نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۳؛ ۱۸(۲): ۲۷-۳۷.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2024.14859.1096

مقایسه اثر محافظتی ویتامین ب۱۲ و ویتامین ث بر هیستوپاتولوژی بافت بیضه در موارد ایسکمی حاد متعاقب چرخش طناب بیضه در موش صحرایی

محمدعلی نظم‌آبادی‌نژاد[۱]، مسعود ایمانی[۲*]، همایون بابایی[۲]، امید آذری[۳]، شهرزاد عزیزی[۴]، فاطمه قائینی[۵]

۱. دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان- ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان- ایران.
۵. دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان- ایران.

دریافت: ۳۰ تیرماه ۱۴۰۳ **پذیرش:** ۲۴ مهرماه ۱۴۰۳

چکیده

چرخش بیضه می‌تواند به ایسکمی حاد و آسیب بیضه منجر شود. یکی از دلایل آسیب بیضه ناشی از ایسکمی، آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که موجب ناپایداری غشای سلولی و مرگ سلول‌ها می‌شود. در این مطالعه، اثر محافظتی ویتامین‌های ب۱۲ و ث، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، در کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی بیضه پس از چرخش طناب بیضه مورد مقایسه قرار گرفت. در این راستا، ۲۰ سر موش صحرایی به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. گروه اول به‌عنوان شاهد بدون هیچ‌گونه دخالتی در نظر گرفته شد. گروه دوم تنها تحت چرخش بیضه به مدت دو ساعت قرار گرفت و پس از اصلاح چرخش هیچ‌گونه درمانی دریافت نکرد. گروه‌های سوم تا پنجم به ترتیب نیم ساعت قبل از اصلاح چرخش ۵ میکروگرم ویتامین ب۱۲ به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، ۵۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن ویتامین ث و ترکیبی از ویتامین ب۱۲ و ویتامین ث دریافت نمودند. چرخش بیضه باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع اپیتلیال در لوله‌های منی‌ساز، قطر لوله‌های منی‌ساز و رتبه‌بندی جانسون در مقایسه با گروه‌های شاهد و درمانی گردید ($P<0/05$). شدت تغییرات دژنراتیو و رتبه‌بندی جانسون در بین سه گروه درمان تقریباً مشابه بوده و تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند؛ ولی با گروه چرخش و کنترل سالم تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$). این نتایج نشان می‌دهد که ویتامین‌های ب۱۲ و ث می‌توانند به‌عنوان بخشی از یک برنامهٔ درمانی جامع در مدیریت آسیب‌های متعاقب چرخش طناب بیضه مورد استفاده قرار گیرند و سبب بهبود شانس باروری شوند.

واژه‌های کلیدی: ویتامین ث، ویتامین ب۱۲، ایسکمی حاد، هیستوپاتولوژی، بیضه.

مقدمه

چرخش بیضه یکی از موارد اورژانسی در جراحی دستگاه اداری تناسلی محسوب می‌شود که از شیوع نسبتا بالایی برخوردار است (۳۰). ضایعات ایجاد شده در بیضه در اثر چرخش و به دلیل ایسکمی حاصله می‌تواند موجب آسیب بیضه شود (۱۴). علل اصلی ایجاد این عارضه بیشتر علل ساختاری بوده و به ترتیب اهمیت عبارت‌اند از: مشکلات مادرزادی تونیکاواژینالیس و طناب بیضه که در ۹۰٪ موارد ارجاعی تأیید شده است (۸)، ضربه یا تحرک زیاد نیز در ۴ تا ۸ ٪موارد ارجاعی گزارش شده است (۳۰). چرخش بیضه به علت انسدادی که در ورید و شریان بیضه ایجاد می‌کند باعث کاهش خون رسانی به بافت بیضه و ایجاد ایسکمی می‌شود. جراحات ناشی از ایسکمی از ۴ تا ۳۴ ساعت بعد از چرخش بیضه و بسته شدن چرخش می‌باشد (۳۰). میزان چرخش از ۱۸۰ تا ۷۲۰ درجه متفاوت می‌باشد که بعد از عمل جراحی تعیین می‌شود

