DOI:10.22092/VJ.2022.358637.1971
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر عصاره گیاه کالیگونوم بر کلونی‌زایی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند

• **نیلوفر خرمی**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
• **پرویز تاجیک (نویسنده مسئول)**
گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
• **منصوره موحدین**
گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
• **گلسا علی‌نژاد**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
• **محمدامین اسلامپور**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۷-۰۲-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش:۳۱-۰۲-۱۴۰۱
Email: Ptajik@ut.ac.ir

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره کالیگونوم بر تعداد کلونی‌ها، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند انجام شد. در این پژوهش سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موجود در غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز از بیضه گوسفند نژاد افشاری با استفاده از مراحل هضم آنزیمی جداسازی شدند. نمونه‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. گروه شاهد شامل محیط پایه بود و در سه گروه بعدی به ترتیب تیمارهای H_2O_2 (۳۰ میکرومولار)، کالیگونوم (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کالیگونوم+H_2O_2 (۳۰ میکرومولار H_2O_2 به همراه ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کالیگونوم) به محیط پایه اضافه شدند. سلول‌ها به مدت سه هفته کشت داده شدند و میزان کلونیزاسیون در روزهای پنج و ۱۴ و ۲۱ پس از شروع کشت ارزیابی شدند. پس از پایان دوره کشت میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس (*BAX* و *BCL2*) نیز ارزیابی شد. در روز ۵ و ۱۴ کشت، تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و کالیگونوم نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود (P≤۰/۰۵). در روز ۲۱ کشت، بیشترین و کمترین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌ترتیب در گروه‌های کالیگونوم و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵). کمترین و بیشترین درصد سلول‌های اسپرماتوگونی حاوی ROS و همچنین بیان ژن *BAX* و مقدار نسبت *BAX/BCL2* به‌ترتیب در گروه‌های کالیگونوم و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵). همچنین بیشترین مقدار بیان ژن *BCL2* در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه کالیگونوم مشاهده شد (P≤۰/۰۵). در نتیجه استفاده از عصاره کالیگونوم در محیط کشت می‌تواند راهکاری تاثیرگذار در راستای بهبود کیفیت و کاهش بروز آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند طی مطالعات تحقیقاتی باشد.

کلمات کلیدی: اسپرماتوگونی، کالیگونوم، کلونی‌زایی، گوسفند، ROS

● Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 28-33

Effect of *Calligonum* extract on the colonizing ability and ROS production in sheep's spermatogonial stem cells

By: Khorrami, N., Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tajik, P., (Corresponding Author) Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Movahedin, M., Department of Anatomy, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Alinezhad, G., Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Eslampour, M.A., Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 2022-05-17 Accepted: 2022-05-21

Email: Ptajik@ut.ac.it

This study was aimed to investigate the effect of *Calligonum* extract on the number of colonies, ROS production and apoptosis related genes expression in sheep's spermatogonial stem cells (SSCs). In this study, SSCs at the basal membrane of seminiferous tubules were isolated from testes of *Afshari* sheep using enzymatic digestion steps. The samples assigned into four groups. The control group received basic medium and the other groups contained H_2O_2 (30 µM), Calligonum (10 µg/ml) and *Calligonum*+H_2O_2 (30 µM H_2O_2 along with 10 µg/ml *Calligonum*), respectively. The cells were cultured for 3 weeks and the colonizing abilities were evaluated on the 5th, 14th and 21th days of culture. At the end of culturing period, ROS production and apoptosis related genes expression (*BAX* and *BCL2*) were evaluated. On the 5th and 14th days of culture, the number of colonies were higher ($P\leq0.05$) in the control and *Calligonum* groups compared to the other groups. On the 14th day of culture, the highest and the least ($P\leq0.05$) number of colonies were observed in *Calligonum* and H_2O_2 groups, respectively. The least and the highest ($P\leq0.05$) rate of ROS contained SSCs, *BAX* expression and *BAX*/*BCL2* ratio were observed in *Calligonum* and H_2O_2 groups, respectively. Moreover, the highest ($P\leq0.05$) expression of *BCL2* gene was found in *Calligonum* group. In conclusion, using *Calligonum* extract in culture medium could be a helpful strategy to improve the quality and decrease apoptosis status in sheep's SSCs during research studies.

