DOI: 10.22092/VJ.2022.358716.1975
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر ملاتونین بر قطر کلونی‌ها، سطح آپوپتوزیس و بیان ژن‌های وابسته به آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند

• **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.
• **منصوره موحدین**
گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
• **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.

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

چکیده

هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر ملاتونین بر قطر کلونی‌ها، سطح آپوپتوزیس و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند بوده است. 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)، ملاتونین (۱ نانو مول) و ملاتونین+H_2O_2 (۳۰ میکرومولار H_2O_2 به همراه ۱ نانو مول ملاتونین) به محیط پایه اضافه شدند. سلول‌ها به مدت سه هفته کشت داده شدند و قطر کلونی‌ها در روزهای پنج و ۱۴ و ۲۱ پس از شروع کشت ارزیابی شدند. پس از پایان دوره کشت میزان آپوپتوزیس و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس (*BAX* و *BCL2*) نیز ارزیابی شد. در روز ۵ و ۱۴ کشت، قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و ملاتونین نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود (P≤۰/۰۵). در روز ۲۱ کشت، بیشترین و کمترین قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌ترتیب در گروه‌های ملاتونین و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵). کمترین و بیشترین درصد سلول‌های آپوپتوتیک و همچنین بیان ژن *BAX* و مقدار نسبت *BAX/BCL2* به‌ترتیب در گروه‌های ملاتونین و H_2O_2 یافت شد (P≤۰/۰۵). همچنین بیشترین مقدار بیان ژن *BCL2* در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه ملاتونین دیده شد (P≤۰/۰۵). در نتیجه استفاده از ملاتونین در محیط کشت می‌تواند روشی مفید در برای بهبود کیفیت و کاهش بروز آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند باشد.

کلمات کلیدی: آپوپتوزیس، اسپرماتوگونی، کلونی‌زایی، ملاتونین، گوسفند

Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 34-40

Impact of melatonin on the colonies diameter, apoptosis status and apoptosis related genes expression in sheep's spermatogonial stem cells

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

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

Email: Ptajik@ut.ac.it

The aim of this research was to assess the effect of melatonin on the diameter of colonies, apoptosis status and apoptosis related genes expression in sheep's spermatogonial stem cells (SSCs). 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), melatonin (1 nmol) and melatonin+H_2O_2 (30 µM H2O2 along with 1 nmol melatonin), respectively. The cells were cultured for 3 weeks and the colonies' diameter were evaluated on the 5th, 14th and 21th days of culture. At the end of culturing period, apoptosis status and apoptosis related genes expression (*BAX* and *BCL2*) were evaluated. On the 5th and 14th days of culture, the diameter of colonies were higher ($P\leq0.05$) in the control and melatonin groups compared to the other groups. On the 21th day of culture, the highest and the least ($P\leq0.05$) diameter of colonies were observed in melatonin and H_2O_2 groups, respectively. The least and the highest ($P\leq0.05$) rate of apoptotic SSCs, *BAX* expression and *BAX/BCL2* ratio were observed in melatonin and H_2O_2 groups, respectively. Moreover, the highest ($P\leq0.05$) expression of *BCL2* gene was found in melatonin group. In conclusion, using melatonin in culture medium could be an effective way to improve the quality and decrease apoptosis status in sheep's SSCs.

Keywords: Apoptosis, Spermatogonia, Colonizing, Melatonin, Sheep.