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: masud.imani@uk.ac.ir

(۳۰). یکی از دلایل آسیب بیضه ناشی از ایسکمی، آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که این رادیکال‌های آزاد موجب ناپایداری غشاء سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها می‌شود (۱۹). بنابراین یکی از راهکارهایی که جهت درمان ضایعات ناشی از ایسکمی بیضه بعد از برگرداندن چرخش توصیه می‌گردد، استفاده از مواد و داروهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۲۷). باید توجه شود که عدم درمان در زمان مناسب می‌تواند به عقیمی یک یا هر دو بیضه منجر شود (۲۳). برای درمان عارضه فوق در اولین مرحله بهترین کار چرخاندن بیضه در عکس جهت پیچش می‌باشد. درحالت چرخش ضعیف این کار با ملامسه و پیچاندن بیضه قابل انجام و کاربردی است. درصورتی که با این کار بیضه به حالت طبیعی برنگردد، جراحی تنها راه درمان عارضه فوق می‌باشد (۳۰). البته امروزه با توجه به کشف مکانیسم تخریب بافتی به علت ایجاد استرس اکسیداتیو متعاقب برطرف کردن ایسکمی، محققان به دنبال استفاده از داروهای مناسب جهت جلوگیری از تخریب بافت‌های مختلف به دنبال برطرف کردن ایسکمی می‌باشند و در این موارد عموما داروهای مورد استفاده در تحقیقات آنتی‌اکسیدان ها و ویتامین‌های ضروری می‌باشند (۲۰). ویتامین ب۱۲ (کوبالامین) جزء ویتامین‌های ضروری محلول در آب می‌باشد که برای عملکرد طبیعی سلول‌های عصبی ضروری می‌باشند. کمبود بالینی ویتامین ب۱۲ به ندرت در اثر اختلالات ژنتیکی در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد و علائم بالینی آن به‌صورت میلونوروپاتی وکم خونی مگالوبلاستیک می‌باشد (۲۰). اما نظریاتی وجود دارد که کمبود تحت بالینی ویتامین ب۱۲ در طول زمان باعث جابجایی مواد مغذی به سمت روندهایی می‌شود که برای زنده بودن آنی سلول‌های بدن مورد نیاز هستند و این امر سلامت طولانی مدت را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳). به نظر می‌رسد تاثیرات ناشی کمبود تحت بالینی ویتامین ب۱۲ بر روی سلول‌های بدن ناشی از وقوع استرس اکسیداتیو باشد (۱۸). ویتامین‌ب۱۲ دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد وکمبود تحت بالینی آن در طول زمان باعث افزایش سطح استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۱). مکانیسم دقیق اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین ب۱۲ هنوز مشخص نیست اما به نظر می‌رسد ویتامین ب۱۲ از طریق فعال‌سازی مسیرهای آنزیمی باعث جمع آوری سوپراکسیدها از سطح سلول می‌شود. همچنین ویتامین ث دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد و محققان نشان داده‌اند که تجویز ویتامین ث در دوره حاد ایسکمی می‌تواند به شیوه موثری اثرات تخریبی ناشی از چرخش بیضه را تعدیل نماید (۲۵). ویتامین ث یکی از مهم‌ترین و متداول‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های بدن موجودات زنده، در محافظت از بافت‌ها در مقابل رادیکال‌های آزاد و مواد اکسیدکننده است‌که نقش مهمی در عملکرد طبیعی بدن دارد و در سال‌های گذشته نیز فرضیه‌ها زیادی در مورد ارتباط آن با باروری مطرح شده است (۲۸). گرچه مکانیسم‌های دقیق اثر تخریب ناشی از ایسکمی حاد در بافت‌های بدن هنوز مشخص نیست اما یکی از آثار چرخش عروق خونرسان، القای استرس اکسیداتیو می‌باشد. با توجه به عدم کفایت درمان جراحی در جلوگیری از تخریب بافت ایسکمی شده و لزوم استفاده از داروهای کمکی برای جلوگیری از تخریب بافت بیضه، دراین تحقیق تلاش خواهیم کرد تا اثر بهبود دهنده احتمالی ویتامین ب۱۲ بر تخریب ناشی از ایسکمی به دنبال چرخش بیضه در بافت بیضه موش صحرایی در مقایسه با اثر محافظتی ویتامین ث را از طریق معیارهای هیستوپاتولوژیک مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش کار

کلیه بررسی‌ها بر اساس اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات تحقیقاتی انجام شده و به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه شهید باهنر رسیده است (کد اخلاق: IR.UK.VETMED.REC.1399.011). در مطالعه حاضر تعداد ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ از محل

نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه تحقیقاتی رازی کرمان خریداری شدند. این حیوانات دارای وزن متوسط۲۰۰ گرم و سن بین ۲- ۱/۵ ماه بودند. جهت تطابق با شرایط محیطی جدید، به مدت یک هفته در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی قرار گرفتند و در طول مدت مطالعه به آب و غذا به‌صورت آزادانه دسترسی داشتند. شرایط نوری محیط نگهداری به‌صورت ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای محیط ۲±۲۲ درجه سانتی گراد تنظیم شده بود. ویتامین ب ۱۲ استفاده شده در این مطالعه شامل آمپول ۱ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰۰میکروگرم ویتامین ب ۱۲ (شرکت داروپخش، ایران) بوده است. ویتامین ث استفاده شده در این مطالعه شامل آمپول ۵ میلی‌لیتری حاوی۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین ث (شرکت داروپخش، ایران) بوده است. در این مطالعه القای بیهوشی توسط تزریق زایلازین (شرکت آلفاسان، هلند)۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن و کتامین (شرکت آلفاسان، هلند) ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش داخل عضلانی صورت گرفت و سپس اسکروتوم جهت عملیات جراحی آماده و با بتادین ۱۰٪ اسکراب شد. برش در خط وسط اسکروتوم بیضه چپ ایجاد شد و سپس بیضه از محل خود خارج گردید. بعد از خارج کردن بیضه از اسکروتوم بدون آن که از تونیکا واژینالیس خارج گردد ۷۲۰ درجه در خلاف جهت حرکت عقربه‌های ساعت چرخانده شد. سپس با یک بخیه ثابت کننده (ساده تکی) که از تونیکا واژینالیس و عضله دارتوس عبور می‌کرد، به مدت ۲ ساعت بیضه در حالت چرخش به کیسه بیضه توسط نخ ۶ صفر متصل نگه داشته شد. پس از این مرحله، بخیه اسکروتوم صورت گرفت. سپس بعد از ۲ ساعت مجددا موش‌ها را بیهوش کرده و طبق مراحل قبل بیضه را خارج نموده و به مدت ۸ ساعت بیضه را در حالت نرمال و بدون چرخش برگردانده ودوباره اسکروتوم بخیه گردید. موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه ۵ تایی تقسیم شدند: گروه اول: گروه شاهد که هیچ درمانی را دریافت نکردند. گروه دوم: بعد از بیهوشی بیضه چپ از داخل برشی روی پوست اسکروتوم خارج شده و به مدت ۲ ساعت تحت چرخش ۷۲۰ درجه (خلاف جهت عقربه های ساعت) قرار گرفتند. بعد از ۲ ساعت، اصلاح چرخش بدون هیچ درمانی انجام شد. گروه سوم تا پنجم هر سه گروه بعد از بیهوشی بیضه چپ از داخل برشی روی پوست اسکروتوم خارج شده و به مدت۲ ساعت تحت چرخش ۷۲۰ درجه (خلاف جهت عقربه های ساعت) قرار گرفتند. سپس به ترتیب نیم ساعت قبل از اصلاح چرخش به‌صورت تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم ویتامین ب۱۲ ،۵۰۰ میلی گرم ویتامین ث به‌ازای هر کیلوگرم ، ۵۰۰ میکروگرم ویتامین ب ۱۲ و ۵۰ میلی گرم ویتامین ث به‌ازای هر کیلوگرم دریافت کردند. بعد از گذشت ۸ ساعت پس از برگرداندن بیضه ها به حال نرمال، مجددا موش به وسیله تزریق عضلانی زایلازین۱۰ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم و کتامین۱۰۰ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم بیهوش شدند. موش‌های همه گروه‌ها به روش انسانی کشتار شدند. پس از باز کردن اسکروتوم، هر دو بیضه جهت نمونه‌گیری هیستوپاتولوژیک از بدن خارج و به محلول بوئن انتقال داده شد و ۲۴ ساعت بعد محلول آن تعویض گردید. سپس بعد از گذشت یک هفته نمونه‌ها جهت برش و گرفتن مقاطع بافتی به آزمایشگاه هیستوتکنیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شدند. سپس قطعات کوچکتر از هر نمونه تهیه شد و برای گذراندن مراحل آبگیری، شفاف‌سازی و آغشتگی به پارافین به مدت ۱۵ ساعت در دستگاه اتوتکنیکون قرار داده شد. در مرحله بعدی نمونه‌ها توسط پاراف‌ین مذاب قالب‌گیری گردید و برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد. مقاطع تهیه شده با استفاده از حرارت و گزیلول پارافین‌زدایی شدند و پس از آب‌دهی در محلول‌های الکل ۹۸، ۸۰ و ۷۰ درصد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی لام‌ها علاوه بر مشاهدات

