مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

بررسی پتانسیل آنتی اکسیدانتی کروسین بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/C

علیرضا شکری M.Sc. [۱]، جواد بهارارا Ph.D. [۲*]، الهه امینی Ph.D. [۳]

۱ – دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
۲– دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، مشهد، ایران
۳– دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharara78@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۲

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی اثر کروسین به‌عنوان یکی از مواد فعال زیستی زعفران برروی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش است.

مواد و روش‌ها: دراین مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد نژاد Balb/C در محیط‌کشت DMEM/F12 کشت داده شده با غلظت‌های کروسین (۴۰، ۲۰، ۱۰،۵، ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به‌مدت ۶ و ۱۲ روز تیمار شدند برای شناسایی سلول‌های بنیادی از آزمون آلکالین فسفاتاز، بررسی سمیت از تست MTT، تشخیص سلول‌های زنده از آزمون اکریدین اورنج، DAPI و پتانسیل آنتی اکسیدانت از آزمون DCF-DA استفاده شد. آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS، آزمون ANOVA تست دانکن صورت گرفته و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: کروسین در غلظت‌های زیر ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت چشم‌گیری بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز اعمال نکرد. این درحالی است که زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت تاثیر دوزهای۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین در روز ۶ پس از کشت به‌میزان ۲۱ و ۲۴ درصد و در روز ۱۲ به‌میزان ۲۹ و ۴۱ درصد کاهش یافت. هچنین بررسی زنده بودن سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس و بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی توسط فلوریمتری اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانتی کروسین را در غلظت‌های (۵، ۱۰، ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کروسین بعد از ۶ روز نشان داد.

نتیجه گیری: کروسین می‌تواند اثر حفاظتی برروی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی داشته باشد که از طریق حداقل تاثیر بر زیستایی سلول‌ها و کاهش مرگ و میر سلولی اثر خود را ایفا می‌کند.

واژگان کلیدی: کروسین، آنتی اکسیدانت، آپوپتوزیس، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ناباروری یکی از مشکلات مهم در مردان و زنان به‌شمار می‌رود، به گونه‌ای که شواهد بالینی و اپیدمیولوژیک افزایش ناباروری در مردان را تائید نموده‌اند (۱). عوامل متعددی همچون میدان‌های مغناطیسی، پرتوهای یونیزان و استعمال دخانیات و برخی داروها منجر به افزایش ناباروری در مردان می‌شوند. از طرفی با توجه به موثر بودن برخی داروهای گیاهی در افزایش میزان باروری مردان، تحقیقات گسترده‌ای برای کشف مواد فعال زیستی که بتوانند بر مشکل ناباروری مردان غلبه کنند، صورت گرفته است (۲ و ۳). از جنبه دیگر، در بیمارانی که مبتلا به سرطان هستند و تحت روش‌های درمانی شیمی درمانی و پرتو درمانی قرار می گیرند، اسپرم آسیب دیده افزایش یافته که منجر به ناباروری می‌شود، از این‌رو دانشمندان در تلاشند که با غنی سازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز راه حلی برای رفع این مشکل پیدا کنند (۴).

لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه دارای پتانسیل خود بازسازی و تولید سلول‌های زایای اسپرم هستند، بنابراین این سلول‌ها می‌توانند نقش مهمی در درمان ناباروری داشته باشند (۲). جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌تواند نقش مهمی در درمان ناباروری بیماران مبتلا به سرطان بوده و تحت درمان با روش‌های شیمی درمانی و پرتو درمانی هستند ایفا کند (۵). از این‌رو دانشمندان برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی و تمایز نیافته بسیار تلاش کرده و برای شناسایی آن‌ها از مارکرهای خاصی استفاده کرده‌اند (۶).

حدود هشت درصد از جمعیت کشور ایران دچار مشکل ناباروری بوده و حدود نیمی از مشکلات ناباروری به‌علت نقص در فاکتورهای مردانه می‌باشد (۷ و ۸). در پیشرفت‌های اخیر طب باروری، مطالعات نشان می‌دهند تولید بالای ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) فاکتور مهمی است که باعث اختلال در عملکرد اسپرم شده و یکی از معضلات ناباروری در مردان به‌حساب می‌آید. در مردان نابارور مقدار زیادی از فاکتور ROS در مایع منی وجود دارد که ممکن است یکی از دلایل ناباروری آن‌ها به‌حساب آید (۹ و ۱۰).

اسپرم در شرایط فیزیولوژیک تولید کننده ROS بوده که نقش مهمی در عملکرد اسپرم در طی ظرفیت یابی اسپرم، واکنش آکروزومی و الحاق اووسیت ایفا می‌کند. در طی شرایط استرس، میزان تولید این رادیکال‌ها در مایع منی افزایش یافته که عدم تعادل در تولید این رادیکال‌ها و سیستم آنتی اکسیدانتی موجب فسفریلاسیون کمتر از حد معمول آکسونم، پراکسیداسون لیپید، از دست دادن تحرک و بقا و نهایتا بروز آسیب به سیستم تولیدمثلی می‌شود (۱۱).