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا (SSCs)، سلول‌های پیش‌ساز زایا با پتانسیل خودنوزایی و تولید سلول‌های زایای تمایزیافته هستند که در غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار دارند. این سلول‌ها برای کمک به اسپرم‌زایی تمایز می‌یابند و در نتیجه هموستاز سلول‌های بیضه را حفظ می‌کنند (۲). بنابراین، مطالعه‌ی SSCها از نظر درک مکانیسم تمایز سلول‌های زایای مردانه مهم و دارای ارزش کاربردی بالینی در درمان ناباروری مردان می‌باشد (۷). تعداد کم این سلول‌ها در بیضه بالغ، جداسازی، کشت و نگهداری آن‌ها را برای مطالعات آزمایشگاهی محدود کرده است (۱۲). در بیضه‌های پستانداران، سلول‌های سرتولی، که تنظیم‌کننده‌ی مکانیسم تمایز و تکثیر SSCها هستند، نقشی اساسی در اسپرم‌زایی دارند. تحقیقات اخیر، بر روی عوامل مرتبط با تکثیر SSC های کشت‌شده، مانند فاکتور مهارکننده لوسمی، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از رده سلولی گلیال، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه و فاکتور سلول‌های بنیادی، که از سلول‌های سرتولی ترشح می‌شوند، متمرکز شده است. بیشتر این آزمایش‌ها معمولاً سیستم‌های کشت سلولی دو بعدی را با استفاده از ظروف یا فلاسک‌های کشت بررسی کردند. نقطه ضعف اصلی این روش، فقدان گرادیان‌های متابولیکی و تکثیری مشابه با کنام SSC طبیعی است. در سیستم‌های کشت سه‌بعدی، سلول‌های سرتولی تکثیر شده، سبب ایجاد تک لایه‌ای از سلول‌ها می‌گردند که در بالای آن کلنی‌های SSCs تشکیل می‌شوند (۱۰). سیستم کشت نرم آگار (SACS) یک ساختار کیفی و سه بعدی کشت سلولی است که برای اولین بار برای گسترش کلونی‌های سلول‌های مغز استخوان و اکتشاف عوامل مرتبط با تنظیم تکثیر و تمایز آن‌ها استفاده شد. در مطالعات پیشین از SACS به عنوان یک رویکرد جدید برای مطالعه عوامل دخیل در تنظیم تکثیر و تمایز SSCها استفاده کردند. این سیستم کشت یک ریزمحیط شبیه به شرایط in vivo فراهم می‌کند و برخی از جنبه‌های محیط سه‌بعدی طبیعی را که SSCs در معرض آن قرار می‌گیرند تقلید می‌کند. هم‌چنین، بسیاری از مطالعات، از از افزودنی‌هایی مثل ملاتونین به منظور کشت کارآمد SSCها استفاده کردند (۱۰ و ۱۱).

ملاتونین مترشحه از غده‌ی صنوبری، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر و پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد در سلول‌های مختلف در نظر گرفته می‌شود. ملاتونین تأثیر عمیقی بر بسیاری از عملکردهای تنظیمی سلول‌ها از جمله تنظیم پاسخ ایمنی و سیگنال‌دهی سلولی، محافظت از اسیدهای چرب در برابر اکسیداسیون و اثرات انکوستاتیک، و خواص ضدآپوپتوز و ضدپیری بر روی بسیاری از سلول‌ها دارد. هم‌چنین به عنوان یک عامل محافظ سلولی موثر و یک عامل بالقوه پیش‌گیری از بیماری استفاده می‌شود (۳ و ۱۶). مطالعات پیشین بیانگر این است که آمفی‌فیلی ملاتونین تأثیر مهمی در محافظت از گامت‌ها و جنین‌های پستانداران و مرگ سلولی در شرایط آزمایشگاهی دارد (۱). علاوه بر این، ملاتونین بیان ژن و فعالیت آنزیمی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را تنظیم می‌کند (۱۳). ملاتونین همچنین قادر است آپوپتوز ناشی از بوسولفان را در SSCهای موش، که به دلیل غلظت بالای *p53* ایجاد می‌شود، بهبود می‌بخشد.

با توجه به اثرات مثبت و محافظتی ملاتونین در محیط‌های کشت سلول‌ها مختلف، انتظار می رود افزودن این ماده به محیط کشت SSC سبب بهبود قابلت رشد و تمایز این سلول‌ها گردد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن هورمون ملاتونین در محیط کشت SSCs بر اندازه قطر کلونی‌ها، سطح آپوپتوزیس و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

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 تنتوریدید۷۰ 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.

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 باز شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر هر ۱۰ دقیقه يك 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 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 H2O2 (۳۰ میکرومولار)، ملاتونین (۱ نانو مول) و ملاتونین+H2O2 (۳۰ میکرومولار H2O2 به همراه ۱ نانو مول ملاتونین) 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 قطر کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۵، ۱۴ و ۲۱ کشت، از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج استفاده شد.

