DOI:10.22092/vj.2022.358576.1970
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر IGF-I بر قابلیت کلونی‌زایی، زنده‌مانی 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.
• **نیلوفر خرمی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
• **پرویز تاجیک**
گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۲-۱۸ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱-۰۲-۲۴
Email: Niloo.kh.71@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر IGF-I بر تعداد کلونی‌ها، مساحت کلونی‌ها، میزان زنده‌مانی و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند بوده است. 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. گروه شاهد IGF-I دریافت نکرد و چهار گروه بعدی به ترتیب چهار غلظت ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I را دریافت نمودند. سلول‌ها به مدت دو هفته کشت داده شدند و میزان کلونیزاسیون از نظر تعداد و مساحت در روزهای پنجم و چهاردهم کشت ارزیابی شد. پس از پایان دوره کشت میزان بروز آپوپتوزیس و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس (*BAX* و *BCL2*) نیز ارزیابی شد. نتایج نشان داد که استفاده از تیمارهای ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I موجب بهبود میزان کلونی‌زایی از نظر تعداد و مساحت در روزهای پنجم و چهاردهم کشت نسبت به سایر گروه‌ها شد (P≤۰/۰۵). بیشترین میزان زنده‌مانی و کمترین سطح آپوپتوزیس در گروه‌های دریافت کننده ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I مشاهده شد (P≤۰/۰۵). بیشترین بیان ژن *BCL2* و کمترین بیان ژن *BAX* نیز در گروه‌های دریافت کننده ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I مشاهده شد (P≤۰/۰۵). بنابراین استفاده از دوز مناسب IGF-I در محیط کشت می‌تواند روشی موثر در راستای بهبود کیفیت و زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند طی مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی باشد.

کلمات کلیدی: اسپرماتوگونی، آپوپتوزیس، کلونی‌زایی، گوسفند، IGF-I

Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 21-27

Effect of IGF-I on the colonizing ability, viability 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. Khorrami, N., (Corresponding Author) Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Tajik, P., Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received:2022-05-08 **Accepted: 2022-05-14**

Email: Niloo.kh.71@gmail.com

This study was conducted to evaluate the effect of IGF-I on the number and area of colonies, viability 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 control group did not receive IGF-I and the other groups received 0.1, 1, 5 and 10 µg/ml IGF-I, respectively. The cells were cultured for 2 weeks and the colonizing abilities were evaluated on the 5th and 14th days of culture. At the end of culturing period, apoptosis status and apoptosis related genes expression (*BAX* and *BCL2*) were evaluated. The results showed using 5 and 10 µg/ml IGF-I improved colonizing abilities on the 5th and 14th days compared to the other groups ($P \leq 0.05$). The highest viability and lowest apoptosis status was observed in groups received 5 and 10 µg/ml IGF-I ($P \leq 0.05$). The highest *BCL2* expression and lowest *BAX* expression was observed in groups received 5 and 10 µg/ml IGF-I ($P \leq 0.05$). Therefore, using suitable dose of IGF-I in culture medium could be an effective method to improve the quality and viability of sheep's SSCs during studying on stem cells.

Key words: Spermatogonia, Apoptosis, Colonizing, Sheep, IGF-I.

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) سلول‌های منفردی هستند که بر روی غشای پایه بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز بیضه قرارگرفته‌اند (۲۰). دو جمعیت عملکردي SSCs در بیضه وجود دارد: سلول‌هاي بنیادي بالفعل که مسئول خودنوسازي هستند و سلول‌هاي بنیادي بالقوه که در شرایط سخت و خاص، توانایی خودنوسازي را از خود نشان می‌دهند. هنگامی که SSCs تحت شرایط نامطلوب به میزان زیادي از بین می‌روند، سلول‌هاي پیشساز مسئولِ تمایز ممکن است به عنوان سلول‌هاي بنیادي بالقوه عمل کرده و عمل خودنوسازي را از سر گیرند (۲۵). این سلول‌ها اهمیتی ویژه در انجام آزمایش‌های بیولوژیکی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری تولیدمثل و اصلاح ژنتیکی از طریق سلول زاینده جنس نر دارند. لذا حفظ و تکثیر SSCs در محیط کشت امری بسیار ضروری است. برای حفظ اسپرماتوژنز طبیعی، فرآیندهای خودنوسازی و تمایز این سلول‌های بنیادی باید دقیقاً توسط بیان ژن درونی در سلول‌های بنیادی و سیگنال‌های بیرونی، از جمله عوامل محلول یا مولکول‌های چسبنده از ریزمحیط اطراف، تنظیم شود. از مهم‌ترین سیگنال‌های بیرونی که باعث تنظیم اسپرماتوژنز می‌شود، فاکتورهای رشد هستند (۵).

فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها در طی فرایند اسپرماتوژنز، به منظور تنظیم مناسب تکثیر و تمایز SSCs توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شوند. به عنوان مثال فاکتور رشد فیبروبلاست ۲ و فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از سلول‌هاي گلیال بر تکثیر و خودنوزایی SSCs اثر دارد (۲۲). برخی فاکتورهای ضروری دیگر مانند فاکتور سلول بنیادی، پروتئین ریخت‌شناسی استخوان ۴ و اکتیوین A بیشتر در پیشبرد تمایز SSCs نقش دارند (۲۴). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که حضور تعداد محدودی سلول سوماتیك در محیط کشت می‌تواند از طریق ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد به تکثیر SSCs کمک زیادی کند. به عنوان مثال انکوباسیون SSCs موش در حضور سلول‌های تغذیه‌کننده یا فاکتورهای رشد، تکثیر طولانی‌مدت آن‌ها را در شرایط آزمایشگاهی ممکن می‌سازد (۲۱). همچنین گزارش شده است که IGF-I نیز نقش مهمی در بلوغ سلول‌های بیضه در گونه‌های حیوانی دارد (۶) و استفاده از آن یک عامل کلیدی برای تنظیم اسپرماتوژنز در موش صحرایی و موش بالغ است.

IGF-I جزئی از خانواده فاکتورهای رشد انسولینی است که سیگنال‌های ضروری را برای کنترل رشد، متابولیسم و عملکردهای تولیدمثلی ارائه می‌دهند (۲۳). IGF-I عمدتاً در کبد تولید می‌شود، اما تقریباً توسط تمام بافت‌های بدن نیز سنتز می‌شود و نقش مهمی در رشد کلی و اندازه بدن دارد (۱۳). سیستم انسولین/IGF نقشی محوری در تنظیم رشد، تکثیر، تمایز و بقای سلولی ایفا می‌کند و تقریباً بر هر اندام و سیستم بدن تأثیر می‌گذارد، همچنین نقش مهمی در رشد و عملکرد صحیح بیضه دارد

(۱۷). اگرچه فرایندهای تولیدمثلی توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گوناد تنظیم می‌شود، اما فعالیت فاکتورهای غدد جنسی که به صورت موضعی تولید می شوند، عملکرد تولیدمثلی را تعدیل می‌کند. IGF-I و گیرنده آن مسیرهای سیگنالینگ PI3K/Akt را فعال کرده و بیشتر اعمال سلولی مانند تکثیر، تمایز و مهاجرت را القاء می‌کنند.

با توجه به اهمیت تاثیر IGF-I بر فرایندهای تولیدمثلی و به ویژه تاثیر مثبت آن بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی که در مطالعات پیشین به آن‌ها اشاره شده است، هدف از این مطالعه بررسی اثر IGF-I در محیط کشت SSCs بر قابلیت کلونی‌زایی (تعداد و مساحت)، زنده‌مانی، سطح آپوپتوزیس و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری SSCs

در این مطالعه، بیضه از بره نابالغ ۲-۳ ماهه نژاد افشاری از کشتارگاه صنعتی تهیه شده و در داخل فلاسك و در مجاورت یخ قرار داده شد و در عرض کمتر از ۱ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. لازم به ذکر است در این مطالعه کار بر روی حیوان زنده انجام نشده است و نمونه اخذ شده مربوط به بیضه پس از کشتار می‌باشد. در آزمایشگاه بیضه‌ها از اسکروتوم خارج شده و ۵ بار با نرمال سالین شستشو داده شد. سپس حجم بیضه مطابق دستورالعمل استیگر و روبل (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شد و بیضه های دارای حجم ۴۷/۵-۵۱/۳ سانتی‌متر مکعب برای مطالعه انتخاب شدند (۱۹). پس از شستشوی بیضه با تنتور ید و الکل ۷۰٪، لایه‌های تونیکا واژینالیس و تونیکا آلبوژینه با تیغ بیستوری استریل برش داده شد و بافت پارانشیم آن به کمك قیچي استریل به داخل لوله فالکون حاوي محیط DMEM تجاري (۱۰ ميلي‌ليتر)، پني‌سيلين (۱۰۰ واحد در ميلي‌ليتر) و استرپتومايسين (۱۰۰ ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر) انتقال داده شد. براي كاهش احتمال آلودگي، محتويات لوله فالكون به مدت يك دقيقه در دور ۱۵۰۰g سه بار سانتريفيوژ شد. جهت جداسازي و استخراج سلول‌هاي لوله‌هاي منی‌ساز از بافت پارانشيم بيضه، از روش Van Pelt و همكاران استفاده شد (۴). برای هضم مکانیکی، بافت بیضه پس از شستشو به داخل پتري ديش منتقل شد و با استفاده از پنس و قیچی استریل خرد شد، به طوری که نهایتا قوام نرم و فرم شیرآبه‌ای پیدا کرد.

