. Hematologic manifestations of babesiosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017; 16(1): 6.
- [12] Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. Chemoprotective effect of *Crataegus monogyna* aqueous extract against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Vet Res Forum* 2011; 2(4): 266-73.
- [13] Sivakumar T, Altangerel K, Battsetseg B, Battur B, Aboulaila M, Munkhjargal T, et al. Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay. *Vet Parasitol* 2012; m187(1-2): 17-22.
- [14] Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. *Achillea millefolium* inflorescence aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Chin J Nat Med* 2012; 10(4): 247-54.

نشان داده است که اختلالات ساختاری گلبول‌های قرمز متعاقب آلودگی تجربی با انگل‌های خونی می‌تواند موجبات انسداد عروق خونی پیش و پس‌مویرگی بافت بیضه و درنهایت توقف کامل جریان خون در این عروق را فراهم آورد که این امر با مرگ سلول‌های زایای بیضه و نیز آسیب لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه به-واسطه آسیب عروقی بافت بیضه و کاهش جریان خون آن همراه خواهد بود [۳۸]. بنابراین، محتمل به نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر نیز آسیب عروق خونی کوچک، افزایش نفوذپذیری این عروق و نیز اختلال در روند خون‌رسانی متعاقب تخریب گلبول‌های قرمز در موش‌های آلوده با بازپیازی بازیمینا منجر به دژنرasiون سلول‌های زایای بیضه و ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در این بافت می‌گردد [۳۹-۴۱]. همچنین، یافته‌های بررسی حاضر گزارشات اخیر دیگری در این زمینه را نیز تأیید می‌کنند که بر نقش آسیب‌های عروقی، اختلال در نفوذپذیری عروقی و نقص خون‌رسانی بافتی در پیدایش آسیب‌های بافتی کلیه و کبد در موش‌های صحرایی آلوده شده با بازپیازی بازیمینا تأکید دارند [۵]. یافته‌های این مطالعه تجربی لزوم پیشگیری از بازپیوز را به عنوان یک بیماری مشترک رویه‌افزایش بیش از پیش مورد تأیید قرار می-دهند. با این وجود، از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان

- [15] Johnsen SG. Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970; 1(1): 2–25.
- [16] Ghasemi FM, Faghani M, Khajehjahromi S, Bahadori M, Nasiri E, Hemadi M. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in spermatogenic cells in mouse under chemotherapy. *J Reprod Contracept* 2010; 21(2): 79–94.
- [17] Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol* 2008; 38(11): 1219–37.
- [18] Vannier E, Gewurz BE, Krause PJ. Human Babesiosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22(3): 469–ix.
- [19] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digest Dis Sci* 2004; 49(9): 1359–77.
- [20] Cho SS, Rudloff I, Berger PJ, Irwin MG, Nold MF, Cheng W, et al. Remifentanil ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 69.
- [21] Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Creczynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med* 2004; 25(1-2): 199–210.
- [22] Yurtcu M, Abasiyanik A, Biçer S, Avunduk MC. Efficacy of antioxidant treatment in the prevention of testicular atrophy in experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg* 2009; 44(9): 1754–8.
- [23] Karaguzel E, Kutlu Ö, Yuluğ E, Mungan S, Kazaz IO, Tok DS, et al. Comparison of the protective effect of dipyridamole and acetylsalicylic acid on long-term histologic damage in a rat model of testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2012; 47(9): 1716–23.
- [24] Lesniewsky EJ. Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 129–46.
- [25] Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger HG, et al. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106(3): 629–36.
- [26] Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999; 49(2): 91–102.
- [27] Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999; 126(3): 537–50.
- [28] Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004; 25(1): 5–18.
- [29] Naughton BA, Dornfest BS, Bush ME, Carlson CA, Lapin DM. Immune activation is associated with phenylhydrazine-induced anemia in the rat. *J Lab Clin Med* 1990; 116(4): 498–507.
- [30] Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21(1): 33–44.
- [31] Lysiak JJ, Nguyen QA, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol Reprod* 2003; 69(1): 202–10.
- [32] Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int* 2006; 22(1): 99–105.
- [33] Cao L, Leers-Sucheta S, Azhar S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *J Ster Biochem Mol Biol* 2004; 88(1): 61–7.
- [34] McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 149–79.
- [35] Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology* 2006; 222(1-2): 60–70.
- [36] Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004; 25(5): 747–806.
- [37] Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadrad A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human Exp Toxicol* 2008; 27(12): 901–10.
- [38] Shamaei-Tousi A, Collin O, Bergh A, Bergström S. Testicular damage by microcirculatory disruption and colonization of an immune-privileged site during *Borrelia crocidurae* infection. *J Exp Med* 2001; 193(9): 995–1004.
- [39] Athanasou NA, Hatton C, McGee JO, Weatherall DJ. Vascular occlusion and infarction in sickle cell crisis and the sickle chest syndrome. *J Clin Pathol* 1985; 38(6): 659–64.
- [40] Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir-Naghadeh B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. *Vet Parasitol* 2012; 185(2-4): 124–30.
- [41] Jalali AS, Esmaeilnejad B. Babesiosis as a male infertility risk factor. *J Vet Med Health* 2017; 1: e001.