ارزیابی میزان زنده‌مانی و سطح آپوپتوزیس

جهت بررسی میزان آپوپتوزیس درون سلول‌ها از این کیت آنکسین-۵ استفاده شد. سلول‌ها با چگالی ۳×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر به پلیت شش چاهكي اضافه شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تیمار سلول‌ها به جز گروه کنترل با غلظت‌هاي ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انجام شد. پس از سپري شدن زمان، محیط رويي چاهك‌ها و سلول‌هاي كف پلیت به واسطه افزودن مقادیر كافي از تريپسين- EDTA جدا شدند و كل محتويات هر چاهك به يك فالكون منتقل گرديد. سپس طبق دستورالعمل كيت مربوطه سلول‌هاي كنترل و تيمار شده از كف پليت جدا شده و در ۴۰۰ میكروليتر از بافر مخصوص كيت شناور شدند. پس از افزودن ۵ میكروليتر رنگ آنكسين -۵ و ۱۵ دقيقه انكوباسيون در تاريكي، مجدداً ۵ میكروليتر رنگ PI به آن‌ها افزوده شده و ۱۵ دقيقه به دور از نور در دماي محيط قرار گرفتند. پس از سانتريفيوژ rpm ۱۴۰۰، هر نمونه در ۱۰۰۰ میكروليتر محلول ايزوتونيك رقيق‌شده و توسط دستگاه فلوسيتومتر شمارش و توسط نرم‌افزار فلوجو آنالیز شدند.

ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*)

در این ارزیابی ابتدا RNA کل استخراج و پس از تیمار با آنزیم DNase،

با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصله با استفاده از روش Real Time PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. به منظور استخراج RNA کل، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX+ به میکروتیوب حاوی سلول‌ها اضافه و به مدت پنج دقیقه بر روی یخ انکوبه شد.۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول فوق اضافه و پس از آن، میکروتیوب به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد تا مخلوط گردد. میکروتیوب حاوی این مخلوط به مدت پنج دقیقه بر روی یخ انکوبه گردیده و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، سه فاز شامل RNA در قسمت بالا، فاز میانی حاوی DNA و فاز پایینی حاوی پروتئین حاصل شد. مایع رویی جدا شده به میکروتیوب دیگری انتقال یافت و با حجم برابر خود از ایزوپروپانول مخلوط شد. سپس مخلوط حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ انکوبه و میکروتیوب در دور ۱۲۰۰۰ و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز بالایی دور ریخته شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه شد. میکروتیوب در دور ۷۵۰۰ و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و تیوب به مدت پنج دقیقه به طور معکوس قرار داده شد تا در دمای اتاق تا حدودی خشک شود. خشک شدن، به علت کاهش حلالیت RNA، نباید به طور کامل انجام شود. بر روی رسوب، ۲۴ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (۰/۰۱) اضافه و سپس OD آن خوانده شد. برای تعین غلظت RNA از روش اسپکتروفتومتری با حداکثر جذب RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتری استفاده 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 قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی

نتایج مربوط تاثیر تیمارها بر قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۵، ۱۴ و ۲۱ کشت در شکل ۱ نشان داده شده است. در روز ۵ کشت، قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و ملاتونین نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان گروه‌های H۲O۲ و ملاتونین +H۲O۲ از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در روز ۱۴ کشت، قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و ملاتونین نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود (P≤۰/۰۵) و همچنین کمترین قطر کلونی‌ها در گروه H۲O۲ مشاهده شد (P≤۰/۰۵). در روز ۲۱ کشت، بیشترین و کمترین قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌ترتیب در گروه‌های ملاتونین و H۲O۲ مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و همچنین قطر کلونی‌ها در گروه ملاتونین +H۲O۲ از گروه شاهد کمتر بود (P≤۰/۰۵).

تاثیر تیمارهای مختلف بر زنده‌مانی و سطح آپوپتوزیس

نتایج مربوط تاثیر تیمارها بر زنده‌مانی و سطح آپوپتوزیس در سلول‌های اسپرماتوگونی در شکل ۲ بیان شده است. تیمارهای ملاتونین و H۲O۲ به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین درصد زنده‌مانی را نشان دادند (P≤۰/۰۵). اختلاف میان سایر تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبود (P≤۰/۰۵).