مورفولوژیک بافت بیضه در زیر میکروسکوپ، از یک سری شاخص‌ها نیز جهت ارزیابی آماری نمونه‌ها استفاده شد. برای این منظور از پارامترهای قطر لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز و رتبه‌بندی جانسون استفاده شد. برای اندازه‌گیری این شاخص‌ها، در هر مقطع ۱۰ عدد از گرد ترین لوله‌ها به‌صورت تصادفی مشخص و زیر میکروسکوپ نوری مدرج اندازه‌گیری و ارزیابی شد. رتبه‌بندی جانسون فاکتور کامل و جامعی بوده و جهت ارزیابی و وجود سلول‌های مختلف مراحل اسپرماتوژنز مورد استفاده قرار می‌گیرد (جدول ۱).

جدول ۱- رتبه‌بندی جانسون

رتبه‌بندی	یافته‌های هیستوپاتولوژیک
۱	عدم وجود هرگونه سلول داخل لوله‌ها
۲	عدم وجود هر گونه سلول زایایی داخل لوله‌ها، فقط حضور سلول‌های سرتولی
۳	فقط حضور سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی
۴	تعداد زیادی سلول اسپرماتوگونی، کمتر از پنج عدد سلول اسپرماتوسیت، عدم وجود سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزوآ
۵	تعداد زیادی سلول اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت، عدم وجود سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزوآ
۶	تعداد زیادی سلول اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت، ۵-۲۰ عدد سلول اسپرماتید، عدم وجود اسپرماتوزوآ
۷	تعداد زیادی سلول اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید، عدم وجود اسپرماتوزوآ
۸	حضور ۵-۱۰ عدد اسپرماتوزوآ
۹	تعداد زیادی اسپرماتوزوآ، اپیتلیوم زایای نامرتب با سلول‌های زایای فاصله‌دار، ازهم‌گسیختگی لومن لوله‌ها
۱۰	اسپرماتوژنز کامل، تعداد زیاد اسپرماتوزوآ، اپیتلیوم زایای کاملاً مرتب و قطر طبیعی لومن لوله‌ها

اطلاعات به‌دست‌آمده به‌وسیله نرم‌افزار SPSS و با استفاده از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. برای بررسی معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ از آنالیز آماری تعقیبی توکی استفاده شد.

نتایج

نتایج این مرحله از مطالعه شامل بررسی کمی و مورفومتریک و همچنین بررسی توصیفی پاتولوژیک بافت بیضه موش‌های صحرایی است. نتایج حاصل از بررسی مورفومتریک اثر ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ بر بافت آسیب‌دیده بیضه موش صحرایی و اندازه‌گیری پارامترهای گفته شده در جداول زیر ذکر شده است. میانگین رتبه‌بندی جانسون و میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های مطالعه در جدول ۲ ذکر شده است. همان‌طور که در جدول مشخص شده است درمان با ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ و هردو با هم باعث کاهش معنی‌دار رتبه‌بندی جانسون در تمام گروه‌های درمان نسبت به گروه کنترل گردیده است ($P<۰/۰۵$). درمان با ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ و هردو با هم باعث افزایش معنی‌دار رتبه‌بندی جانسون در گروه‌های درمان نسبت به حالت چرخش بدون درمان شده است ($P<۰/۰۵$). همچنین درمان با ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ و هر دو با هم باعث کاهش معنی‌دار قطر لوله‌های منی‌ساز در تمام گروه‌های درمان نسبت به گروه کنترل گردید ($P<۰/۰۵$). قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه درمان با ویتامین ب ۱۲ نسبت به گروه چرخش بدون درمان تفاوت معنی‌داری نداشت ($P<۰/۰۵$). قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه درمان با ویتامین ث و گروه درمان ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ با هم به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه چرخش بدون درمان کاهش یافته بودند ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- رتبه‌بندی جانسون و میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز بر حسب میکرومتر در گروه‌های مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

