

## Effect of different concentrations of melatonin on SSCs colony formation (*In vitro*)

Hesam Jamshidi-Seykevandi<sup>1</sup>, Peyman Rahimi-Feyli<sup>1\*</sup>, Ali-Asghar Moghaddam<sup>1</sup>

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received:2019/08/25

Accept: 2019/12/10)

### Abstract

**Background:** Spermatogonial Stem Cells (SSCs) are used as an excellent model system for differentiation, development, and functioning of testes and provide a source of cells for infertility treatment and production of transgenic animals and recombinant drugs. The aim of the present study was to determine the effects of different concentrations of melatonin on prepubertal lamb's spermatogonial colony formation.

**Methods:** An experimental study was conducted. Each treatment was replicated 5 times. Testicular cells were isolated from testes of prepubertal lambs using two-step enzymatic digestion and then cultured for 10 days. Control cells (C) were grown in basic DMEM media with %1 antibiotic and %5 FBS. Treated cells were grown in basic media with 1  $\mu\text{mol/ml}$  (T1) or 1  $\text{nmol/ml}$  (T2) melatonin. Culture media was changed every 72h and SSCs colony formation was monitored via inverted microscope. Data were analyzed running one way ANOVA. P values less than %5 were considered as statistically significant.

**Results:** SSCs were identified via immunocytochemistry assay against PGP9.5. Number and surface area of colonies were greater in T1 group than C and T2 groups on day 7 ( $P=0.04587$ ).

**Conclusion:** The findings suggest that simultaneous addition of 1  $\mu\text{mol/ml}$  melatonin to culture media may increase in vitro colony formation of prepubertal sheep SSCs. So, addition of above dose of melatonin to SSCs culture media is suggested.

**Keywords:** Spermatogonial Stem cell; Colony formation; Melatonin

\* Corresponding Author: Peyman Rahimi-Feyli

Email: drp.rahimi@gmail.com

# بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف ملاتونین بر القای کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی (*In vitro*) در شرایط آزمایشگاه

حسام جمشیدی سیکه‌وندی<sup>۱</sup>، پیمان رحیمی‌فیلی<sup>۱\*</sup>، علی اصغر مقدم<sup>۱</sup>

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۱۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۰۳

## چکیده:

**سابقه و هدف:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) مدلی عالی برای کمک به درک بیشتر روند تمایز، رشد و عملکرد بیضه‌هاست و در نتیجه امکان استفاده بیشتر از این سلول‌ها در درمان نازایی، تولید حیوان‌های تراریخته و داروهای نو ترکیب را فراهم می‌کند. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین بر القای کلونی‌زایی SSCs است. مطالعه حاضر در بازه زمانی تابستان ۱۳۹۶ و در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد. **مواد و روش‌ها:** نوع مطالعه حاضر تجربی بود. در مجموع پنج بار نمونه‌گیری از کشتارگاه و تکرار آزمایش انجام شد. سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه بره‌های نابالغ با استفاده از هضم آنزیمی دو مرحله‌ای استخراج شد و سپس به مدت ۱۰ روز در سه گروه شامل گروه شاهد (کشت ساده در محیط پایه DMEM حاوی درصد آنتی بیوتیک و ۵ درصد سرم گوساله جنینی (FBS)) و تیمارهای ۱ و ۲ (به ترتیب کشت در محیط کشت پایه مذکور توام با اضافه کردن یک میکرومول و یک نانومول ملاتونین) کشت شدند. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت یک‌بار انجام و همزمان تعداد و قطر کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. آزمون آماری مورد استفاده آنالیز واریانس یکطرفه و سطح معناداری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. **یافته‌ها:** ماهیت بنیادینگی سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9/5 تایید شد. تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز هفتم کشت در تیمار یک به طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بود ( $P = 0.04578$ ). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد افزودن ملاتونین با دوز یک میکرومول تاثیر مثبتی بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه دارد. نویسندگان استفاده از هورمون ملاتونین را با دوز فوق برای کشت اسپرماتوگونی گوسفند پیشنهاد می‌کنند.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، کلونی‌زایی، ملاتونین

## مقدمه:

در محیط آزمایشگاه نقش مهمی در حفظ و نگه‌داری اسپرم و درمان ناباروری بویژه در بیماران نجات یافته از سرطان دارد (۵ و ۴). تاکنون جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انسان (۸-۶) و حیوان‌هایی نظیر موش (۹) رت (۱۰)، ماهی (۱۱)، دام‌های اهلی از جمله گاو (۱۲)، بز (۱۳) و خوک (۱۴) انجام شده است. کشت این سلول‌ها در محیط کشت سردار و فاقد سرم (۱۵ و ۱۶) همراه با لایه تغذیه‌کننده سلول‌های سرتولی (۱۷) و لایه تغذیه‌کننده سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (۱۸) انجام گرفته است. در مطالعه‌های اخیر که عوامل مرتبط با رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت از جمله فاکتور نوتروتروپیک مشتق شده از سلول‌های کلیال (GDNF) (۱۹)، فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF) (۱۹)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) (۱۹) و فاکتور سلول بنیادی (SCF) (۲۰) بررسی شده‌اند،