مقدار آپوپتوز اولیه و ثانویه در گروه‌های دریافت‌کننده تیمارهای ملاتونین و H۲O۲ به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین بود (P≤۰/۰۵) و

شکل ۱- تاثیر تیمارها بر قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای پنجم، چهاردهم و بیست و یکم کشت. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

اختلاف میان سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). استفاده از تیمارهای مختلف تاثیری بر درصد سلول‌های نکروزه نداشت (P>۰/۰۵).

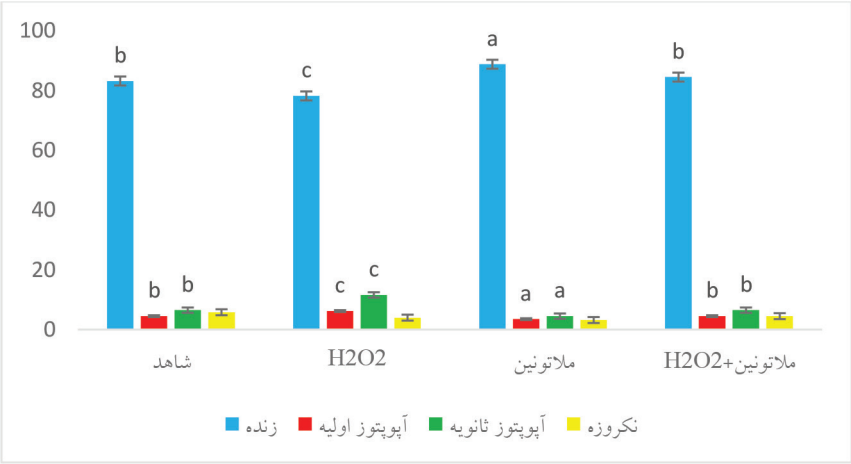
تاثیر تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BCL2* و *BAX*)

نتایج مربوط تاثیر تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در شکل ۳ گزارش شده است. کمترین و بیشترین مقدار بیان ژن *BAX* به‌ترتیب در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه‌های ملاتونین و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان گروه‌های شاهد و ملاتونین +H_2O_2 از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بیشترین مقدار بیان ژن *BCL2* در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه ملاتونین مشاهده شد و کمترین میزان بیان *BCL2* مربوط به گروه H_2O_2 بود (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 ملاتونین و H_2O_2 مشاهده شد (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان گروه‌های شاهد و ملاتونین +H_2O_2 از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، پایه و اساس اسپرماتوژنز، باروری و هم‌چنین مدلی عالی برای کمک به درک بیشتر روند تمایز، رشد و عملکرد بیضه‌ها هستند. از این رو مطالعات بیشتر و هدفمند، امکان استفاده بیشتر از این سلول‌ها را در درمان نازایی، تولید حیوان‌های تراریخته و داروهای نوترکیب فراهم می‌کنند. در این پژوهش، اثر افزودن هورمون ملاتونین در محیط کشت SSCs بر اندازه قطر کلونی‌ها، سطح آپوپتوزیس و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد استفاده از ملاتونین در محیط کشت موجب بهبود اندازه قطر کلونی‌ها و کنترل سطح بروز آپوپتوزیس اولیه و ثانویه و افزایش زنده‌مانی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند می‌شود. از طرف دیگر، بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* به عنوان عوامل بازدارنده و پیش‌برنده آپوپتوزیس نیز در حضور هورمون ملاتونین به ترتیب افزایش و کاهش یافت. یافته‌های حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر همخوانی داشته است که در آن‌ها گزارش شده بود ملاتونین قطر و زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا موش در دوره کشت افزایش می‌دهد (۸ و ۱۰). همچنین گزارش شده است که استفاده از ملاتونین در محیط کشت موجب افزایش مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونیا در بز شده است (۵). در گونه گاو نیز استفاده از ملاتونین در محیط کشت سبب افزایش قطر کلونی‌های اسپرماتوگونیا شده است (۶).

آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یک پدیده عملکردی و فیزیولوژیکی بسیار مهم است که برای تکثیر و تمایز سلول‌ها ضروری می‌باشد. نتایج ارزیابی سطح بروز آپوپتوزیس در این مطالعه نشان داده که ملاتونین دارای نقش تاثیرگذار حفظ زنده‌مانی سلول‌ها و کاهش بروز آپوپتوزیس در سلول‌های کشت شده است که با گزارشات سایر محققات همخوانی داشته است و آن‌ها بیان کرده‌اند استفاده از ملاتونین سبب کاهش بروز آپوپتوزیس و جلوگیری از مرگ سلولی در سیستم‌های کشت می‌شود (۱۵). همچنین تیمار ملاتونین در سلول‌های زایای بیضه منجمد-ذوب شده موش‌های نوزاد، باعث تکثیر سلولی در سلول‌های طبیعی شده و از سیگنال‌دهی آپوپتوز میتوکندری از طریق هدف‌گیری خاص *BAX/BCL2* جلوگیری می‌کند. همچنین افزایش بیان ژن‌های ضد آپوپتوز *BCL2* و *BCL-XL* در گروه تیمار شده با ملاتونین گزارش شده است در حالی که میزان بیان پروتئین پروآپوپتوز *BAX* و پروتئین کاسپاز-۳ مرتبط با مسیر آپوپتوز به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرده است (۴) که نتایج این مطالعات با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بز نیز استفاده از ملاتونین منجر به



شکل ۲- تاثیر تیمارها بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (BAX و BCL۲). حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

افزایش قابل توجهی در بیان ژن‌های ضد آپوپتوز *BCL2* و *BCL-XL* و کاهش قابل توجهی در بیان ژن پرو آپوپتوز *BAX* شده است (۲) زیرا ملاتونین با کاهش نسبت بیان ژن *BAX/BCL2* و ژن کاسپاز-۳ از بروز آپوپتوزیس در سلول‌های اسپرماتوگونی جلوگیری می‌کند (۹). ملاتونین با حفظ تعادل ردوکس و آپوپتوز سلولی، تشکیل اتوفاگوزوم را کاهش می‌دهد (۱۴). نتایج مطالعات فلوسایتومتری نیز نشان داده ملاتونین با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود موجب کاهش بروز آپوپتوزیس و افزایش نرخ زنده‌مانی می‌گردد (۱۷). مکانیسمی که ملاتونین از طریق آن نفوذپذیری غشای میتوکندری را تنظیم می‌کند با کاهش تولید ROS و تنظیم بیان *BAX/BCL2* همراه است. این امر ورود سیتوکروم C به سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد و به طور موثری از فعال‌شدن مسیر آپوپتوز کاسپاز جلوگیری می‌کند. در نتیجه نرخ بروز آپوپتوزیس کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از ملاتونین در محیط کشت موجب بهبود اندازه قطر کلونی‌ها و کنترل سطح بروز آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند می‌شود. همچنین ملاتونین بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* به عنوان عوامل بازدارنده و پیش‌برنده آپوپتوزیس را به ترتیب افزایش و کاهش داد. بنابراین افزودن هورمون ملاتونین به محیط کشت می‌تواند راهکاری مفید برای حفظ و نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در زمان کشت سلولی طی مطالعات تحقیقاتی باشد.

منابع مورد استفاده

1- Cruz, M.H.C. Leal, C.L.V. da Cruz, J.F. Tan, D.X and R.J. Reiter. 2014. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. *Animal reproduction science* 145:150-160.

2- Feng, T.Y. Li, Q. Ren, F. Xi, H.M. Lv, D.L. Li, Y and J.H. Hu. 2020. Melatonin protects goat spermatogonial stem cells against oxidative damage during cryopreservation by improving antioxidant capacity and inhibiting mitochondrial apoptosis pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020: 5954635.

3- Galano, A. Tan, D.X and R.J. Reiter. 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of pineal research*, 51:1-16.