سطوح پایین ROS برای برخی عملکردهای سلولی و فعال شدن برخی از مسیرهای سیگنالینگ سلولی ضروری است، اما سطوح بالای این رادیکال‌ها می‌تواند آسیب‌های جدی در عملکرد سلول ایجاد نموده و اثرات مخربی بر تکوین اولیه جنین القا کند. بنابراین به‌کارگیری ترکیبات ضد اکسیداتیو (آنتی اکسیدانت) که از فعالیت مخرب رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند، ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۲ و ۱۳). از این‌رو مطالعات بر روی عوامل آنتی اکسیدانتی جدید به‌منظور جلوگیری از آسیب‌های سوخت و ساز سلول اسپرم ممکن است باعث افزایش تحرک و مورفولوژی طبیعی و افزایش ظرفیت لقاح یابی شود (۹).

زعفران یک گیاه چند ساله از خانواده زنبقیان و دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانتی می‌باشد (۱۳ و ۱۴) که به‌طور گسترده در کشورهای هند، یونان، ایران، اسپانیا، فرانسه و غیره کشت شده و به‌عنوان ضد اسپاسم، سهل الهضم، ضد درد، ضد نفخ و محرک معدی و داروی غرایز جنسی در طب سنتی و به‌عنوان یک ادویه غذایی استفاده می‌شود (۱۵ و ۱۶). تحقیقات نشان داده اند که زعفران در درمان ناباروری و ناتوانی جنسی نقش موثری دارد (۱۷ و ۱۸). با توجه به کاربرد زعفران به‌عنوان یک طعم دهنده غذایی، اهمیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک در درمان ناباروری، آسیب پذیری بالای این سلول‌ها در برابر ترکیبات مختلف و لزوم شناسایی ترکیبات طبیعی دارای اثر حفاظتی و آنتی اکسیدانتی که کمترین سمیت را بر سلول‌های اسپرماتوژنیک وارد کنند (۸). در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی، سمیت کروسین به‌عنوان یکی از مواد فعال زیستی موجود در زعفران بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز: برای این منظور، دو مرحله هضم آنزیمی صورت گرفت. به این‌صورت که موش نر۱۰ روزه بی‌هوش شده، بافت بیضه

Archive of SID
www.SID.ir

موش جدا شده و داخل محلول PBS حاوی آنتی بیوتیک شستشو داده شد. سپس به بافت تکه تکه شده، ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر کلاژناز اضافه شده و ۱۵ دقیقه داخل انکوباتور CO_2 قرار داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه بیوپسی بافت بیضه از داخل انکوباتور خارج شده، به آن تریپسین اضافه شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی سانتریفوژ شد، ۱۰۰ میکرو لیتر محیط ۱۰ درصد DMEM-F12 اضافه شد و درون پلیت کوت شده با ژلاتین ۰/۲ درصد کشت داده شد. پس از یک شبانه روز محیط رویی سلول‌ها خارج شده و به سلول‌ها محیط حاوی فاکتور رشد فیبروبلاستی به‌میزان ۲۰ نانوگرم بر میلی لیتر و سرم ده درصد افزوده شد (۴).

ارزیابی فعالیت آلکالین فسفاتاز: برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، ۴ روز بعد از جداسازی و کشت، سلول‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض فرمالین ۱۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، پس از آن توسط محلول تریس (pH=۸/۹) دو بار شستشو شدند و به آن سوبسترای نفتل فسفات ۰/۰۱ و نمک ویوله ۰/۰۶ درصد اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۲ بار با آب شستشو داده شد و در زیر میکروسکوپ معکوس توده‌های سلولی بنیادی اسپرم‌ساز مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

گروه بندی آزمایش‌ها: پس از جداسازی و تایید استخراج سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، جهت بررسی اثر کروسین بر روی این سلول‌ها، سلول‌ها در گروه‌های کنترل (فاقد تیمار) و گروه‌های تیماری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کروسین (۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) تقسیم بندی می‌شوند.

بررسی سمیت کروسین توسط آزمون MTT : جهت بررسی سمیت کروسین بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، این سلول‌ها در محیط کشت DMEM-F12 (شرکت ایده زیست، ایران) حاوی۱۰ در صد FBS و ۱ درصد پنی سیلین استرپتومایسین (شرکت Gibco، آمریکا) درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سمیت سلولی کروسین با استفاده از روش MTT(شرکت Applichem، آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت‌های مختلف کروسین (۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۶ و ۱۲ روز تیمار شدند. پس از این مدت سلول‌ها به‌مدت ۴ ساعت در معرض رنگ MTT (۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفته و DMSO جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان به سلول‌ها اضافه شد و جذب در ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (شرکت Epoch، آمریکا) خوانده شد (۱۲).

آزمون اکریدین اورنج/ پروپودیوم ایداید و DAPI: رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپیدیوم ایداید برای تشخیص سلول‌های زنده و مرده به‌کار می‌رود به‌طوری‌که سلول‌های زنده به رنگ سبز، سلول‌های آپوپتوزی و نکروزه به‌ترتیب به رنگ زرد، نارنجی و قرمز قابل تشخیص هستند (۲۱). برای این منظور، ۶ روز پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف کروسین، به سلول‌های گروه کنترل و تیمار ۱۰ میکرولیتر اکریدین اورنج و۱۰ میکرولیتر پروپودیوم ایداید اضافه شده و زیستایی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی DAPI نیز که به‌منظور بررسی مورفولوژی هسته به‌کار می‌رود، ۶ روز پس از تیمار، بر روی سلول‌های گروه کنترل و تیمار متانول جهت تثبیت افزوده شده و سپس در معرض رنگ با دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرارگرفته و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرارگرفتند.

تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانتی کروسین بر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز: تعداد ۵۰۰۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت و بعد از گذشت ۲۴ ساعت توسط غلظت‌های مختلف کروسین تیمار شدند. بعد از ۶ روز محیط رویی سلول‌ها برداشته شده و سلول‌ها در معرض ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس به سلول‌های کف پلیت DCFH-DA ۵ میکرو مولار اضافه شد، دور پلیت فویل آلومینیومی پیچیده شده و شدت فلورسنس DCF توسط فلوریمتر مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

آنالیز آماری

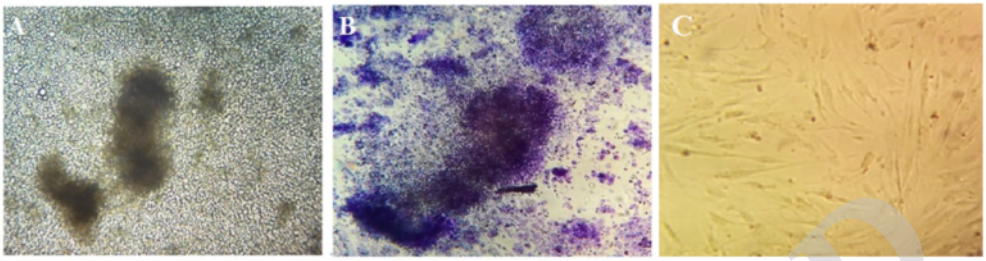
آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS، آزمون یک‌طرفه ANOVAتست دانکن به‌منظور مقایسه داده‌ها صورت گرفته و در مقایسه گروه‌های تیماری با گروه کنترل سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج

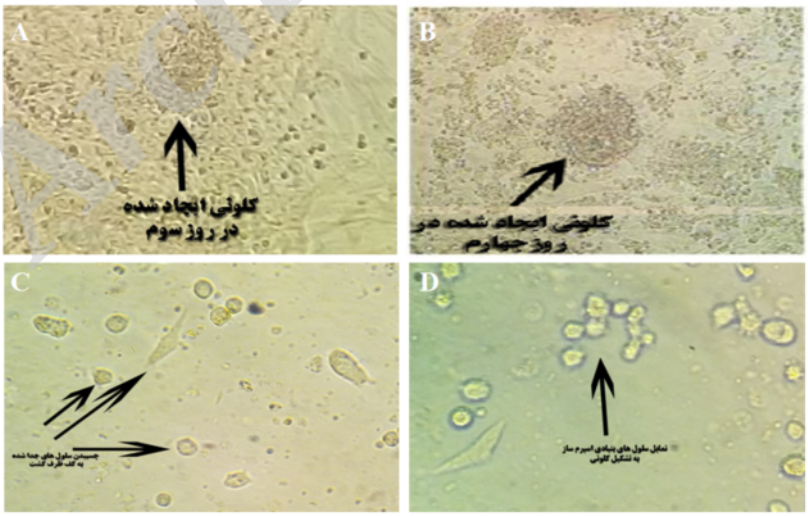
جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز:

نتایج آزمون فعالیت آلکالین فسفاتازی نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک پس از گذشت ۴ روز کلونی‌هایی را ایجاد نمودند که به رنگ آبی مایل به بنفش از سایر سلول‌ها قابل تشخیص بودند. ظهور رنگ آبی در کلونی‌های سلولی کف پلیت نشان دهنده فعالیت بالای آلکالین فسفاتازی توده‌های سلولی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز است که از بارزترین مارکرهای سلول بنیادی به‌شمار می‌روند. این در حالی است که سلول‌های سرتولی به‌عنوان کنترل منفی جذب رنگ را نشان ندادند (شکل ۱).



شکل۱: *A*: مورفولوژی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش نر ۱۰ روزه ۴ روز پس از کشت که به‌صورت کلونی‌هایی قابل مشاهده است (بدون رنگ‌آمیزی). *B*: ظهور رنگ آبی ۴ روز پس از کشت که بیانگر فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی است (پس از رنگ‌آمیزی) بزرگنمایی ۱۰۰×. *C*: سلول‌های دوکی شکل سرتولی که به‌عنوان کنترل منفی استفاده شده و رنگ آلکالین فسفاتاز را جذب نکردند. مشاهده زیر میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی ×۴۰۰.

بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در طی دو هفته از کشت این سلول‌ها در محیط DMEM-F12 نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ۳ روز پس از کشت، به‌صورت توده‌هایی اتصال یافته به لایه سلولی زیری (احتمالا سلول‌های سرتولی دوکی شکل)، قابل مشاهده هستند. ۴ روز پس از کشت این سلول‌ها قبل از انجام آزمون آلکالین فسفاتاز موروفولوژی این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت و کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک به‌وضوح مشاهده شد. پس از پاساژ سلولی و کندن سلول‌ها از کف پلیت، تک لایه فیبروبلاستی در کف ظرف مشاهده نشد و در این‌حالت سلول‌های به‌صورت مثلثی کشیده به کف پلیت چسبیده بودند، در حالی‌که سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک با مورفولوژی دایره‌ای شکل مشاهده شدند. همچنین پس از پاساژ تمایل سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به ایجاد کلونی به‌خوبی قابل مشاهده بود (شکل ۲).