گروه درمان	تعداد مقاطع بررسی شده	میانگین± خطای استاندارد رتبه جانسون	میانگین ± خطای استاندارد قطر لوله‌های منی‌ساز (µm)
کنترل	۴	۸/۷۶±۰/۰۹^{a}	۳۷۲/۷۶±۴/۰۹^{a}
چرخش	۴	۴/۶۲±۰/۴۵^{b}	۲۸۳/۲۵±۲/۴۶^{b}
چرخش همراه با ویتامین ث	۴	۶/۱۰±۰/۳۳^{c}	۲۷۰/۷۵±۰/۹۴^{c}
چرخش همراه با ویتامین ب ۱۲	۴	۶/۷۵±۰/۲۰^{c}	۲۸۶±۰/۲۹^{b}
چرخش همراه با ویتامین ث و ب ۱۲	۴	۶/۷۲±۰/۱۳^{c}	۲۵۳/۵۰±۰/۴۹^{d}

موارد دارای حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).

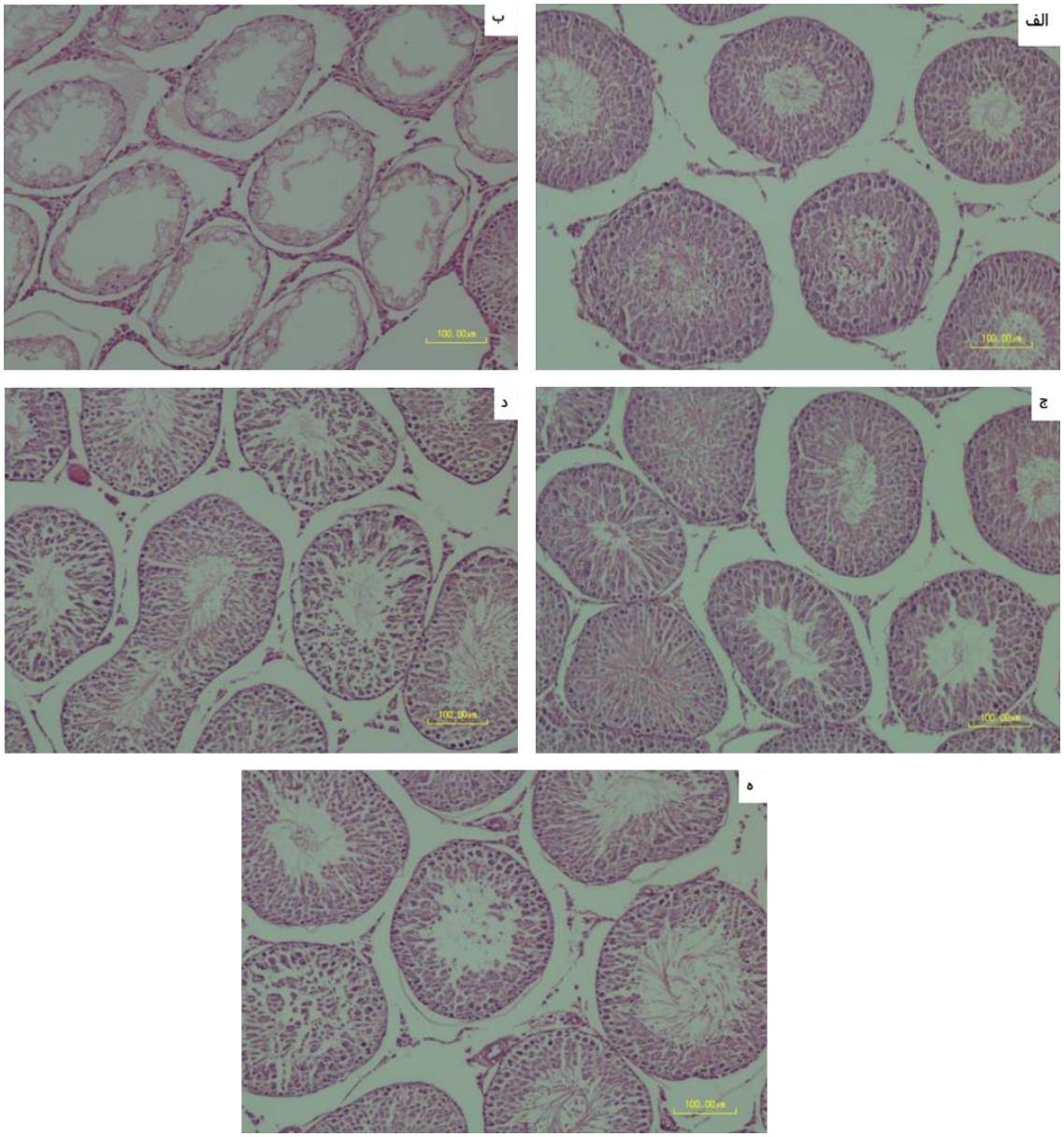
میانگین ارتفاع اپیتلیوم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که در جدول مشخص شده است درمان با ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ و هر دو با هم باعث کاهش معنی‌دار قطر لوله‌های منی‌ساز در تمام گروه‌های درمان شده نسبت به گروه کنترل گردید (P<۰/۰۵). ارتفاع اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه درمان با ویتامین ث نسبت به گروه چرخش بدون درمان تفاوت معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۵). ارتفاع اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه درمان با ویتامین ب ۱۲ و گروه درمان ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ با هم به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه چرخش بدون درمان کاهش یافته بودند (P<۰/۰۵).