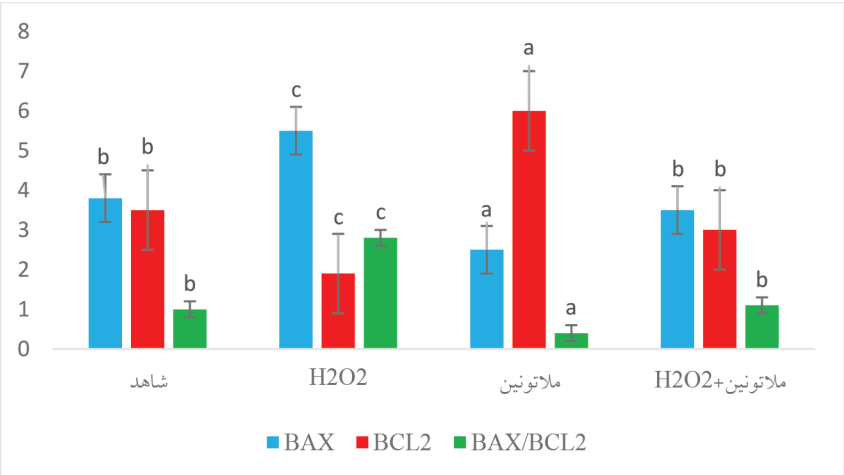
4- Gholami, M. Saki, G. Hemadi, M and A. Khodadadi. 2013. Effect of melatonin on the expression of apoptotic genes in vitrified-thawed spermatogonia stem cells type A of 6-day-old mice. *Iranian journal of basic medical sciences* 16:906.

5- Gholampour, Y. Rahimi, P. Moghaddam, A and S. Alimohammadi. 2019. Effect of gonadotropin releasing hormone on In Vitro caprine spermatogonial stem cell proliferation. *Online Journal of Veterinary Research* 23: 414-430.

6- Izadyar, F. Den Ouden, K. Creemers, L.B. Posthuma, G. Parvinen, M. and D.G. De Rooij. 2003. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biology of reproduction* 68:272-281.

7- Kanbar, M. De Michele, F and Wyns, C. 2019. Cryostorage of testicular tissue and retransplantation of spermatogonial stem cells in the infertile male. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 33: 103-115.

8- Mahaldashtian, M. Naghdi, M. Ghorbanian, M.T. Makoolati, Z.



شکل ۳- تاثیر تیمارها بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (BAX و BCL۲). حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

Movahedin, M and S.M. Mohamadi. 2016. In vitro effects of date palm (Phoenix dactylifera L.) pollen on colonization of neonate mouse spermatogonial stem cells. *Journal of ethnopharmacology* 186: 362-368.

9- Mukherjee, A. Haldar, C and D.K. Vishwas. 2015. Melatonin prevents dexamethasone-induced testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in golden hamster, M esocricetus auratus. *Andrologia* 47: 920-931.

10- Navid, S. Abbasi, M and Y. Hoshino. 2017. The effects of melatonin on colonization of neonate spermatogonial mouse stem cells in a three-dimensional soft agar culture system. *Stem Cell Research & Therapy* 8:1-10.

11- Navid, S. Rastegar, T. Baazm, M. Alizadeh, R. Talebi, A. Gholami, K. Khosravi-Farsani, S. Koruji, M and M. Abbasi. 2017. In vitro effects of melatonin on colonization of neonate mouse spermatogonial stem cells. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 63:370-381.

12- Pan, C.Y. Shuai, Y.U. Zhang, P.F. Bo, W.A.N.G. Zhu, Z.D. Liu, Y.Y and W.X. Zeng. 2017. Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of integrative agriculture* 16: 1120-1129.

13- Rodriguez, C. Mayo, J.C. Sainz, R.M. Antolín, I. Herrera, F. Martín, V and R.J. Reiter. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research* 36:1-9.

14- Shen, M. Cao, Y. Jiang, Y. Wei, Y and H. Liu. 2018. Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FOXO1-mediated autophagy: Implication of an antioxidation-independent mechanism. *Redox biology* 18:138-157.

15- Sun, T.C. Li, H.Y. Li, X.Y. Yu, K. Deng, S. L and L. Tian. 2020. Protective effects of melatonin on male fertility preservation and reproductive system. *Cryobiology*, 95:1-8.

16- Taskin, E. Guven, C. Kaya, S.T. Sahin, L. Kocahan, S. Degirmencioglu, A.Z. Gur, F.M and Y. Sevgiler. 2019. The role of toll-like receptors in the protective effect of melatonin against doxorubicin-induced pancreatic beta cell toxicity. *Life sciences*, 233:116704.

17- Xu, C. Wu, A. Zhu, H. Fang, H. Xu, L. Ye, J and J. Shen. 2013. Melatonin is involved in the apoptosis and necrosis of pancreatic cancer cell line SW-1990 via modulating of Bcl-2/Bax balance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67:133-139.