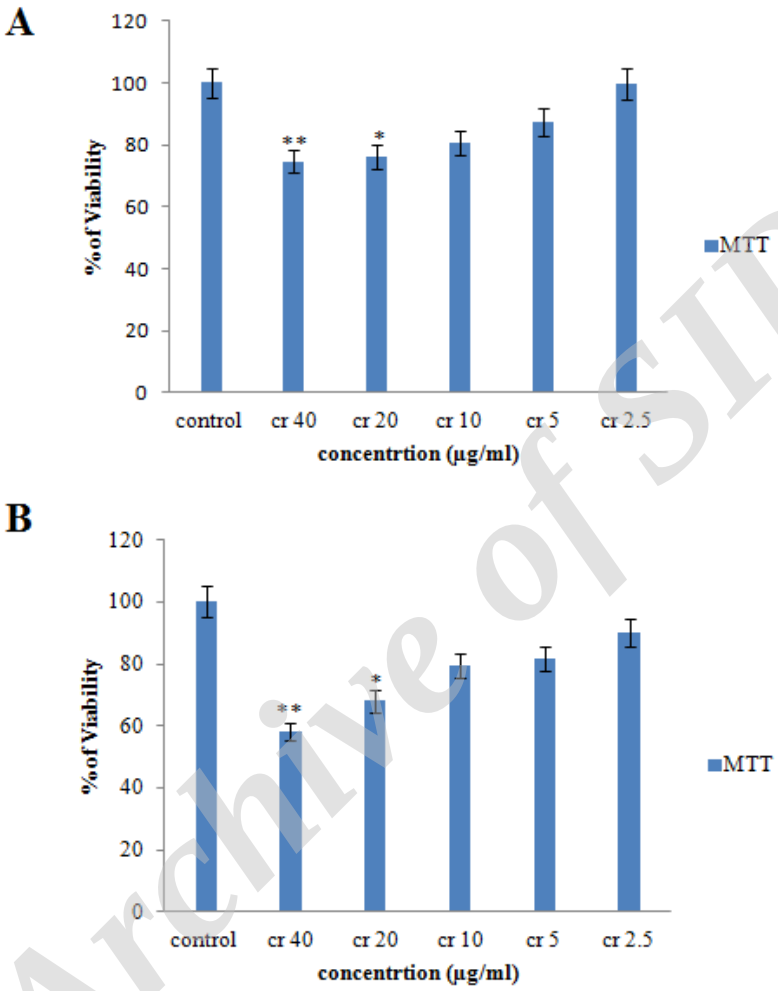


شکل۲: *A*) سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ۳ روز پس از کشت، به‌صورت توده‌هایی اتصال یافته به لایه سلولی زیری (احتمالا سلول‌های سرتولی دوکی شکل)، قابل مشاهده است. بزرگنمایی ۲۰۰×، *B*) کلونی سلول‌های بنیادی اسرماتوژنیک ۴ روز پس از کشت که توده‌ها را به‌وضوح نشان می‌دهد بزرگنمایی ۱۰۰×، *C*) سلول‌های سرتولی پس از اولین پاساژ به‌صورت مثلثی شکل به کف پلیت چسبیده در حالی‌که سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک با مورفولوژی دایره ای شکل مشاهده می‌شوند. بزرگنمایی ۴۰۰×، *D*) تمایل سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به ایجاد کلونی پس از پاساژ اول به‌خوبی قابل مشاهده است. مشاهده زیر میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی ×۴۰۰.

Archive of SID
www.SID.ir

آزمون سمیت سلولی

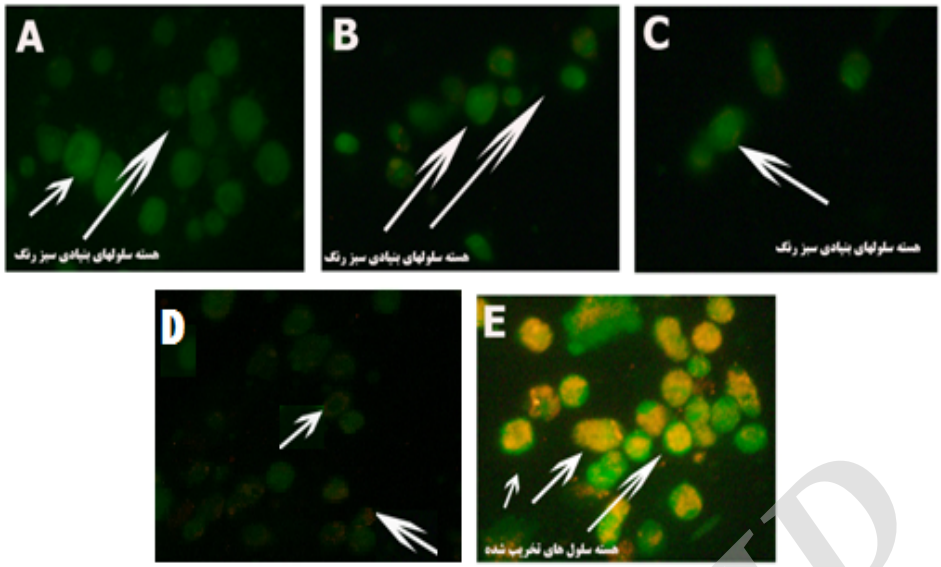
یافته‌های آزمون MTT نشان داد که کروسین در غلظت های زیر ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روزهای ۶ و ۱۲ پس از کشت سمیت چشم‌گیری بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نسبت به گروه کنترل (فاقد تیمار) اعمال نکرد. این در حالی است که زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت تاثیر دوزهای ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر کروسین در روز ۶ پس از کشت به‌میزان ۲۱ و ۲۴ درصد و در روز ۱۲ به میزان ۲۹ و ۴۱ درصد در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر کروسین بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز پس از ۶ روز (A) تیمار و ۱۲ روز تیمار (B) توسط MTT. نتایج نشان داد که دوز های کمتر از ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر کروسین تاثیری بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ندارد. نتایج نشان دهنده این مطلب است که کروسین در غلظت‌های زیر ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ظرف ۶ و ۱۲ روز پس از تیمار موجب بقای ۸۰ درصد به بالای سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شود. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.($p< ۰/۰۵$ * $p< ۰/۰۱$ **)(نمودارA شش روز پس از تیمار، نمودارB دوازده روز پس از تیمار) (**p<۰/۰۱،*p< ۰/۰۵).