در مرحله اول هضم آنزیمی از آنزیم‌های کلاژناز IV(۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، هیالورونیداز II (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ترپیسین (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 پارانشيم بيضه در زير ميكروسكوپ معكوس 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

جدول ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف IGF-I بر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای پنجم و چهاردهم کشت.

غلظت فاکتور رشد (µg/ml)	۰	۰/۱	۱	۵	۱۰	SEM
روز ۵	۲۴/۵۷ ^{b}	۲۹/۱۴ ^{b}	۲۸/۱۴ ^{b}	۴۴/۰۰ ^{a}	۴۹/۷۴ ^{a}	۲/۶
روز ۱۴	۴۰/۸۸ ^{b}	۴۱/۱۹ ^{b}	۴۶/۷۰ ^{b}	۱۲۳/۱۹ ^{a}	۱۲۹/۳۱ ^{a}	۴/۳

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($P \leq ۰/۰۵$).

جدول ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف IGF-I بر مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای پنجم و چهاردهم کشت.

غلظت فاکتور رشد (µg/ml)	۰	۰/۱	۱	۵	۱۰	SEM
روز ۵	۱۳۵/۱۸ ^{b}	۱۳۷/۵۶ ^{b}	۱۳۷/۳۶ ^{b}	۱۶۵/۸۳ ^{a}	۱۷۱/۵۷ ^{a}	۵/۲
روز ۱۴	۲۶۱/۶۴ ^{b}	۲۶۳/۹۵ ^{b}	۲۶۹/۶۵ ^{b}	۳۲۳/۱۴ ^{a}	۳۳۰/۶۰ ^{a}	۴/۵

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($P \leq ۰/۰۵$).

اسپرماتوگونی و سرتولی لوله‌های فالکون در دور ۸۰۰ rpm به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و برای کشت استفاده شدند.
پس از سانتریفیوژ مایع‌رویی 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 IGF-I دریافت نکرد و چهار گروه بعدی به ترتیب چهار غلظت ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I را دریافت نمودند. 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 ۱۴روز قرار داده شدند. تعویض محیط هر سه روز یکبار انجام شد. برای ارزیابی تعداد و مساحت کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای پنج و ۱۴ 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 چاهکي 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 کف پلیت به واسطه افزودن مقادیر کافي از تریپسین- EDTA جدا شدند و کل محتویات هر چاهك به يك فالکون منتقل گردید. سپس طبق دستورالعمل کیت مربوطه سلول‌هاي کنترل و تیمار شده از کف پلیت جدا شده و در ۴۰۰ میکرولیتر از بافر مخصوص کیت شناور شدند. پس از افزودن ۵ میکرولیتر رنگ آنکسین -۵ و ۱۵ دقیقه انکوباسیون در تاریکي، مجدداً ۵ میکرولیتر رنگ PI به آن‌ها افزوده شده و ۱۵ دقیقه به دور از نور در دماي محیط قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ ۱۴۰۰ rpm، هر نمونه در ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول ایزوتونیك رقیق شده و توسط دستگاه فلوسیتومتر شمارش و توسط نرم‌افزار فلوجو آنالیز شدند (۱۰).

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

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*، *BCL2* و در همه گروه‌ها با استفاده از آشکارساز توالی طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

این مطالعه در ۴ تکرار انجام شد. نتایج آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه ANOVA به‌وسیله نرم‌افزار آماری SAS آنالیز و سطح معني‌داري ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش توکی انجام شد.