جدول ۳- میانگین ارتفاع اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز بر حسب میکرومتر در گروه‌های مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

گروه درمان	تعداد مقاطع بررسی شده	میانگین± خطای استاندارد
کنترل	۴	۱۰۵/۳۷±۱/۳۴^{a}
چرخش	۴	۹۴±۱/۶۱^{b}
چرخش همراه با ویتامین ث	۴	۹۵/ ۵۰±۱/۵۹^{b}
چرخش همراه با ویتامین ب ۱۲	۴	۸۶/۷۵±۲/۳۶^{c}
چرخش همراه با ویتامین ث و ب ۱۲	۴	۹۳/۲۵±۲/۲۱^{b}

موارد دارای حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).

در گروه کنترل، بافت طبیعی بیضه دارای لوله‌های منی‌ساز طبیعی بودند. در داخل لوله‌ها رده‌های مختلف سلول‌های زایا مشاهده می‌شدند. تمام رده‌های سلول‌های زایا شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، انواع اسپرماتیدها به‌صورت سازمان‌یافته و منظم در بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز وجود داشتند. اسپرماتوزوا فراوان در بیشتر مجاری لوله‌ها مشاهده شدند. در گروه‌های چرخش بدون درمان، بررسی‌های هیستوپاتولوژیک تغییرات دژنراتیو شدیدی را نشان داد. لوله‌های منی‌ساز کوچک و چین‌خورده بودند و کاهش شدید سلول‌های زایا در اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز مشهود بوده است. به دلیل ازدست‌رفتن سلول‌های زایا فضاهای خالی متعدد در داخل بافت پوششی ایجاد کرده بودند. بعضی لوله‌ها فاقد سلول زایا بودند و یا در بعضی فقط سلول‌های سرتولی دیده می‌شد. در گروه‌های درمانی ویتامین ث، ویتامین ب ۱۲ و ترکیب ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ تغییرات دژنراتیو نسبت به گروه چرخش کمی کاهش پیدا کرده بود. تغییرات دژنراتیو ضعیف تا متوسط شامل فاصله افتادن بین سلول‌ها، کاهش ردیف‌های سلول‌های زایا و اسپرم در لوله‌ها مشاهده شد. شدت تغییرات دژنراتیو و رتبه‌بندی جانسون در بین سه گروه درمان تقریباً مشابه بوده و تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند؛ ولی با گروه چرخش و کنترل سالم تفاوت معنی‌داری را نشان دادند.



شکل ۱– مقاطع هیستوپاتولوژی (الف) ساختار طبیعی لوله های منی‌ساز، کنترل (ب) تغییرات دژنراتیو لوله های منی‌ساز، کاهش شدید سلول‌های زایا و ایجاد فضاهای خالی در بافت پوششی لوله های منی‌ساز، چرخش (ج) تغییرات دژنراتیو ضعیف تا متوسط شامل فاصله افتادن بین سلول‌ها، کاهش ردیف‌های سلول‌های زایا و اسپرم در لوله‌ها، چرخش همراه با ویتامین ب۱۲ (د) تغییرات دژنراتیو ضعیف تا متوسط شامل فاصله افتادن بین سلول ها، کاهش ردیف‌های سلول‌های زایا و اسپرم در لوله‌ها، چرخش همراه با ویتامین ث (ه) تغییرات دژنراتیو ضعیف تا متوسط شامل فاصله افتادن بین سلول‌ها، کاهش ردیف‌های سلول‌های زایا و اسپرم در لوله‌ها ،چرخش همراه با ویتامین ب۱۲ و ث

بحث

در پژوهش حاضر به بررسی اثر درمانی سیانوکوبالامین (ویتامین ب۱۲) در ضایعات ایسکمی- ریپرفیوژن بافت بیضه در موش صحرایی پرداخته شده است و اثر درمانی سیانوکوبالامین با اثرات درمانی ویتامین ث مورد مقایسه قرارگرفت. تجویز سیانوکوبالامین با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم توانست باعث بهبود شاخص‌های رتبه‌بندی جانسون شود. همچنین در بررسی‌های پاتولوژی گروه درمان شده با سیانوکوبالامین ساختار لوله‌های منی‌ساز بهتر حفظ شده بودند.

چرخش طناب بیضه می‌تواند تاثیرات ماندگاری روی قابلیت تولیدمثلی مردان بگذارد. به دنبال چرخش بیضه بافت بیضه دچار ایسکمی می‌شود و در نتیجه سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) کاهش می‌یابد و محصولات ناشی از شکستن (ATP) مانند هایپوگزانتین افزایش می‌یابد (۱۰). پس از اصلاح جراحی و باز کردن پیچش بافت بیضه و برقراری جریان خون، آسیب‌های ناشی از پدیده‌ای به نام ریپرفیوژن آغاز می‌شود که تمام بافت‌های بدن ازجمله بیضه طرف مقابل را نیز تحت تاثیر قرار خواهد داد (۲۹).