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی<sup>۱</sup> (SSCs) تنها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند (۱) و از طریق تکثیر و تولید مداوم، فرآیند اسپرماتوزن را پیش می‌برند. وجود تعداد اندک سلول‌های بنیادی در بیضه‌های بالغان، جداسازی آن‌ها برای مطالعه‌های آزمایشگاهی با محدودیت مواجه کرده است (۲). از طرف دیگر، شیمی درمانی یا اشعه درمانی طولانی‌مدت در بیماران مبتلا به سرطان، اثر مخربی روی این سلول‌ها دارد و می‌تواند به ناباروری این بیماران پس از درمان منجر شود (۳). بنابراین، روش‌های کارا و با کفایت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

Spermatogonial stem cells

1

نویسنده مسئول: پیمان رحیمی‌فیلی

پست الکترونیکی: drp.rahimi@gmail.com

ریبو نوکلئاز (۵ درصد میلی گرم بر میلی لیتر) به نمونه اضافه شد و پتری دیش‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. برای جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعه‌های باقی‌مانده، لوله‌های فالكون در دور ۸۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. برای حذف سلول‌های میوبئید، تعلیق سلولی مذکور از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرونی استریل عبور داده شد. در ادامه برای رسوب سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی لوله‌های فالكون در دور ۸۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و برای کشت استفاده شد.

### شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی با رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی:

برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه نشانگر PGF۹,۵ از روش حیدری و همکاران (۱۳) استفاده شد. پس از جداسازی سلول‌ها بلوک مکان غیر اختصاصی به وسیله avidin/biotin و بلوک مکان غیر اختصاصی دیگر با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس اسلاید با آنتی بادی اولیه غیر کوئزوگه خرگوش علیه نشانگر PGF۹,۵ (Dako, Carpinteria, USA) با رقت ۱:۱۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مقطع پس از سه مرتبه شست‌وشو با TBS/BSA (هر بار پنج دقیقه) در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه در تماس با آنتی بادی ثانویه (Avicenna, Biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Research Institute, Iran) قرار گرفت و با TBS/BSA شست‌وشو شد. در ادامه مقطع به مدت ۳۰ دقیقه در تماس با HPR-conjugated streptavidin (Biosource, USA) با رقت ۱:۵۰۰ قرار داده شد و با TBS/BSA شست‌وشو شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی آمینو بنزیدین (Roche, Germany) به مقطع به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه، رنگ نمایان شد. سپس اسلاید با آب مقطر کاملاً تمیز شد و با هریس هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی و با آب مقطر شست‌وشو شد. در ادامه، اسلاید با الکل آبگیری و با گریلول شفاف و با اتانتال (Merck, Germany) پوشانده شد. در انتها، سطح اسلاید به وسیله گلیسرول و PBS پوشانده شد و زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

### شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها:

وضعیت حیات سلول‌ها به کمک رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK) ارزیابی شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط و به مدت چند دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس با شمارش ۱۰۰ سلول به طور تصادفی، تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین و بر این اساس درصد حیات نمونه محاسبه شد.

### انتقال سلول‌های جدا شده به پلیت و افزودن ملاتونین:

پس از شمارش سلول‌ها با لام هماسیتومتر، در هر گوده از پلیت کشت چهارخانه‌ای (TPP, Switzerland) ۵۰ هزار سلول کشت داده شد.

گوده شماره ۱، گروه شاهد: محیط پایه شامل تعلیق سلولی در ۵۰۰ میکرولیتر DMEM حاوی یک درصد FBS و آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین به ترتیب با غلظت یک واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

گوده شماره ۲: ۵۰۰ میکرولیتر محیط پایه حاوی یک میکرومول ملاتونین (Melatonin, Sigma, Germany)

گوده شماره ۳: یک نانومول بر میلی‌لیتر ملاتونین.

سپس پلیت کشت به مدت ۱۰ روز درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت یک‌بار انجام شد.

### تعیین تعداد و مساحت کلونی‌های سلولی:

ارزیابی تعداد و مساحت کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ کشت به کمک میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج استفاده شد. برای محاسبه مساحت کلونی بر حسب میلی‌متر مربع از نرم افزار Image J (version ۱,۲۴۰, Bethesda, MD, USA) استفاده شد (۳۲).