Key words: Spermatogonia, *Calligonum*, Colonizing, Sheep, ROS

مقدمه

تعادل بین خودنوسازی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) در بیضه گونه‌های بالغ، باعث ایجاد چرخه‌ای منظم می شود که مهم‌ترین نتایج آن اسپرماتوژنز و امکان باروری بالقوه است (۷). این فرآیند تکثیر بسیار فعال قادر به تولید تقریباً ۱۰۰۰ اسپرم در ثانیه است. نرخ بالای تقسیم سلولی که در این فرآیند وجود دارد، به همان نسبت نیاز به مصرف بالای اکسیژن دارد اما خون‌رسانی بیضه‌ها به نسبت عملکرد آن کم است و بدین معناست که فشار اکسیژن در این بافت کم است و رقابت برای این عنصر حیاتی در بیضه‌ها بسیار شدید است (۱۵).

ROSها رادیکال‌های آزاد و یا مشتقات اکسیژن نیتروژن هستند که شامل آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل، هیدروپراکسیدهای لیپیدی، رادیکال‌های پراکسیل و پراکسی نیتریت‌ها هستند. آن‌ها دارای نقش دوگانه‌ای در سیستم‌های بیولوژیکی هستند که بسته به ماهیت و غلظت آن‌ها به دو دسته فیزیولوژیک و پاتولوژیک تقسیم می‌شود. سطح فیزیولوژیک برای برخی عملکردهای سلولی ضروری است اما سطح بالای آن‌ها مضر هستند و آسیب و مرگ سلولی را به‌دنبال دارند (۹). کمپلکس‌های آنزیمی زنجیره تنفسی فسفوریلاسیون اکسیداتیو که بر روی تاج‌های میتوکندری قرار گرفته‌اند، از جمله گزانتین‌ها، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات اکسیداز (NADPH) و سیتوکروم P۴۵۰، از مهم‌ترین منابع برای تولید انواع ROS هستند (۱۷). با توجه به اهمیت سلول‌های لایدیگ در فرآیندهای اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز و حساسیت این سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو، در بیضه مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی در این زمینه صورت می‌گیرد (۱۱). فشار کم اکسیژن که مشخصه مهم بافت بیضه است، جزء مهم‌ترین مکانیسم‌هایی است که به وسیله آن بیضه‌ها خود را از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند (۲). علاوه بر این، بیضه‌ها حاوی مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پاک‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد هستند که از سلول‌های بیضه‌ای در مقابل رادیکال‌های آزاد و آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو دفاع می‌کنند (۴).

آنتي‌اکسیدان‌ها به دو گروه آنزيمي و غيرآنزيمي تقسيم مي‌شود و با جلوگيري از تشكيل راديكال آزاد، ترميم صدمات ناشي از فعاليت راديكال‌ها، افزايش دفاع مولكول‌هاي صدمه ديده و به حداقل رسانيدن جهش سلولي با آسيب‌هاي ناشي از راديكال‌هاي آزاد مقابله مي‌كند (۱۴). سوپر اكسيد ديسموتاز، گلوتاتيون پروكسيداز و كاتالاز جز

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی هستند و در میان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی می‌توان به ویتامین E ،کاروتنوییدها، اسید آسکوربیك و غیره اشاره کرد (۶). گیاهان منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند (۸). گیاه کالیگونوم با نام علمی *Calligonum comosum L* و از راسته هفت‌بند می‌باشد و در اغلب شنزارهای مرکزی ایران رشد می‌کند (۳). این گیاه حاوی آنتی اکسیدان‌های مهمی مانند کاتچین، اپیکاتچین، کوئرستین، کامفرول و جنیستین است (۱). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که کاتچین، کوئرستین با آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز تعامل دارند و دارای خواص التهابی، ضدزخم و ضدسرطان هستند که می‌توانند بیان فاکتور نکروز تومور آلفا (TNFα) را در شرایط آزمایشگاهی تغییر دهند. همچنین گزارش شده است فعالیت ضدسرطانی کالیگونوم ممکن است از طریق اثر بر فرآیند آپوپتوزیس باشد (۱).