به دنبال شروع روند ریپرفیوژن با تولید انفجاری رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی و تعدادی از وقایعی که هنوز به درستی شناسایی نشده‌اند با حجم وسیعی از تخریب‌های بافتی در بیضه دچار چرخش و نیز بیضه سمت مخالف مواجه خواهیم بود (۲). لذا اکثر پروتکل‌های درمانی تلاش کرده‌اند تابا شناسایی مکانیسم‌های تخریبی ناشی از ریپرفیوژن و جلوگیری از آن‌ها باعث حفظ ساختار بیضه و قدرت تولید اسپرم در لوله‌های منی‌ساز شوند. مطالعات نشان داده‌اند که کمبود ویتامین‌های گروه ب با کاهش کیفیت سیمن و ناباروری در مردان مرتبط می‌باشد و همچنین افزودن آن‌ها به نمونه اسپرم باعث بهبود کیفیت نمونه اسپرم در فرآیند انجماد می‌شود (۱۷). از بین ویتامین‌های گروه ب، سیانوکوبالامین برای تکثیر DNA، سنتز و متابولیسم اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضرورت دارد (۱۱). کمبود سیانوکوبالامین منجر به اختلال در عملکرد آنزیم متیونین سنتتاز و تجمع هموسیستئین در پلاسما شده که ارتباط مستقیم با افزایش استرس اکسیداتیو واختلالات تولیدمثلی دارد. سیانوکوبالامین به میزان قابل توجهی از سد خونی- بیضه‌ای عبور می‌کند و نقش مهمی در فرآیند اسپرماتوژنز و کیفیت اسپرم دارد (۱۳). Hassani-Bafrani و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که سطح سیانوکوبالامین در مردان نابارور و دارای مشکلات اسپرمی به‌صورت معنی‌داری پایین‌تر از افراد دارای کیفیت اسپرم نرمال است (۱۲). Kawata و همکاران در سال ۱۹۹۲ با القای کمبود سیانوکوبالامین در مدل موش صحرایی با تغذیه یک غذای فاقد سیانوکوبالامین به مدت ۱۵۰ روز دریافتند که این کمبود منجر به اختلال در رشد می‌گردد و در بافت بیضه باعث آتروفی لوله‌های منی‌ساز و آپلازی اسپرماتیدها و اسپرماتوزوا می‌گردد (۱۶).

در مطالعه انجام شده توسط Beltrame و همکاران در سال ۲۰۱۱ تجویز داروی سایمتیدین از طریق اختلال در جذب روده‌ای سیانوکوبالامین باعث کمبود این ویتامین در بدن شد و در بافت بیضه آسیب‌های دژنراتیو ناشی از کمبود سیانوکوبالامین پدیدار گردید که به دنبال مصرف خوراکی سیانوکوبالامین این آسیب‌ها تخفیف پیدا کرد (۵). همچنین در یک مطالعه دیگر اثرات مخرب ناشی از کمبود سیانوکوبالامین در بافت بیضه با تجویز متیونین تخفیف یافت که نشان‌دهنده نقش موثر سیانوکوبالامین در فعالیت آنزیم متیونین سنتتاز و اثرحیاتی این آنزیم در فعالیت بافت بیضه می‌باشد (۳۲). Beltrame و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه دیگری نشان دادند که تجویز سیانوکوبالامین باعث افزایش میزان تکثیر اسپرماتوگونی یعنی همان سلول‌های زایای اولیه تشکیل دهنده ساختار لوله‌های منی‌ساز می‌شوند (۶).

با توجه به مطالب گفته شده سیانوکوبالامین یک ویتامین ضروری در روند تکثیر سلول‌های زایا می‌باشد و از آنجا که روند تکثیر سلولی اساس کار بافت بیضه برای تولید اسپرم است بنابراین برای حفظ ساختار طبیعی بیضه مورد نیاز است. درکنار آن تجویز مقادیر اضافی از سیانوکوبالامین می‌تواند در مواقع آسیب‌های مختلف به این بافت کمک کننده باشد. یکی از مکانیسم‌های اصلی تخریب‌های ناشی از چرخش/ ریپرفیوژن تولید بیش ازحد رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. غالبا حجم این رادیکال‌ها بیشتر از توان خنثی کردن آن‌ها توسط بافت‌ها

می‌باشد. بنابراین رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکپارچگی غشاء سلولی را مختل می‌کنند و همچنین باعث اختلال در عملکرد طبیعی سلول از طریق واکنش با پروتئین‌ها می‌شود (۲۴). لذا یکی از درمان‌های کلاسیک در کنار اصلاح جراحی چرخش بیضه استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند آسکوربیک اسید برای کاهش عوارض ناشی از ریپرفیوژن متعاقب ایسکمی می‌باشد. تاثیرات مثبت آنتی‌اکسیدان‌ها بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و در بافت‌های مختلف تحت استرس اکسیداتیو مانند آترواسکروز، دیابت تیپ ۲، کولیت اولسراتیو و چرخش بیضه نشان داده شده است (۱۵).

اگرچه تاکنون مطالعات زیادی بر روی اثرات ترکیبات داری خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ضایعات چرخش/ ریپرفیوژن بافت بیضه انجام شده است و همگی اثرات مثبت آن‌ها را ثابت کرده‌اند اما تحقیقات برروی ترکیبات متفاوت همچنان ادامه دارد. نشان داده شده است که سیانوکوبالامین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد. سیانوکوبالامین سطوح گلوتاتیون را بالا نگه می‌دارد و باعث حفظ گروه سولفیدریل آنزیم‌ها در حالت کاهش یافته می‌شود (۳۱). همچنین سیانوکوبالامین به‌صورت مستقیم در جمع آوری رادیکال‌های آزاد سوپراکساید مشارکت می‌کند (۹). Adelakun و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که تجویز سیانوکوبالامین شرایط استرس اکسیداتیو بوجود آمده ناشی از تزریق ترامادول را در بافت بیضه بهبود بخشیده و از این طریق از ضایعات دژنراتیو جلوگیری می‌کند(۱). Sasso-Cerri و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که تجویز سیانوکوبالامین از طریق تحریک تکثیر اسپرماتوگونی باعث جلوگیری از مرگ سلول‌های زایا در موش‌های صحرایی درمان شده با بوسولفان می‌شود (۲۶). رای و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که تجویز سیانوکوبالامین در موش‌های صحرایی تحت تجویز نیکوتین از طریق کاهش استرس اکسیداتیو اثرات مخرب در بافت بیضه را کاهش می‌دهد (۷). ویتامین ث دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی اثبات شده‌ای است که در مواقع استرس اکسیداتیو مانند آن چیزی که در هنگام ایسکمی- ریپرفیوژن اتفاق می‌افتد، می‌تواند مفید باشد. در مطالعه‌ی حاضر ویتامین ث به اندازه ویتامین ب۱۲ در حفظ ساختار بافت بیضه در آسیب ایسکمی-ریپرفیوژن کارآیی داشت. عزیزاللهی و همکاران نشان دادند که تجویز ویتامین ث با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم ضایعات ناشی از چرخش بیضه را بهبود می‌بخشد (۴). Moghimian و همکاران در سال ۲۰۱۷ در بررسی تاثیر ویتامین ث بر چرخش بیضه متوجه شدند که باعث کاهش سطوح مالون دی آلدهید پس از القای چرخش بیضه می‌شود (۲۲).