### روش تجزیه و تحلیل آماری:

نتایج حاصل از پنج بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده از لحاظ نرمال بودن ارزیابی شدند. سپس روی داده‌های

مشخص شد که تمامی این عوامل در رشد و تکامل SSCs در محیط آزمایشگاه نقش حیاتی دارند. ملاتونین هورمون مهمی با خواص آنتی اکسیدانی، پاسخ ایمنی، برقراری ارتباطات سلولی و حفاظت از بافت عصبی است (۲۱). در خلال متابولیسم فیزولوژیک طبیعی سلول، گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) بویژه در میتوکندری تولید می‌شود که اثر مخربی بر ارتباطات سلولی دخیل در تنظیم تکثیر و بقای سلول دارد (۲۲).

ملاتونین نقش مهمی در کاهش تولید ROS سلولی و مهار جهش‌های بالقوه DNA ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو دارد (۲۳). ماهیت آملی فیلک ملاتونین نقش مهمی در محافظت گامت‌ها و رویان‌های پستانداران در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و مرگ سلولی در محیط کشت دارد (۲۴). گیرنده‌های ملاتونین (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>) گیرنده‌های متصل شونده به پروتئین G هستند و ظهور این گیرنده‌ها در سلول‌های سرتولی رت، موش، گوسفند، گاو و انسان (۲۸-۲۵) و همچنین در اسپرماتوزوئید و اسپرماتوسیت (۳۱-۲۹) گزارش شده است. با این حال، اثر ملاتونین به عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده تولید مثل بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به خوبی مشخص نشده است. از طرفی با توجه به اهمیت گونه دامی گوسفند در تولید حیوانات مدل، تراریخته و داروهای نوترکیب انسانی ضرورت انجام این مطالعه آشکار می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اضافه کردن ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان به محیط کشت و تعیین اثر آن روی تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بره در محیط کشت بود. مطالعه حاضر در باره زمانی تیر ماه تا شهریور ۱۳۹۶ انجام شد. نمونه‌گیری از کشتارگاه صنعتی بیستون و کشت سلول‌ها در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد.

### مواد و روش‌ها:

مطالعه حاضر تجربی است. تمامی مواد و آنزیم‌های مصرفی در این مطالعه ساخت شرکت Sigma کشور آمریکا است. در موارد غیر از این، شرکت سازنده ذکر شده است. نمونه‌گیری و انتقال نمونه:

نمونه‌های بیضه از بره‌های نابالغ دو تا چهار ماهه از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان کرمانشاه تهیه و در کنار یخ در عرض کمتر از دو ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی منتقل شد. در آزمایشگاه بیضه از اسکروتوم خارج و متعاقب جدا کردن اپی دیدیم، بیضه چند بار شست‌وشو و به کمک قیچی استریل ۱۰ گرم از بافت پارانثیم بیضه جدا و به داخل لوله فالكون SPL (South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, UK) محتوی ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنیسیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco, Paisley, UK) منتقل و هر کدام از لوله‌ها سه نوبت و هر بار به مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ (Hettach, Germany) شد (۳۲).

### جداسازی سلول‌های بنیادی:

برای استخراج سلول‌های بنیادی بیضه از روش Aponte و همکاران (۳۳) به شرح زیر استفاده شد.

### هضم مکانیکی بافت پارانثیم بیضه:

بافت پارانثیم بیضه پس از شست‌وشو به داخل پتری دیش استریل منتقل و با استفاده از قیچی استریل به طور کامل قطعه قطعه شد.

### هضم آنزیمی بافت پارانثیم بیضه:

در مرحله اول هضم آنزیمی به پتری دیش‌های حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و تریپسین (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و پتری دیش‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. برای افزایش بازدهی تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانثیم 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 یک بار بافت پارانثیم بیضه در زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX71 inverted microscope) بررسی شد. نمونه پس از مرحله اول هضم آنزیمی سه مرتبه با دور ۱۴۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله دوم آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دزوکسی

جدول ۱- تعداد کلونیه‌های اسپرماتوگونی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) در گروه‌های مختلف آزمایشی و روزهای مختلف پس از کشت

گروه‌های آزمایشی				
نانومول	میکرومول	شاهد	روز پیگیری	
$101.5 \pm 14.2$	$102.5 \pm 6.5$	$81 \pm 9.6$	۴	
$92.75 \pm 6.3^{ab}$	$113.5 \pm 4.3^a$	$83.25 \pm 6.5^b$	۷	
$114.5 \pm 15.3$	$119 \pm 7.9$	$86.75 \pm 2.6$	۱۰	

a و b: مقادیر متفاوت در هر ردیف با حروف مختلف از نظر آماری اختلاف معناداری دارند ( $P < 0.05$ )

### مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی:

همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، مجموع مساحت کلونی‌ها در روز هفتم پس از کشت در گروه میکرومول ( $1/0.25 \pm 0.057$ ) به طور معناداری از گروه شاهد ( $0/0.716 \pm 0.06$ ) بیشتر است ( $P < 0.05$ )، ولی مجموع مساحت کلونی‌ها در گروه نانومول با هیچ کدام از دو گروه دیگر اختلاف معناداری ندارد ( $P > 0.05$ ). همچنین میانگین کل مساحت کلونی‌ها در روز ۱۰ پس از کشت ( $0/0.999 \pm 0.06$ ) به طور معناداری از روز چهارم پس از کشت ( $0/0.815 \pm 0.063$ ) بیشتر بوده، ولی از این نظر اختلاف معناداری بین روز هفت پس از کشت و روزهای چهار و ۱۰ پس از کشت وجود نداشت.

جدول ۲: مجموع مساحت ( $\text{mm}^2$ ) کلونی‌های اسپرماتوگونی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) گروه‌های آزمایشی مختلف در روزهای مختلف پس از کشت

گروه‌های آزمایشی				
نانومول	میکرومول	شاهد	روز پیگیری	
$0.839 \pm 0.161$	$0.912 \pm 0.04$	$0.694 \pm 0.08$	۴	
$0.821 \pm 0.073^{ab}$	$1.035 \pm 0.1^a$	$0.716 \pm 0.1^b$	۷	
$1.072 \pm 0.129$	$1.082 \pm 0.04$	$0.844 \pm 0.1$	۱۰	

a و b: مقادیر متفاوت در هر ردیف و در هر ستون با حروف مختلف از نظر آماری اختلاف معناداری دارند ( $P < 0.05$ ).

### بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد اضافه کردن ملاتونین به میزان یک میکرومول به محیط کشت SSCs سبب افزایش معنادار تعداد و مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز هفتم پس از کشت می‌شود ( $P > 0.05$ ). میانگین درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی زنده بلافاصله بعد از جداسازی در مطالعه حاضر  $85/0.5 \pm 1/8$  درصد بود که رقمی قابل قبول است. در مطالعه‌های دیگر که در گونه‌های مختلف انجام شده، درصد حیات سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی را  $1/2 \pm 1/3$ ،  $85/3 \pm 2/2$ ،  $89/25 \pm 3/63$  و  $86/77 \pm 3/63$  درصد گزارش کردند (۳۲ و ۳۵-۳۴). نتایج مطالعه حاضر از نظر درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با نتایج

نرمال آزمون آنالیز واریانس انجام شده و اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین، طول مدت کشت و اثر متقابل ملاتونین  $\times$  طول مدت کشت بررسی شد. مقایسه تعداد و مساحت کلونی‌ها در تیمارهای مختلف با آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنادار  $0.05 > P$  انجام شد.

مدل آماری استفاده شده به صورت زیر است: آنالیز تکرار شده در قالب طرح کاملاً تصادفی

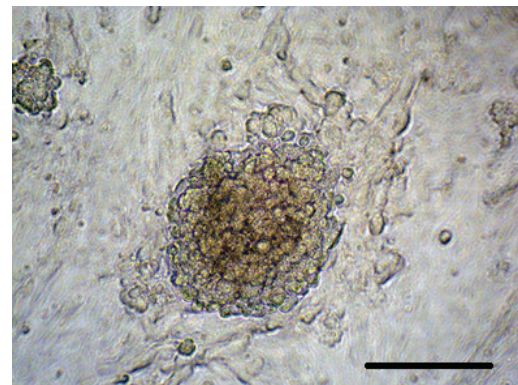
$$\mu = \text{subject (treatment)} + \text{time} + \text{treatment} * \text{time}$$

### یافته‌ها:

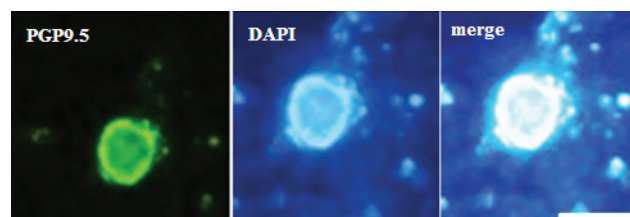
درصد زنده‌مانی سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی  $85/1 \pm 1/8$  به دست آمد.