با توجه به تاثیرگذاری آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره‌های گیاهی بر فرایندهای تولیدمثلی و به ویژه احتمال تاثیر مثبت آن‌ها بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی که در مطالعات پیشین به آن‌ها پرداخته شده و همچنین نبود اطلاعات کافی در مورد تاثیرات مثبت عصاره کالیگونوم بر عملکرد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن عصاره کالیگونوم در محیط کشت SSCs بر قابلیت کلونی‌زایی، مهار تولید ROS و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (BAX و BCL۲) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند بوده است.

مواد و روش

عصاره‌گیری

میوه گیاه *Calligonum comosum L* در اردیبهشت ماه توسط یک متخصص گیاه‌شناسی برداشت و پس از شستشو در اتاقی بدون نور خشک شد. سپس ۲۰ میلی‌گرم از پودر میوه همراه متانول و پترولیوم اتر در شیشه ای ریخته شد. پس از ۴۸ ساعت عصاره به دست آمده از فیلترهایی با منافذ ۰/۴۵ عبور داده شد. الکل موجود در عصاره توسط روتاری تاحد زیادی خارج گردید و عصاره توسط دستگاه آون خشک گردید و در یخچال تا زمان مصرف نگهداری شد.

جداسازی و سلول‌های اسپرماتوگونی

در این مطالعه از بیضه‌های بره نابالغ نژاد افشاری استفاده شد. بیضه‌های مورد استفاده در این تحقیق بیضه‌های دور ریز کشتارگاه بوده و حیوانی جهت این آزمایش کشتار نشده است. بیضه‌ها همراه PBS در فلاسک و روی یخ قرار گرفت و در کمتر از یک ساعت از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه بیضه‌ها ابتدا با محلول‌های ضدعفونی تنتوریدید ۷۰ درصد و الکل شستشو داده شدند و در نهایت پس از شستشو با نرمال سالین استریل شده و جهت اطمینان از عدم وجود مواد ضدعفونی کننده، با استفاده از بیستوری استریل تونیکا واژینالیس و تونیکا آلبوژینه برش داده شدند. سپس بافت پارانشیم بیضه جدا شده و در یک لوله فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت. در این تحقیق به جهت بالابودن اهمیت نبود بار میکروبی و کاهش احتمال آلودگی، محتویات لوله فالکون سه بار در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محتویات لوله فالکون به یک پتری دیش استریل انتقال داده شد و زیر هود با پنس و قیچی کاملا خرد شد، تا نهایتا فرم شیرآبه‌ای به خود گرفت.

هضم آنزیمی بافت پارانشیم بیضه

در مرحله اول هضم آنزیمی از آنزیم‌های کلاژناز IV(۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، هیالورونیداز II (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و تریپسین (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده شد و پتری‌دیش‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. برای افزایش بازدهی تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانشیم بیضه هر ۱۰ دقیقه یکبار عمل پیپتاژ انجام شد و برای ارزیابی هضم آنزیمی و روند بازشدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر هر ۱۰ دقیقه یك بار بافت پارانشیم بیضه در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. نمونه پس از مرحله اول هضم آنزیمی با دور ۱۴۰۰ rpm به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله دوم آنزیم‌های کلاژناز IV(۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، هیالورونیداز II (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به نمونه اضافه شد و پتری‌دیش‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. برای جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعه‌های باقیمانده، لوله‌های فالکون در دور ۸۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای حذف سلول‌های میوئید، تعلیق سلولی مذکور از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرونی استریل عبور داده شد. در ادامه برای رسوب سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی لوله‌های فالکون در دور ۸۰۰ rpm به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و برای کشت استفاده شدند. پس از سانتریفیوژ مایع رویی موجود در لوله فالکون برای کشت در پلیت ۱۲ خانه مورد استفاده

جدول ۱- تاثیر تیمارها بر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای پنجم، چهاردهم و بیست و یکم کشت.