در مطالعه حاضر به بررسی اثر درمانی سیانوکوبالامین در ضایعات ایسکمی- ریپرفیوژن بافت بیضه در موش صحرایی پرداخته شده است و اثر درمانی سیانوکوبالامین با اثرات درمانی ویتامین ث مورد مقایسه قرار گرفت. در مطالعه حاضر تجویز سیانوکوبالامین توانست باعث بهبود شاخص رتبه‌بندی جانسون شود. همچنین در بررسی‌های پاتولوژی گروه درمان شده با سیانوکوبالامین ساختار لوله‌های منی‌ساز بهتر حفظ شده بودند. در گروه‌های درمانی ویتامین ث، ویتامین ب ۱۲ و ترکیب ویتامین ث و ویتامین ب ۱۲ تغییرات دژنراتیو نسبت به گروه چرخش کمی کاهش پیدا کرده بود. تغییرات دژنراتیو ضعیف تا متوسط شامل فاصله افتادن بین سلول‌ها، کاهش ردیف سلول‌های زایا و اسپرم در لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد. شدت تغییرات دژنراتیو و رتبه‌بندی جانسون در بین سه گروه درمان تقریباً مشابه بوده و تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند؛ ولی با گروه چرخش و کنترل سالم تفاوت معنی‌داری را نشان دادند.

منابع

1. Adelakun, S.A; Ukwenya, V.O. and Akintunde, O.W; Vitamin B(12) ameliorate Tramadol-induced

oxidative stress, endocrine imbalance, apoptosis and NO/iNOS/NF-κB expression in Sprague Dawley rats through regulatory mechanism in the pituitary-gonadal axis. Tissue Cell; 2022; 74: 101697.

2. Akbas, H; Ozden, M; Kanko, M; Maral, H; Bulbul, S; Yavuz, S, Ozker, E. and Berki, T; Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. J. Int. Med. Res; 2005; 33(5): 528-536.
3. Ames, B.N; Prevention of mutation, cancer, and other age-associated diseases by optimizing micronutrient intake. J. Nucleic Acids; 2010; 2010: 725071.
4. Azizollahi, S; Babaei, H; Derakhshanfar, A. and Oloumi, M.M; Effects of co-administration of dopamine and vitamin C on ischaemia-reperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion in rats. Andrologia; 2011; 43(2): 100-105.
5. Beltrame, F.L; Caneguim, B.H; Miraglia, S.M; Cerri, P.S. and Sasso-Cerri, E; Vitamin B12 supplement exerts a beneficial effect on the seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats. Cells Tissues Organs; 2011; 193(3): 184-194.
6. Beltrame, F.L; Sasso-Cerri, E; Vitamin B(12)-induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treated rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. Asian J. Androl; 2017; 19(5): 567-572.
7. Bhattacharjee, A; Prasad, S.K; Pal, S; Maji, B; Syamal, A.K; Banerjee, A. and Mukherjee, S; Protective efficacy of folic acid and vitamin B12 against nicotine-induced toxicity in pancreatic islets of the rat. Interdiscip Toxicol; 2015; 8(2): 103-111.
8. Candocia, F.J. and Sack-Solomon, K; An infant with testicular torsion in the inguinal canal. Pediatr Radiol; 2003; 33(10): 722-724.
9. Chan, W; Almasieh, M; Catrinescu, M.M; and Levin, LA; Cobalamin-Associated Superoxide Scavenging in Neuronal Cells Is a Potential Mechanism for Vitamin B(12)-Deprivation Optic Neuropathy. Am. J. Pathol; 2018; 188(1): 160-172.
10. Elshaari, F.A; Elfagih, R.I; Sheriff, D.S. and Barassi, I.F; Oxidative and antioxidative defense system in testicular torsion/detorsion. Indian J. Urol; 2011; 27(4): 479-484.
11. Hamedani, M.A; Tahmasbi, A.M. and Ahangari, Y.J; Effects of vitamin B12 supplementation on the quality of Ovine spermatozoa. Open Vet. J; 2013; 3(2): 140-144.
12. Hassani-Bafrani, H; Tavalaee, M; Arbabian, M; Dattilo, M. and Nasr-Esfahani, M.H; The effect of vitamin E & vitamin B on sperm function in rat varicocele model. Andrologia.; 2019; 51(11): e13429.
13. Hosseinabadi, F; Jenabi, M; Ghafarizadeh, A. A. and Yazdanikhah, S; The effect of vitamin B12 supplement on post-thaw motility, viability and DNA damage of human sperm. Andrologia; 2020; 52(11): e13877.