### شکل‌گیری کلونی‌های اسپرماتوگونی:

با گذشت زمان سلول‌های اسپرماتوگونی موجود در داخل پلیت، کلونی تشکیل داده و با رشد خود بر تعداد و اندازه کلونی‌ها افزوده می‌شود. در شکل شماره یک کلونی اسپرماتوگونی در روز دهم کشت نشان داده شده است. پس از پایان دوره کشت با استفاده از آزمون ایمونوفلورسانت بیان آنتی ژن PGP9.5 در کلونی‌ها تایید شد (شکل شماره ۲).



شکل ۱- کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی در روز دهم پس از کشت. میله: ۱۰۰ میکرومتر



شکل ۲- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانت علیه آنتی ژن PGP9.5. هسته سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI مشخص شده است. میله: ۴۰ میکرومتر.

### تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

همان‌طور که در جدول شماره یک مشاهده می‌شود میانگین تعداد کلونی‌ها در روز هفتم پس از کشت در گروه میکرو ( $113/4 \pm 5/43$ ) به طور معناداری از گروه شاهد ( $73/6 \pm 25/57$ ) بیشتر است ( $P < 0.05$ )، ولی میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه نانومول با هیچ کدام از دو گروه دیگر اختلاف معناداری ندارد ( $P > 0.05$ ). همچنین میانگین کل تعداد کلنی در گروه میکرو ( $111/3 \pm 67/96$ ) به طور معناداری از گروه شاهد ( $80/3 \pm 33/98$ ) بیشتر است ( $P < 0.05$ )، ولی میانگین کل تعداد کلونی‌ها در گروه نانومول با هیچ کدام از دو گروه دیگر اختلاف معناداری ندارد ( $P > 0.05$ ). میانگین و میانگین کل تعداد کلونی‌ها در روزهای مختلف کشت (روزهای ۴، ۷ و ۱۰) با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند.

این فاکتورهای رشد به صورت ترکیبی استفاده شد، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A به صورت معناداری از گروه شاهد و سایر گروه‌هایی که تک تک فاکتورهای رشد را اضافه کردند، بیشتر بود. همچنین بیشترین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A بین گروه‌هایی که تک تک فاکتورهای رشد به صورت مجزا به آن‌ها اضافه کردند، مربوط به گروه دریافت کننده GDNF بود. معتقدند حضور تعداد محدودی سلول سوماتیک در محیط کشت می‌تواند از طریق ترشح سایتوکین‌ها به تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی کمک کند (۳۳). در ضمن نشان دادند که ملاتونین می‌تواند ترشح GDNF را در سلول‌های سرتولی افزایش دهد. GDNF به RET-GFRA1 متصل می‌شود و به فسفریلاسیون مسیره‌های AKT و ERK برای تنظیم تکثیر و خودنوزایی SSCs منجر می‌شود (۱). با توجه به مطالعه‌های بالا و حضور سلول‌های سرتولی در محیط کشت ما و ترشح GDNF توسط این سلول‌ها و نقش مهم GDNF در فرآیند اسپرماتوژنز و تاثیر بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، افزایش تعداد کلونی‌ها می‌تواند به احتمال به دلیل اثر ملاتونین بر سلول‌های سرتولی باشد. ملاتونین با اثر ضد آپوپتوزی، آنتی‌اکسیدانی و تاثیر بر گیرنده سلول‌های سرتولی و ترشح GDNF به احتمال می‌تواند بر افزایش رشد خود نوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقش مثبت و قابل توجهی داشته باشد. و این اثر افزایشی وابسته به دوز و از طریق سلول‌های سرتولی امکان پذیر است.