تیمارها	شاهد	H۲O۲	کالیگونوم	کالیگونوم+H۲O۲	SEM
روز ۵	۵۳/۶۶ [a]	۳۰/۶۶ [b]	۵۵/۳۳ [a]	۳۳/۲۲ [b]	۷/۶
روز ۱۴	۱۴۰/۲۷ [a]	۶۶/۷۷ [c]	۱۴۲/۷۸ [a]	۱۲۵/۱۱ [b]	۵/۵
روز ۲۱	۱۵۳/۰۰ [c]	۱۰۴/۱۱ [d]	۶۴۱/۴۴ [a]	۳۴۴/۴۴ [b]	۱۱/۳

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است (P≤۰/۰۵).

قرار گرفت. پس از شمارش و ارزیابی سلول‌ها، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به ازای یک سانتی‌متر مربع در هر خانه کشت داده شد. نمونه به ۵ گروه تقسیم شدند و گروه شاهد شامل محیط پایه (کشت تعلیق سلولی در محیط DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS) بود و در چهار گروه بعدی به ترتیب تیمارهای H۲O۲ (۳۰ میکرومولار)، کالیگونوم (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کالیگونوم +H۲O۲ (۳۰ میکرومولار H۲O۲ به همراه ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کالیگونوم) به محیط پایه اضافه شدند.

کلونی‌ها پس از چهار روز در گروه‌های مختلف قابل شناسایی بودند. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۲۱ روز قرار داده شدند. تعویض محیط هر سه روز یکبار انجام شد. برای ارزیابی تعداد کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۵، ۱۴ و ۲۱ کشت، از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج استفاده شد.

ارزیابی میزان تولید ROS در سلول‌های اسپرماتوگونی

برای اندازه‌گیری میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در درون سلول از پروب فلورسانس ۲،۷ دی کلروفلورسئین دی استات (DCFH-DA) استفاده شد که بطور اختصاصی برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید (H۲O۲) درون سلولی بکار می‌رود. این رنگ قادر است که به راحتی وارد سلول شود و آنجا توسط استرازهای درون سلولی شکسته شود و تبدیل به DCFH شود. ترکیب DCFH توانایی خروج از سلول را ندارد و می‌تواند توسط پراکسید هیدروژن و یا هیدرو پراکسیدهای دیگر اکسید شده و تبدیل به DCF شود که ترکیبی با شدت فلورسانس بالا می‌باشد که میزان شدت آن برابر با میزان تولید ROS و یا همان H۲O۲ می‌باشد. رنگ فلوئورسنس سبز DCF و رنگ فلوئورسنس قرمز PI به ترتیب در کانال‌های FL۱ و FL۲ شناسایی شدند. تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد ثبت شده و داده‌ها توسط نرم‌افزار فلوجو آنالیز شدند.

ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (BAX و BCL۲)

استخراج RNA و سنتز cDNA دو هفته پس از کشت سلولی و تیمار انجام شد. RNA توسط کلروفرم و ایزوپروپانول جدا شد و با اتانول ۷۵ درصد شسته شد. در نهایت، آلودگی‌ها توسط DNase بدون RNase از بین رفتند. پس از سنتز cDNA نمونه‌ها [کیت سنتز cDNA (فرمنتاز، لیتوانی)]، بیان ژن‌های *BAX* و *BCL-2* با گلیسرآلدئید ۳-فسفات‌دهیدروژناز (*GAPDH*) به‌عنوان ژن خانه‌دار مقایسه شد. بیان mRNA ژن‌های *BAX* و*BCL2* در همه گروه‌ها با استفاده از آشکارساز توالی طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد.