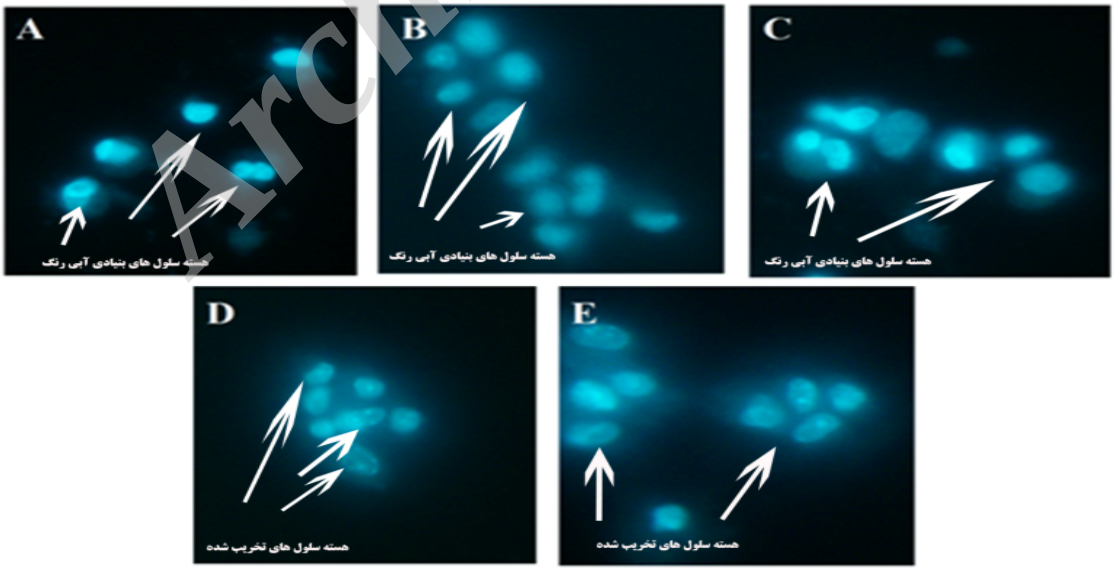
رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / پروپودیوم ایداید و DAPI: نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی افتراقی اکریدین اورنج / پروپیدیوم ایداید نشان داد که در غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵ کروسین، اغلب سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی به رنگ سبز در آمدند که نشان دهنده زنده بودن سلول‌ها و موید عدم سمیت غلظت‌های زیر ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر کروسین بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک موشی است، این در حالی است که کروسین در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نفوذ کرده و موجب کاهش زیستایی این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شده است (شکل ۳).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳: رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپیدیوم ایداید نشان دهنده عدم نفوذ رنگ پروپودیوم ایداید به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی ۶ روز پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کروسین (۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و زیستایی سلول‌ها است درحالی‌که در غلظت ۴۰ کروسین زیستایی سلول‌ها کاهش یافته است .*A-E* به‌ترتیب نشان دهنده کنترل، غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر، غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین. مشاهده زیر میکروسکوپ فلورسانس Olympus، بزرگنمایی ×۴۰۰.

رنگ‌آمیزی DAPI نیز نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت تاثیر غلظت‌های پایین کروسین (۱۰، ۵، ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) مورفولوژی هسته طبیعی داشتند که بیانگر اثر حفاظتی کروسین در غلظت‌های زیر حد کشنده بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی است (شکل ۴).

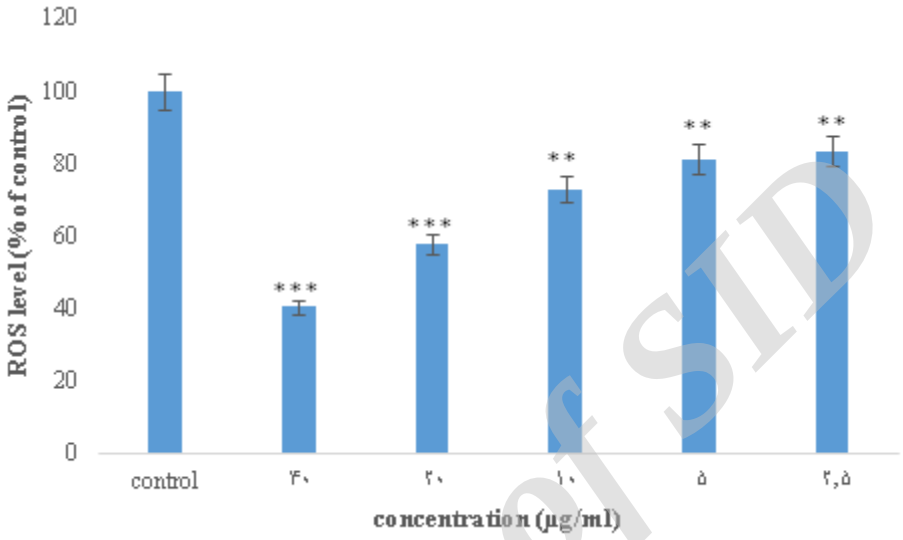


شکل۴: رنگ‌آمیزی DAPI نشان دهنده عدم تغییر در هسته سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی ۶ روز پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کروسین (۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و زیستایی سلول‌ها است در حالی‌که در غلظت ۴۰ کروسین مورفولوژی هسته تغییر یافته است. A-E به‌ترتیب کنترل، غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین. مشاهده زیر میکروسکوپ فلورسانس Olympus، بزرگنمایی ×۴۰۰.