در تمام گروه‌های آزمایشی تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی از روز چهار تا روز ۱۰ به طور غیر معنادار افزایش یافت. همچنین میانگین کل مساحت کلونی‌ها در روز ۱۰ پس از کشت به طور معناداری از روز چهارم پس از کشت بیشتر بود. شهبازی و همکاران به بررسی اثر غلظت‌های متفاوت ژل رویال بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بره در محیط آزمایشگاه پرداختند و نشان دادند که تعداد و مساحت کلونی‌ها در تمامی گروه‌ها همانند نتایج مطالعه حاضر مدام در حال افزایش بود (۴۷). کروجی و همکاران نشان دادند که همکشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی سبب افزایش تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان می‌شود (۴۸). در مطالعه تاجیک و همکاران (۲۰۱۳) افزایش تعداد کلونی‌ها تا روز ۱۰ مدت کشت مشاهده شد، ولی بعد از آن تا پایان زمان کشت (روز شانزدهم) کاهش یافت. همچنین مساحت کلونی‌ها تا روز هفتم افزایش داشت و بعد از آن دچار افت و خیز شد (۴۹). در مطالعه غلامپور و همکاران نیز تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. همچنین این مطالعه افزایش مساحت کلونی‌های روز ۱۰ نسبت به روز چهارم معنادار بود (۵۰). مزایای استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بخصوص گونه‌های دامی در تحقیق‌ها عبارت است از: ۱- استحصال و استخراج این سلول‌ها بسیار راحت است. به عنوان مثال؛ در مورد دام اهلی می‌توان با مراجعه به کشتارگاه و اخذ بافت بیضه بدون نگرانی در مورد بحث اخلاق پزشکی و رفاه و آسایش حیوان‌ها نمونه را به دست آورد. ۲- با تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه و پیوند آن‌ها به مدل آرواسپرمی می‌توان باروری را دوباره در بیماران سرطانی که تحت رادیوتراپی بوده‌اند، برگرداند و همچنین می‌توان از این تکنیک در حفظ حیوان‌های در حال انقراض بهره جست ۳- از آنجا که اسپرماتوزوا تنها سلول بدن است که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کند، می‌توان با دستکاری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوان ترانسژن طراحی کرد. از جمله محدودیت استفاده از این سلول‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱- تعدادشان در بدن کم است ۲- به دلیل اینکه جزو سلول‌های بنیادی بالغ هستند، پس از چند مرحله کشت دچار پیری می‌شوند. ۳- جداسازی و کنترل مراحل کشت آن سخت‌تر از سلول‌های بنیادی جنینی است. (۵۱).

### نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد افزودن ملاتونین به محیط کشت تاثیر مثبتی در القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد و اضافه کردن آن به محیط کشت با دوز کلونی زایی مورد استفاده در این مطالعه (یک میکرومول) توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی:

این مقاله استخراج شده از رساله دکتری عمومی دامپزشکی است و تمامی هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه رازی تامین شده است.

مطالعه‌های فوق همخوانی دارد که بیانگر اجرای صحیح تکنیک جداسازی و انتخاب دوز صحیح آنزیم‌هاست.

در مطالعه حاضر برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتیژن PGP9.5 استفاده شد و دیده شد که سلول‌های جدا شده از بیضه این نشانگر پروتئینی را بیان کردند، بنابراین می‌توان از این نشانگر برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی در گوسفند بهره برد. در چندین مطالعه از آنتیبادی علیه آنتیژن PGP9.5 برای شناسایی ایمونوسیتوشیمی و ایموهیستوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A در گونه‌های مختلف از جمله گوسفند (۳۶)، انسان (۳۷)، موش (۳۸) و بز (۱۳) استفاده شده است.

Bowen Niu و همکاران نشان دادند افزودن یک میکرومول ملاتونین به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در مقایسه با افزودن یک نانومول، منجر به افزایش بیشتر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی شد (۱). در جدیدترین مطالعه، شادان و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثر آزمایشگاهی ملاتونین بر کلونیزاسیون سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد پرداختند (۳۹). در آن مطالعه تعداد و قطر کلونی‌های SSC در روزهای ۷ و ۱۴ کشت و بیان Plzf، Irf4 و C-kit با استفاده از real-time PCR در انتهای دوره کشت بررسی شد. در این مطالعه میزان زنده ماندن سلول‌های کشت شده در حضور ملاتونین (۱۰۰ میلی مولار ملاتونین) به طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بود و تعداد و قطر کلونی‌ها در سلول‌های تیمار شده با ملاتونین همانند نتایج مطالعه حاضر افزایش یافت. این محققان ثابت کردند که اضافه کردن ملاتونین به میزان ۱۰۰ میکرومول به محیط کشت سبب کاهش بازتولید ROS و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود. در برخی از مطالعه‌ها اضافه کردن ملاتونین به محیط کشت سلول‌هایی همچون اووسیت و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با کاهش استرس سلولی ناشی از ROS توام بوده است (۴۱-۴۰). غلامی و همکاران در یک سری تحقیق‌ها در باره اثر ملاتونین روی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به موش‌های مبتلا به آرواسپرمی نشان دادند که ملاتونین سبب بهبود ساختار بافت بیضه می‌شود (۴۲). همین محققان در مطالعه‌ای دیگر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نشان دادند که اضافه کردن ملاتونین سبب تکثیر سلول‌های طبیعی و آپوپتوز سلول‌های آسیب دیده می‌شود (۴۳). ملاتونین محرک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسیداز، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و کاتالاز و مهارکننده لیپواکسیژناز است. ملاتونین با تثبیت غشاهای میکرورومی، سبب مقاومت در برابر آسیب اکسیداسیونی می‌شود. ملاتونین در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع قوی‌تر از ویتامین E، مانتیول، گلوکاتایون دو برابر کارآمدتر از استرولولوکس است (۲۱). Bustos-Obregon و همکاران به بررسی نقش محافظتی ملاتونین در اسپرماتوزن موش تیمار شده توسط آرسنیت سدیم پرداختند. این محققان تغییر در وزن بیضه و اندازه‌گیری‌های هیستوپاتولوژیکی، مورفومتریک، بیان آنزیم‌های ۲-COX و آنزیم گیرنده آندروژن (AR) و سطح پراکسیداسیون لیپید را ارزیابی کردند. تیمار آرسنیک به تهنایی به کاهش قطر لوله و بیان AR و افزایش منطقه بنیابی، قطر لومینال، سطح بیان ۲-COX و پراکسیداسیون لیپید منجر شد، اما تیمار همزمان آرسنیک و ملاتونین سبب کاهش نسبی دژنراسیون سلول‌های بنیادی و میزان بیان AR و بهبود پارامترهای هیستوپاتولوژیکی بیضه شد (۴۴). اثبات تایید شده که اضافه کردن ملاتونین به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز سبب تحریک تولید GDNF توسط سلول‌های سرتولی و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود (۱). GDNF یک عضو دور از خانواده رشد دهنده فاکتور  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) و یک عامل مهم نوروتروف در تنظیم بقا و تمایز سلول‌های عصبی است. با توجه به اهمیت GDNF در مطالعه‌های آزمایشگاهی و درون تنی در چند سال گذشته، GDNF به عنوان یک عامل ضروری برای حفظ کشت طولانی SSC و تکثیر و خودسازی آن در مدل‌های آزمایشگاهی مورد توجه قرار گرفته است (۴۵). می‌توان از تعیین تعداد و قطر کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به عنوان یک معیار مورفولوژیکی در مطالعه‌های آزمایشگاهی استفاده کرد (۴۶).