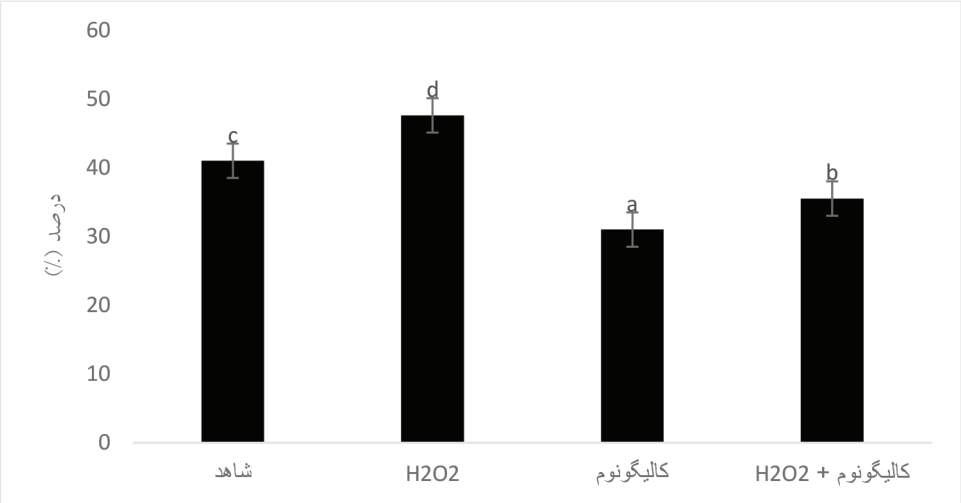
آنالیز آماری

این مطالعه در سه تکرار انجام شد. نتایج آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه ANOVA به‌وسیله نرم‌افزار آماری SAS آنالیز و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش توکی انجام شد.

نتایج

تاثیر تیمارها بر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی

نتایج مربوط تاثیر تیمارها بر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۵، ۱۴ و ۲۱ کشت در جدول ۱ گزارش شده است. در روز ۵ کشت، تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و کالیگونوم نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان گروه‌های H۲O۲ و کالیگونوم +H۲O۲ از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در روز ۱۴



شکل ۱- تاثیر تیمارها بر درصد سلول‌های اسپرماتوگونی حاوی ROS. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

کشت، تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و کالیگونوم نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود (P≤۰/۰۵) و همچنین کمترین تعداد کلونی‌ها در گروه H۲O۲ مشاهده شد (P≤۰/۰۵). در روز ۲۱ کشت، بیشترین و کمترین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌ترتیب در گروه‌های کالیگونوم و H۲O۲ مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و همچنین تعداد کلونی‌ها در گروه کالیگونوم +H۲O۲ از گروه شاهد بیشتر بود (P≤۰/۰۵).

تاثیر تیمارها بر درصد سلول‌های حاوی ROS

تاثیر تیمارها بر درصد سلول‌های اسپرماتوگونی حاوی ROS در شکل ۱ نمایش داده شده است. کمترین و بیشترین درصد سلول‌های اسپرماتوگونی حاوی ROS به‌ترتیب در گروه‌های کالیگونوم و H۲O۲ مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و همچنین درصد سلول‌های اسپرماتوگونی حاوی ROS در گروه کالیگونوم +H۲O۲ از گروه شاهد کمتر بود(P≤۰/۰۵).

تاثیر تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BCL2* و *BAX*)

نتایج مربوط تاثیر تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین و بیشترین مقدار بیان ژن *BAX* به‌ترتیب در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه‌های کالیگونوم و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان گروه‌های شاهد و کالیگونوم+H_2O_2 از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بیشترین مقدار بیان ژن *BCL2* در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه کالیگونوم مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان سایر از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). کمترین و بیشترین مقدار نسبت *BAX/BCL2* به‌ترتیب در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه‌های کالیگونوم و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان گروه‌های شاهد و کالیگونوم+H_2O_2 از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث

با توجه به توانایی SSCs در خودنوسازی و تمایز و اثر انواع فاکتورها در ریزمحیط آن‌ها پژوهش در راستای افزایش کارایی محیط‌های کشت بر توانایی تکثیر و کلونی‌زایی SSCs ضروری است (۱۳). هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن عصاره کالیگونوم در محیط کشت SSCs بر قابلیت کلونی‌زایی، مهار تولید ROS و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند بوده است. نتایج در این مطالعه نشان داد که تعداد کلونی‌های SSCs در گروه تیمار H_2O_2 در هر ۳ بازه زمانی کشت از گروه کنترل و گروه تیمار کالیگونوم کمتر بوده است. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده توسط کانگ و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی دارد که آن‌ها نشان دادند استفاده از عصاره گیاهان در محیط کشت دارای بر رشد و کلونی‌زایی SSCs و همچنین افزایش باروری موثر است (۱۰).