Archive of SID
www.SID.ir

پتانسیل آنتی اکسیدانتی کروسین بر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

کاهش شدت فلورسنت DCF نشان داد که غلظت‌های افزاینده کروسین از طریق کاهش ROS داخل سلولی در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌صورت وابسته به دوز دارای پتانسیل آنتی اکسیدانتی است، در این رابطه تمامی غلظت‌های مورد آزمایش کروسین دارای ظرفیت کاهش رادیکال‌های آزاد هستند، به این‌صورت که غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با $p<۰/۰۱$ ** و ۲۰ تا ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز با $p<۰/۰۰۱$ *** معنی‌دار است (نمودار ۲).



نمودار ۲: فعالیت ROS درون سلولی القا شده توسط آب اکسیژنه پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کروسین نشان دهنده پتانسیل آنتی اکسیدانتی این ترکیب است. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.
($^{***}p< ۰/۰۰۱$، $^{**}p< ۰/۰۱$، $^{*}p<۰/۰۵$)

بحث

تحقیقات قبلی نشان داده اند که زعفران و ترکیبات فعال آن دارای پتانسیل تمایزی روی سلول‌های بنیادی هستند. در یکی از پژوهش‌های قبلی یافته‌های ما نشان داد که عصاره آبی زعفران قادر به القای پتانسیل تمایزی اوستئوژنیک روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش است (۲۳). هم‌چنین گزارشات نشان داده است که کروسین به‌عنوان یکی از ترکیبات فعال زعفران قادر است سلول‌های بنیادی عصبی را به سمت اولیگودندروسیت‌ها تمایز دهد (۲۴). در مورد سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تا قبل از سال ۲۰۰۹ کشت این سلول‌ها، چه در محیط آزمایشگاه و چه در محیط‌های دیگر در ایران گزارش نشده بود، تا زمانی‌که صدری و همکارانش (۲۵) توانستند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در محیط آزمایشگاه در شرایط *in vitro* کشت و تکثیر دهند. تحقیقات اثبات کرده اند که عدم باروری مردان با آسیب به تکثیر سلول‌های زاینده مرتبط است، از طرفی نشان داده شده که ترکیبات فعال زیستی همانند عصاره گرده خرما می توانند دارای اثر حفاظتی بر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز باشد (۲۶).

در این مطالعه به‌دلیل اینکه سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک در غشای پایه لوله‌های منی ساز قرار دارند و میزان این سلول‌ها در نوزادان موش بیشتر از موش بالغ است بر اساس پروتوکل گوهر بخش و همکاران (۴) از موش‌های نر نوزاد ۱۰ روزه استفاده می‌شود. جهت بررسی اثر کروسین بر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، اثر غلظت‌های مختلف کروسین به‌عنوان یکی از مواد بیولوژیک زعفران بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز مورد بررسی قرارگرفت. روش MTT برای تعیین سمیت سلولی عوامل دارویی و شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف کروسین ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم برمیلی لیتر در ظرف ۶ روز و ۱۲ روز سمیت چشم‌گیری بر روی سلول‌های بنیادی

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرم‌ساز نداشت.

کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌دلایل مختلف بسیار دشوار می‌باشد. یکی از دلایل این است که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در هفته اول دچار آپوپتوزیس می‌شوند و به‌شدت تعداد آن‌ها کاهش می‌یابد. به این‌صورت که پس از یک هفته کشت، سیگنال‌های متفاوتی در درون سلول‌ها فعال شده و اکسیژن به‌عنوان فعال کننده این سیگنال‌های درون سلولی موجب ایجاد استرس اکسیداتیو و از بین بردن سلول‌ها می‌شود. در رابطه با مکانیسم از بین رفتن سلول‌ها، مرگ سلولی آپوپتوزیس از طریق خنثی کردن عمل آنتی اکسیدانت‌ها سلول‌های آسیب دیده را حذف می‌کند، البته بعضی از سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌دلایل دیگر مثل در معرض قرار گرفتن در برابر عوامل خارجی همانند نور و گرما حساسیت بیشتری به اکسیژن فعال دارند و بیشتر در معرض آپوپتوزیس هستند (۲۹-۲۷). از این‌رو در این پژوهش از دو بازه زمانی ۶ روز و ۱۲ روز به منظور بررسی زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کروسین استفاده شد. از طرفی رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج / پروپیدیوم ایداید و DAPI نشان داد که تحت تیمار با غلظت‌های ۲/۵ تا ۱۰ کروسین سلول‌ها به رنگ سبز و دارای تمامیت هسته بودند که بیان‌گر این مطلب است که کروسین در این غلظت‌ها سمیت خاصی بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نداشته و پس از ۱۲ روز حداقل ۸۰ درصد سلول‌ها تحت تاثیر غلظت‌های پایین کروسین زنده بودند. در مورد بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک، پژوهش‌گران همچنان در حال بررسی ترکیبات مکمل در محیط کشت جهت افزایش زیستایی این سلول‌ها هستند. به‌نحوی که مشخص شده است افزودن فاکتورهای رشد همانند bFGF, GDNF به محیط کشت این سلول‌ها می‌تواند در افزایش زیستایی این سلول‌ها نقش به‌سزایی داشته باشد. بنابراین با غنی کردن محیط کشت با فاکتورهای رشد ممکن است بتوان سمیت پایین کروسین را برطرف نمود (۴).