14. Irmak, M.K; Koltuksuz, U; Kutlu, N.O; Yağmurca, M; Ozyurt, H; Karaman, A. and Akyol, O; The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. Urol. Res; 2001; 29(3): 190-193.
15. Jena, G. and Trivedi, P.P; A review of the use of melatonin in ulcerative colitis: experimental evidence and new approaches. Inflamm. Bowel Dis; 2014; 20(3): 553-563.
16. Kawata, T; Takada, T; Morimoto, F; Fujimoto, N; Tanaka, N; Yamada, K; Wada, M; Tanaka, N; Tadokoro, T. and Maekawa, A; Effects of vitamin B12-deficiency on testes tissue in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo); 1992; 38(4): 305-316.
17. Kennedy, D.O; B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy--A Review. Nutrients; 2016; 8(2): 68.
18. Liguori, I; Russo, G; Curcio, F; Bulli, G; Aran, L; Della-Morte, D; Gargiulo, G; Testa, G; Cacciatore, F; Bonaduce, D. and Abete, P; Oxidative stress, aging, and diseases. Clin. Interv. Aging; 2018; 13: 757-772.
19. Lysiak, J.J; Turner, S.D. and Turner, T.T; Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. Biol. Reprod; 2000; 63(5): 1465-1472.
20. Mahfoudh-Boussaid, A; Badet, L; Zaouali, A; Saidane-Mosbahi, D; Miled, A. and Ben Abdennebi, H; Effect of ischaemic preconditioning and vitamin C on functional recovery of ischaemic kidneys. Prog. Urol; 2007; 17(4): 836-840.
21. Manzanares, W. and Hardy, G; Vitamin B12: the forgotten micronutrient for critical care. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care; 2010; 13(6): 662-668.
22. Moghimian, M; Soltani, M; Abtahi, H. and Shokoohi, M; Effect of vitamin C on tissue damage and oxidative stress following tunica vaginalis flap coverage after testicular torsion. J. Pediatr. Surg; 2017; 52(10): 1651-1655.
23. Mogilner, J.G; Lurie, M; Coran, A.G; Nativ, O; Shiloni, E. and 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.
24. Pisoschi, A.M. and Pop, A; The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur. J. Med. Chem; 2015; 97: 55-74.
25. Ranade, A; Tripathi, Y.V.R. and Rai, R; Role of Ascorbic Acid in Ameliorating Testicular Tissue Damage Induced by Testicular Torsion and Detorsion: An Animal Model Study. J. Clin. Diag. Res; 2018;12.
26. Sasso-Cerri, E; Oliveira, B; de Santi, F; Beltrame, F.L; Caneguim, B.H. and Cerri, P.S; The antineoplastic busulphan impairs peritubular and Leydig cells, and vitamin B(12) stimulates spermatogonia proliferation and prevents busulphan-induced germ cell death. Biomed. Pharmacother; 2017; 95: 1619-1630.

27. Satoh, K; Sakamoto, Y; Ogata, A; Nagai, F; Mikuriya, H; Numazawa, M; Yamada, K. and Aoki, N; Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. Food Chem. Toxicol; 2002; 40(7): 925-933.
28. Sayılmaz, A; Karabulut, Y.Y. and Özgörgülü, A; The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. Turk. J. Urol; 2016; 42(4): 235-239.
29. Unsal A, Eroglu M, Avci A, Cimentepe E, Guven C, Derya Balbay M, Durak I; Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. Scand. J. Urol. Nephrol; 2006; 40(1): 17-22.
30. Wang, J.H; Testicular torsion. Urol. Sci; 2012; 23: 85-86.
31. Wheatley, C; A scarlet pimpernel for the resolution of inflammation? The role of supra-therapeutic doses of cobalamin, in the treatment of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, severe sepsis, and septic or traumatic shock. Med. Hypotheses; 2006; 67(1): 124-142.
32. Yamada, K; Kawata, T; Wada, M; Mori, K; Tamai, H; Tanaka, N; Tadokoro, T; Tobimatsu, T; Toraya, T. and Maekawa, A; Testicular injury to rats fed on soybean protein-based vitamin B12-deficient diet can be reduced by methionine supplementation. J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo); 2007; 53(2): 95-101.

Vol.18 / No.2
Fall-Winter 2024-2025

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2024; 18(2): 27-37.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2024.14859.1096

Comparison of the protective effect of vitamin B12 and vitamin C on the histopathology of testicular tissue in cases of acute ischemia following testicular torsion in rats

Mohammad Ali Nazmabadinejad[1]; Masoud Imani [2*]; Homayoon Babaei[2]; Omid Azari [3]; Shahrzad Azizi [4]; Fatemeh Ghaeini [5]

1. DVM Graduated Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman- Iran.
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.
4. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman- Iran.
5. DVM Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman- Iran.

Received: 20 July 2024 ***Accepted:*** 15 October 2024

Summary

Testicular torsion can lead to acute ischemia and testicular injury. One of the causes of ellipsoid damage caused by ischemia is the release of oxygen free radicals, which causes cell membrane instability and cell death. In this study, the protective effect of vitamins B12 and C, as antioxidants, in reducing damage caused by ischemia The testis was compared after the rotation of the testicular cord. In this regard, 20 rats were randomly divided into five groups. The first group is considered as control without any management. The second group was only subjected to rotation of the testicle for one hour and no treatment was performed after the correction of the rotation. The third to fifth groups were given 5 micrograms of vitamin B12 per weight, 50 mg of vitamin C and half an hour before the rotation correction. hybrid. They received vitamin B12 and vitamin C. Testicular rotation caused a significant decrease in the epithelial height in the seminiferous tubules, the diameter of the seminiferous tubules and Johnson's ranking compared to the control and treatment groups ($P<0.05$). The changes in degenerative changes and Johnson's rating were similar among the three treatment groups and had no significant differences, but showed a significant difference with the rotation group and the healthy control group ($P<0.05$). These results show that vitamins B12 and C can be used as part of a comprehensive treatment strategy in the management of injuries following testicular cord torsion and improve fertility chances.

Keywords: Vitamin C, Vitamin B12, Acute ischemia, Histopathology, Testes.

* Corresponding Author: masud.imani@uk.ac.ir