در این مطالعه از تیمار H_2O_2 برای القای تنش اکسیداتیو استفاده شده و در تیمار ترکیبی کالیگونوم با H_2O_2 سعی بر آن شد اثرات مخرب H_2O_2 توسط خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره کالیگونوم خنثی گردد. بر اساس مطالعات پیشین دوز آستانه‌ای القا کننده استرس اکسیداتیو در SSCs که فاقد آسیب جدی به کلونی‌ها باشد ۳۰ µM بوده است (۴) که در این مطالعه نیز از همین دوز استفاده شده است. همچنین اثر دوزهای ۰ تا ۱۵ میکرومولار H_2O_2 بر تحرک اسپرم بررسی شده که نتایج نشان داده است H_2O_2 باعث افزایش سطوح ROS و NO شده و از این طریق بر روی پارامترهای اسپرم تاثیرمنفی می‌گذارد (۱۲).

در مطالعه حاضر، استفاده از عصاره کالیگونوم در محیط کشت موجب بهبود میزان کلونی‌زایی و همچنین کنترل میزان تولید ROS در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند شد. همچنین بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* به عنوان عوامل بازدارنده و پیش‌برنده آپوپتوزیس نیز در حضور عصاره کالیگونوم به ترتیب افزایش و کاهش یافت. این اثر مثبت مرتبط با خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کالیگونوم است که در مطالعات پیشین به آن اشاره شده است (۱). در هفته دوم و سوم، به دلیل وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در گروه تیمار شده با H۲O۲ تعداد کلونی اسپرماتوگونی نسبت به سایرگروه‌ها کمتر است، اما در گروه‌های تیمار شده با کالیگونوم، سلول‌ها توانایی خودنوزایی بیشتری داشته‌اند و درنتیجه کلونی‌های جوان بیشتری مشاهده شد. بنابراین، افزودن عصاره گیاه کالیگونوم به محیط کشت در حضور و عدم حضور H۲O۲، سبب افزایش میزان تکثیر و به دنبال آن افزایش تعداد کلونی‌هاو خود نوزایی می‌شود.

از طرفی بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس نشان داده که افزودن H۲O۲ به محیط کشت به عنوان یک عامل ایجاد استرس اکسیداتیو و

جدول ۲- تاثیر تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (***BAX*** و ***BCL2***).

تیمارها	شاهد	H_2O_2	کالیگونوم	کالیگونوم+H_2O_2	SEM
BAX	۷/۷۱ [b]	۱۰/۸۵ [c]	۵/۶۵ [a]	۷/۱۹ [b]	۰/۸۵
BCL2	۳/۳۵ [b]	۲/۲۰ [b]	۵/۵۰ [b]	۳/۷۵ [a]	۰/۵۵
BAX/BCL2	۲/۳۰ [b]	۴/۹۳ [c]	۱/۰۲ [a]	۱/۹۱ [b]	۰/۴۰

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است (P≤۰/۰۵).

القای ROS، سبب القاء ژن آپوپتوزی *BAX* شده است. از طرفی در سلول‌هایی که میزان استرس اکسیداتیو بالاست و ژن‌های آپوپتوزی فعال هستند، همزمان بیان ژن *BCL2* جهت مقابله با آسیب سلولی بالا می‌رود و می‌تواند از آپوپتوز سلول‌ها جلوگیری کند، اما همین افزایش بی‌رویه *BCL2* می‌تواند سبب بی‌ثباتی کروموزومی و آسیب به DNA و به دنبال آن کاهش بیان *BCL2* و القا آپوپتوز شود (۱۶). درواقع ژن *BCL2* هم نقش آنتی‌آپوپتوزی هم نقش پرو آپوپتوزی دارد، در مقادیر کم سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول و مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو شده، اما در غلظت‌های بالا سبب تغییر در یکپارچگی سلولی و القاء مرگ وابسته به کلسیم می‌گردد. در این مطالعه کالیگونوم به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی توانسته است سطح بیان ژن *BCL2* را نسبت به گروه کنترل به میزان مناسبی افزایش دهد و همچنین میزان بیان ژن *BAX* را نسبت به گروه H_2O_2 کاهش دهد. نتایج این قسمت با مطالعه براتی و همکاران (۲۰۲۱) هم‌خوانی دارد که گزارش کرده‌اند در سلول‌های اسپرماتوگونی موشمیزان بیان ژن *BAX* در گروه تیمار شده با H_2O_2 به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌هاست و میزان بیان ژن آنتی‌آپوپتوزی BCL۲ در این گروه از بقیه کمتر است (۵).