در زمینه ناباروری در تحقیقات اخیر از آنتی اکسیدانت‌های مختلف برای بهبود زیستایی اسپرم و عملکرد آن استفاده شده است. مطالعات نشان داده اند زمانی‌که در شرایط آزمایشگاهی محیط کشت اسپرم حاوی ترکیباتی همچون بتا مرکاپتو اتانول، سیستئین، سیستئامین و آنتوسیانین باشد، ناهنجاری کمتری در آن‌ها مشاهده می‌شود. این امر موجب شده است که گرایش زیادی به استفاده از آنتی اکسیدانت‌های طبیعی موجود در گیاهان دارویی و غذایی به‌وجود آید که می‌تواند در جلوگیری از آسیب‌های جانبی آنتی اکسیدانت‌های مصنوعی مفید واقع شود (۱۷).

در رابطه با ارتباط زعفران و کاهش ناباروری مردان، حیدری و همکارانش (۱۹) با بررسی ۵۲ بیمار غیر سیگاری که کمبود اسپرم در مایع منی آن‌ها مشاهده شده بود پس از طی دوره درمان با زعفران در یک دوره سه ماهه نشان دادند که زعفران باعث افزایش اسپرم در مایع منی بیماران می‌شود. مطالعات نشان داده است که ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در زعفران همچون ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال در فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره زعفران نقش دارند و در شرایط *in vivo* و *in vitro* خاصیت آنتی اکسیدانتی نشان می‌دهند (۳۰). در مقایسه اثر آنتی اکسیدانتی عصاره زعفران و ترکیبات فعال آن مطالعات نشان داده است که عصاره متانولی زعفران دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی بالایی است و نسبت فعالیت آنتی اکسیدانتی کروسین در هضم رادیکال آزاد DPPH ۵۰ درصد و سافرانال ۳۴ درصد عصاره زعفران با غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر است (۳۱). در این پژوهش نیز با توجه به پتانسیل آنتی اکسیدانتی زعفران و مواد فعال موجود در آن، با توجه به این که گزارش شده است کروسین از طریق سرکوب رادیکال‌های آزاد موجب افزایش کیفیت اسپرم در حیوانات تحت تیمار با سیکلوفسفامید می‌شود (۳۲)، اثر کروسین بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. در رابطه با ظرفیت آنتی اکسیدانتی کروسین، نتایج این پژوهش نشان داد که کروسین در تمامی غلظت ها پتانسیل بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد دارد، اما تنها در غلظت‌های زیر ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر است که کاهش مرگ و میر سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک مشاهده می‌شود. بنابراین کاهش میزان رادیکال آزاد تحت تاثیر غلظت های مختلف کروسین نشان می‌دهد که پتانسیل آنتی اکسیدانتی در غلظت‌های پایین همراه با کاهش مرگ و میر و افزایش زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ممکن بتواند به‌عنوان یک