Aponte و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی اثر فاکتورهای رشد EGF، GDNF، FGF2 و EGF، LIF به ترتیب با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های بنیادی گاو در طول مدت دو هفته کشت پرداختند و مشاهده کردند که در گروهی که تمامی

## منابع:

- Niu B, Li B, Wu C, Wu J, Yan Y, Shang R, Bai C, Li G, Hua J. Melatonin promotes goat spermatogonia stem cells (SSCs) proliferation by stimulating glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production in Sertoli cells. *Oncotarget*. 2016;7:77532-42.
- Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl*. 1996;17:708-17.
- Navid S, Abbasi M, Hoshino Y. The effects of melatonin on colonization of neonate spermatogonial mouse stem cells in a three-dimensional soft agar culture system. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8:233.
- Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA*. 2009;302:2127-34.
- Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:141.
- Chen Z, Niu M, Sun M, Yuan Q, Yao C, Hou J et al. Transdifferentiation of human male germline stem cells to hepatocytes in vivo via the transplantation under renal capsules. *Oncotarget*. 2017;8:14576-92.
- Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AM In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA*. 2011; 305: 2416-18.
- Ramathal C, Angulo B, Sukhwani M, Cui J, Durruthy-Durruthy J, Fang F, et al. DDX3Y gene rescue of a Y chromosome AZFa deletion restores germ cell formation and transcriptional programs. *Sci Rep*. 2015; 5: 15041.
- Helsel AR, Oatley MJ, Oatley JM. Glycolysis-Optimized Conditions Enhance Maintenance of Regenerative Integrity in Mouse Spermatogonial Stem Cells during Long-Term Culture. 2017;8:1430-41.
- Hamra FK, Richie CT, Harvey BK. Long Evans rat spermatogonial lines are effective germline vectors for transgenic rat production. *Transgenic Res*. 2017; 26: 477-89.
- Loppion G, Crespel A, Martinez AS, Auvray P, Sourdain P. Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res*. 2008; 33: 533-42.
- Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction*. 2002; 124, 85-94.
- Heidari B, Rahmati Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeedi Tehrani M, Shirazi A, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 1029-38.
- Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol reprod*. 1999; 61: 225-30.
- Creemers LB, Den Ouden K, Van Pelt AM, De Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction*. 2002; 124: 791-99
- Kanatsu Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol reprod*. 2005; 72: 985-91.
- Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia*. 2012;44:41-55.
- Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-Term Culture and Transplantation of Murine Testicular Germ Cells. *J Androl*. 2003; 24: 661-9.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*. 2003;69:612-6.
- Lee J, Boekelheide K, Blanchard KT. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression I. *Endocrinology*. 1998;139(1):236-44.
- Anisimov VN, et al. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5):573-89.
- Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981-90.
- He C, et al. Melatonin to ameliorate its function and improve mitochondria synthesize mice oocyte's quality under in vitro conditions. *Inter J Mol Sci*. 2016;17(6):939.
- Cruz MHC, et al. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. *Anim Reprod Sci*. 2014;145(3):150-60.
- Yang W-C, et al. Melatonin regulates the development and function of bovine sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. *Anim Reprod Sci*. 2014;147(1):10-6.
- Chabra A et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. *Hum Exp Toxicol*. 2014;33(2):185-95.
- Liu Y, et al. Melatonin modulates acute testicular damage induced by carbon ions in r mice. *Pharmazie*. 2009;64(10):685.
- Deng SL, et al. Melatonin promotes development of haploid germ cells from early developing spermatogenic cells of Suffolk sheep under in vitro condition. *J Pineal Res*. 2016;60(4):435-47.
- Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2012; 24:953-961.
- Liu C, Gao P, Xu SC, Wang Y, Chen CH, He MD, Yu ZP, Zhang