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از عصاره کالیگونوم در محیط کشت موجب بهبود میزان کلونی‌زایی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند می‌شود و همچنین کنترل میزان تولید ROS را در این سلول‌ها به دنبال دارد. بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* به عنوان عوامل بازدارنده و پیش‌برنده آپوپتوزیس نیز در حضور عصاره کالیگونوم به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابد. بنابراین استفاده از عصاره کالیگونوم در محیط کشت می‌تواند روشی تاثیر گذار برای حفظ و نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در زمان کشت سلولی باشد.

منابع مورد استفاده

1. Abdel-Sattar, E.A., Mouneir, S.M., Asaad, G.F., Abdallah, H.M. 2014. Protective effect of Calligonum comosum on haloperidol-induced oxidative stress in rat. *Toxicology and Industrial Health*. 30:147–153.

2. Abualreesh, M., Myers, J.N., Gurbatow, J., Johnson, A., Xing, D., Wang, J., et al. 2021. Effects of antioxidants and antifreeze proteins on cryopreservation of blue catfish (Ictalurus furcatus) spermatogonia. *Aquaculture*. 531:735966.

3. Ahmed, H., Moawad, A., Owis, A., Abouzid, S., Ahmed, O. 2016. Flavonoids of Calligonum polygonoides and their cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*. 54:2119–2126.

4. Barati, S., Movahedin, M., Batooli, H. 2018. In vitro antiapoptotic effects of the calligonum extract on spermatogonial stem cells. *International Journal of Reproductive Bio-Medicine*. 16:335.

5. Barati, S. and Movahedin, M. 2021. The Antioxidant Effects of Calligonum Extract on Oxidative Stress in Spermatogonial Stem Cells Culture. *Pharmaceutical Sciences*. 27:521–527.

6. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 5:9–19.

7. De Rooij, D.G. 2018. Regulation of spermatogonial stem cell behavior in vivo and in vitro. *Animal Reproduction*. 3:130–134.

8. Gülçin, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86:345–391.

9. Jung, S.E., Oh, H.J., Ahn, J.S., Kim, Y.H., Kim, B.J., Ryu, B.Y. 2021. Antioxidant or apoptosis inhibitor supplementation in culture media improves post-thaw recovery of murine spermatogonial stem cells. *Antioxidants*. 10:754.

10. Kang, H.R., Lee, Y.A., Kim, Y.H., Lee, D.G., Kim, B.J., Kim, K.J., et al. 2015. Petasites japonicus stimulates the proliferation of mouse spermatogonial stem cells. *PloS One*. 10:e0133077.

11. Kongmanas, K., Saewu, A., Kiattiburut, W., Baker, M.A., Faull, K.F., Burger, D., et al. 2021. Accumulation of Seminolipid in Sertoli Cells Is Associated with Increased Levels of Reactive Oxygen Species and Male Subfertility: Studies in Aging Arsa Null Male Mice. *Antioxidants*. 10:912.

12. Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J., et al. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 19:129–138.

13. Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Telaranta, A.I., Fearon, D.T., Brinster, R.L. 2006. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:9524–9529.

14. Sznarkowska, A., Kostecka, A., Meller, K., Bielawski, K.P. 2017. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*. 8:15996.

15. Tan, K. and Wilkinson, M.F. 2020. A single-cell view of spermatogonial stem cells. Current Opinion in Cell Biology. 67:71–8.

16. Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., Bond, G.L. 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7:979–987.

17. Wu, C.C. and Bratton, S.B. 2013. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 19:546–558.