Archive of SID
www.SID.ir

عامل حفاظتی در تحقیقات بعدی بر روی نقش این ترکیبات در پیشگیری از آسیب عوامل مخرب بر بافت بیضه مد نظر قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که کروسین می‌تواند در غلظت‌هایی پایین اثر حفاظتی بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی داشته باشد. اما در غلظت‌های بالاتر (۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از طریق کاهش زیستایی سلول‌ها و افزایش مرگ و میر سلول‌ها موجب القای آسیب به سلول‌های زایای دودمان اسپرماتوژنیک می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های غیر سمی کروسین (زیر ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ممکن است بتواند مکمل مناسبی برای حفظ بقای سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی در مقابله با عوامل آسیب رسان باشد که می‌تواند در تحقیقات باروری حائز اهمیت باشد. البته برای اثبات این فرضیه، نیاز به پژوهش‌های بیشتر و درک جزئیات مکانیسم این اثر بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک در حضور عوامل آسیب رسان است.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی پژوهشکده خوارزمی که در اجرای این پژوهش همکاری داشتند صمیمانه سپاسگزاریم.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Oyeyipo IP, Raji Y, Bolarinwa AF. Antioxidant profile changes in reproductive tissues of rats treated with nicotine. J Hum Reprod Sci. 2014; 7(1): 41–46.
2. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. Biol Reprod. 2005; 72(4): 985–991.
3. Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. Cell Stem Cell. 2012;11(5): 715-726.
4. Goharbakhsh L, Mohazzab A, Salehkhou S, Heidari M, et al. Isolation and Culture of Human Spermatogonial Stem Cells Derived from Testis Biopsy. Avicenna Journal of Medical Biotechnology. 2013; 5(1): 54-61.
5. Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. Spermatogenesis. 2011; 1(2): 116–120.
6. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res C Embryo Today 2009; 87(1):27-43
7. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. Nature. 2007;449(7160): 346-350
8. Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, Jiang J, et al. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. Stem Cells Dev. 2009;18(8): 1115-1126.
9. Safarnavadeh T, Rastegarpanah M. Antioxidants and infertility treatment, the role of Satureja Khuzestanica: A mini-systematic review. Iran J Reprod Med. 2011; 9(2): 61–70.
10. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. BJU Int. 2005; 95: 503-507.
11. Eid Hammadeh M, Filippos A, Faiz Hamad M. Reactive Oxygen Species and Antioxidant in Seminal Plasma and Their Impact on Male Fertility. IJFS 2009; 3(3): 87-110.
12. Amini E, Nabiuni M, Baharara J, Parivar K, et al. Metastatic Inhibitory and Radical Scavenging Efficacies of Saponins Extracted from the Brittle Star (Ophiocoma erinaceus). Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(11): 4751-8.
13. Naskar S. In vitro and in vivo antioxidant potential of hydromethanolic extract of Phoenix dactylifera fruits. J Sci Res. 2010; 2: 144–157.
14. Gohari AR, Saeidnia S, Kourepaz Mahmoodabadi M. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. Pharmacogn Rev. 2013; 7(13): 61–66.
15. Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M, et al. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. J Med Food. 2013; 16(3): 206-210.
16. Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. J Agric Food Chem. 2007; 55(3): 970-977.
17. Srivastava R, Ahmed H, Dharamveer RK, Saraf SA. Crocus sativus L.: A comprehensive review. Pharmacogn Rev. 2010; 4(8): 200–208.
18. Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (Crocus sativus L.) and its ingredients. Pharmacognosy Res. 2014; 6(2): 99–107.
19. Heidary M, Reza Nejadi R ,Delfan B, Birjandi M, et al. Effect of Saffron on Semen Parameters of Infertile Men. Urol J. 2008; 5(4): 255-259.
20. Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1- dependent pathway. FASEB J. 2009; 23(7): 2076-2087.
21. Namvar F, Sulaiman HS, Mohamad R, Baharara J, et al. Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized via seaweed aqueous extract. International Journal of Nanomedicine. 2014; 9(1): 2479-2488.
22. Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Asghari M, Sadeghnia HR. Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. Cell Mol Neurobiol. 2010; 30(4): 591-598.
23. Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. The effect of saffron aqueous extract(Crocus sativus L) on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Journal of Birjand University of Medical

Archive of SID
www.SID.ir

Sciences. 2014; 21 (2): 169-178.
24. Sachamitr P, Hackett S, Fairchild PJ. Induced pluripotent stem cells: challenges and opportunities for cancer immunotherapy. Front Immunol, . 2014, 5:176,1-9.
25. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA. 2009; 302(19): 2127-2134.
26. Mahaldashtian M, Makoolati Z, Ghorbanian MT, Naghdi M, et al. In vitro cytotoxicity effects of date palm (Phoenix dactylifera L.) pollen on neonate mouse spermatogonial stem cells. Nat Prod Res. 2015; 29(6): 578-81
27. Naskar S. In vitro and in vivo antioxidant potential of hydromethanolic extract of Phoenix dactylifera fruits. J Sci Res. 2010; 2(1): 144–157.
28. Gholami M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, et al. Melatonin improves spermatogonial stem cells transplantation efficiency in azoospermic mice. Iran J Basic Med Sci. 2014; 17(2): 93–99.
29. Izadyar F, Wong J, Maki C, Pacchiarotti J, et al. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. Hum Reprod. 2011; 26(6): 1296-1306.
30. Rahaiee S, Moini S, Hashemi M, Shojaosadati SA. Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (Crocus sativus L.): a review. J Food Sci Technol 2015; 52(4): 1881–1888.
31. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents. Phytotherapy Research 2005; 19(11): 997-1000.
32. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effects of saffron (Crocus sativus Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. Phytother Res. 2003; 17(6): 614-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2017; 7(3):

Original Article

Evaluation of the antioxidant effect of crocin on neonate Balb/C mouse spermatogonial stem cells

Shokri A. M.Sc[1], Baharara J. Ph.D.[2]*, Amini E. Ph.D.[3]

1. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Professor of Research Center For Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad,Iran
3. Department of Cellular and Molecular, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: baharara78@gmail.com

Received: 30 Feb. 2016 Accepted: 12 Jul. 2016

Abstract

Aim: The aim of this study is evaluating the effect of crocin as one of saffron bioactive compounds in mice spermatogenic stem cells.

Material and Methods: Balb/c neonate spermatogenic stem cells were grown in DMEM-F12 medium and were treated with various concentrations of crocin (2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml) for 6 and 12 days. For detecting spermatogenic stem cells, assessment cytotoxicity, recognizing viable cells and antioxidant capacity have been used alkaline phosphatase assay, MTT assay, AO, DAPI staining, and DCF-DA assay, respectively. Statistical analyses, One-way ANOVA, Duncan test($P \leq 0.05$), were conducted using SPSS software .

Results: Crocin in concentrations >20 µg/ml exerted no significant toxicity on mice spermatogenic stem cells in 6 and 12 days treatment. Meanwhile, viability of mice spermatogenic stem cells was reduced under exposure to 20, 40 µg/ml to 21, 24 % in 6 days and 29, 41% in 12 days treatment. Further, evaluations of cell viability by fluorescence microscopy and antioxidant potential by fluorimetery have showed protective and antioxidant effect of crocin after 12 day treatment.

Conclusion: Crocin can be induced protective effect on mice spermatogenic stem cells, which conducted their effect through minimal effects on cell viability and reducing cell death.

Keyword: Crocin, antioxidant, Apoptosis, Spermatogenic stem cells

Archive of SID

www.SID.ir