- L, Zhou Z. Mobile phone radiation induces mode-dependent DNA damage in a mouse spermatocyte-derived cell line: a protective role of melatonin. *Int J Radiat Biol.* 2013; 89:993-1001.
31. Yang WC, Tang KQ, Fu CZ, Riaz H, Zhang Q, Zan LS. Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. *Anim Reprod Sci.* 2014; 147:10-16.
32. Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. [Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro]. *Feyz.* 2016; 20 :205-213. (Persian)
33. Aponte, P.M., T. Soda, K.J. Teerds, S.C. Mizrak, H.J. van de Kant and D.G. de Rooij, 2008. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction* 136, 543-557.
34. Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 12740-12745.
35. Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4563-76.
36. Rodriguez-Sosa, J.R., H. Dobson and A. Hahnel, 2006. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* 66, 2091-2103.
37. Von Kopylow K, Kirchhoff C, Jezek D, Schulze W, Feig C, Primig M, et al. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. *Hum Reprod* 2010; 25(5): 1104-1112.
38. Kon Y, Endoh D, Iwanaga T. Expression of protein gene product 9.5., a neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase., and its developing change in sertoli cells of mouse testis. *Mol Reprod Dev* 1999; 54(4): 333-41.
39. Shadan Navid, Mehdi Abbasi and Yumi Hoshino. The effects of melatonin on colonization of neonate spermatogonial mouse stem cells in a three-dimensional soft agar culture system. *Curr Stem Cell Res Ther* (2017) 8:233
40. Tan SS, et al. Melatonin protects human adipose-derived stem cells from oxidative stress and cell death. *Archive Plastic Surg.* 2016;43(3):237-41.
41. Maitra SK, Hasan KN. The role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. *Front Endocrinol.* 2016; 7:38.
42. Gholami M, et al. Melatonin improves spermatogonial stem cells transplantation efficiency in azoospermic mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(2):93.
43. Gholami M, et al. Effect of melatonin on the expression of apoptotic genes in vitrified-thawed spermatogonia stem cells type A of 6-day-old mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(8):906-9.
44. Bustos-orbegon, E; Poblete, D; Catriao, R; Fernandes, FH. 2013. Protective role of melatonin in mouse spermatogenesis induced by sodium arsenite. *Int. J. Morphol.*, 31(3):849-856,
45. Bahadorani M, Hosseini SM, Abedi P, Abbasi H, Nasr- Esfahani MH. 2015. Glial cell line-derived neurotrophic factor in combination with insulin-like growth factor 1 and basic fibroblast growth factor promote in vitro culture of goat spermatogonial stem cells. *Growth Factors.*; 33:181-191.
46. Aliakbari F, et al. Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cell Reprogram.* 2016;18(2):87-95.
47. Shahbazi M, Moghaddam AA, Rahimi-Feyli P. Effect of royal jelly from nurse bees on In vitro culture of spermatogonia stem cells from pre-pubertal lambs. *Onl J Vet Res.* 2017; 21(8):484-489.
48. Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *Int J Reprod BioMed* 2007; 5(3): 109-115.
49. Tajik P, Narenji-Sani R, Moezifar M, Yousefi MM, Movahedin M, Qasemi-Panahi B, et al.. Effect of follicle-stimulating hormone and testosterone on colony formation of bovine spermatogonial stem cell. *Comp Clin Path* 2014; 23(4): 901-906.
50. Gholampour Y, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S., Effect of gonadotropin releasing hormone on In Vitro caprine spermatogonial stem cell proliferation. *Onl J Vet Res* 2019; 23 (5): 414-430.
52. Honaramooz, A and Yang, Y. Recent Advances in Application of Male Germ Cell Transplantation in Farm Animals. *Vet Med Inter.* 2011; 2011: 1-9.