نتایج

تاثیر IGF-I بر تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی

نتایج مربوط تاثیر IGF-I بر تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در جداول ۱ و ۲ گزارش شده است. استفاده از تیمارهای ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I موجب بهبود میزان کلونی‌زایی از نظر تعداد و مساحت در روزهای پنجم و چهاردهم کشت نسبت به سایر گروه‌ها شد ($P\leq۰/۰۵$). اختلاف میان تیمارهای ۰، ۰/۱ و ۱ از نظر آماری معنی دار نبود ($P>۰/۰۵$).

تاثیر غلظت‌های مختلف IGF-I بر زنده‌مانی و سطح آپوپتوزیس

نتایج مربوط تاثیر IGF-I بر زنده‌مانی و سطح آپوپتوزیس در سلول‌های اسپرماتوگونی جدول ۳ گزارش شده است. تیمارهای ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I بالاترین درصد زنده‌مانی را نشان داد ($P\leq۰/۰۵$). اختلاف میان تیمارهای ۰، ۰/۱ و ۱ از نظر آماری معنی دار نبود ($P>۰/۰۵$).
مقدار آپوپتوز اولیه در گروه دریافت کننده ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

جدول ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف IGF-I بر زنده‌مانی و سطح آپوپتوزیس در سلول‌های اسپرماتوگونی.

غلظت فاکتور رشد (µg/ml)	۰	۰/۱	۱	۵	۱۰	SEM
زنده	۸۰/۹۰ ^{b}	۸۱/۵۰ ^{b}	۸۲/۰۰ ^{b}	۸۶/۷۰ ^{a}	۹۰/۶۰ ^{a}	۱/۵
آپوپتوز اولیه	۴/۹۹ ^{b}	۵/۱۰ ^{b}	۴/۸۰ ^{b}	۴/۹۶ ^{b}	۱/۹۶ ^{a}	۱/۰
آپوپتوز ثانویه	۱۱/۴۰ ^{b}	۱۱/۳۰ ^{b}	۱۰/۰۵ ^{b}	۵/۲۳ ^{a}	۴/۶۹ ^{a}	۱/۳
نکروزه	۲/۷۲	۲/۱۰	۳/۱۵	۳/۱۱	۲/۷۸	۰/۹

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف است ($P \leq ۰/۰۵$).

IGF-I از سایر گروه‌ها کمتر بود (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان سایر گروه‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).
مقدار آپوپتوز ثانویه در گروه‌های دریافت کننده تیمارهای ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I از سایر گروه‌های تیماری کمتر بود (P≤۰/۰۵) و اختلاف میان سایر تیمارها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). استفاده از غلظت‌های مختلف IGF-I در گروه‌های تیماری تاثیری بر نرخ سلول‌های نکروزه نداشت (P>۰/۰۵).

تاثیر غلظت‌های مختلف IGF-I بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*)

نتایج مربوط تاثیر IGF-I بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*) در جدول ۴ گزارش شده است. تیمارهای ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر IGF-I بالاترین میزان بیان *BCL2* و پایین‌ترین میزان بیان BAX و نسبت *BAX/BCL2* را نشان داد (P≤۰/۰۵). اختلاف میان تیمارهای ۰، ۰/۱ و ۱ از نظر آماری معنی دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث

اسپرماتوژنز یک فرآیند پیچیده است که در آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دیپلوئید به اسپرم هاپلوئید بالغ تمایز می‌یابند. مسیرهای متعدد ژنتیکی، هورمونی و فاکتورهای رشد باید برای تولید مداوم اسپرم بالغ به‌صورت هماهنگ عمل کنند. SSCs تنها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند و از طریق تکثیر و تزاید مداوم، فرآیند اسپرماتوژنز را پیش می‌برند (۸). وجود تعداد اندك SSCs در بیضه‌های افراد بالغ جداسازی آن‌ها را برای مطالعه‌های آزمایشگاهی با محدودیت مواجه کرده است (۱۲). از طرف دیگر، شیمی‌درمانی یا اشعه‌درمانی طولانی مدت در بیماران مبتلا به سرطان، اثر مخربی روی این سلول‌ها دارد و می‌تواند به ناباروی این بیماران پس از درمان منجر شود. بنابراین، روش‌های کارا و با کفایت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه نقش مهمی در حفظ و نگه‌داری اسپرم و درمان ناباروری بویژه در بیماران نجات یافته از سرطان دارد، و این امر زمانی میسر می‌شود که فیزیولوژی و عملکرد این سلول‌ها به خوبی شناخته و مطالعه شود. شناسایی عوامل موثر بر بلوغ آزمایشگاهی سلول‌های زایا و ارتقای تمایز آن‌ها می‌تواند قدمی مهم برای یافتن درمان نازایی باشد. در این میان استفاده از مدل‌های حیوانی و دامی نقش مهمی را در پیشبرد اهداف تولیدمثلی انسانی داشته است و تاکنون جداسازی و شناسایی نسبی فیزیولوژی و عوامل موثر بر رشد، تکثیر و تمایز SSCs در حیوان‌هایی نظیر رت (۷)، ماهی (۹) و دام‌های اهلی از جمله گاو (۱۴) و خوك (۲) انجام شده است.
اگرچه چندین فاکتور و هورمون رشد موضعی بر تعداد SSCs تأثیر می‌گذارند اما گزارشات اخیر نشان داده است که IGFها حیاتی‌ترین فاکتور رشد در تنظیم تعداد SSCs و اندازه بیضه است (۱۸). همانطور که در این مطالعه مشاهده شد، استفاده از دوزمناسب IGF-I بهبود قابلیت کلونی‌زایی را در SSCs به‌همراه داشت که این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه مورا رودریگر و همکاران (۲۰۱۸) همخوانی داشته است و آن‌ها نشان دادند که IGF-I سبب افزایش تعداد کلونی‌های SSCs می‌شود و این افزایش در دوزهای بالاتر به صورت چشمگیری از گروه کنترل بیشتر می‌شود (۱۱).
IGF-I دارای نقش اساسی در عملکرد بیضه است و حضور گیرنده‌های آن بر روی تمامی سلول‌های موجود در بیضه بیانگر نقش اساسی این فاکتور رشد در رشد و تمایز و تنظیم عملکرد آن‌هاست (۳). غیرفعال نمودن گیرنده‌های انسولینی و IGF-I در سطح SSCs منجر به کاهش بیش از ۷۰ درصدی اندازه بیضه و تولید روزانه اسپرم بالغ می‌گردد (۱۶). این فاکتور علاوه بر تحریک بلوغ اسپرم، تحرک اسپرم و تعداد کل اسپرم، احتمال لقاح را نیز به صورت چشم‌گیری افزایش می‌دهد. پژوهش‌ها نشان داده است که استفاده از IGF-I بر روی نمونه‌های منی منجمد/ذوب شده از گاومیش، سگ و گوسفند نه تنها باعث افزایش تحرک اسپرم‌ها می‌شود، بلکه پتانسیل غشای میتوکندری و نرخ شکافت تخمک‌ها را نیز افزایش می‌دهد (۱۵). علاوه بر این، سلول‌های سرتولی به عنوان سلول‌های پشتیبان و سلول‌های لیدیگ به عنوان سلول‌های تولید کننده تستوسترون نیز تحت تاثیر IGF-I هستند. این فاکتور تکثیر سلول‌های سرتولی قبل از بلوغ را در موش و خوک تحریک می‌کند. در سلول‌های لیدیگ، تولید تستوسترون به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم با درمان با IGF-I تحریک می‌شود (۲۵).
علاوه بر اثرات مثبت ذکر شده، این فاکتور میزان زنده‌مانی SSCs را نیز

جدول ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف IGF-I بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوزیس سلولی (*BAX* و *BCL2*).

غلظت فاکتور رشد (µg/ml)	۰	۰/۱	۱	۵	۱۰	SEM
BAX	۴/۱۱ ^{b}	۳/۴۸ ^{b}	۳/۱۷ ^{b}	۲/۱۹ ^{a}	۲/۰۱ ^{a}	۰/۳۵
BCL2	۱/۹۵ ^{b}	۱/۶۳ ^{b}	۱/۵۱ ^{b}	۲/۶۶ ^{a}	۲/۷۲ ^{a}	۰/۲۱
BAX/BCL2	۲/۱۰ ^{b}	۲/۱۳ ^{b}	۲/۰۹ ^{b}	۰/۸۲ ^{a}	۰/۷۳ ^{a}	۰/۵۰

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

به صورت قابل توجهی افزایش می‌دهد (یانگ و همکاران، ۲۰۲۱). IGF می‌تواند اعضای دو خانواده از پروتئین‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز، یعنی خانواده *BCL2* و کاسپازها را تحت تأثیر قرار دهد. خانواده *BCL2* از اعضای زیادی تشکیل شده است که هم نقش پیش برنده آپوپتوزیس را دارند مانند *BAX* و هم نقش مهارکننده آپوپتوزیس مانند *BCL2* (۲۲). همانطور که در پژوهش حاضر مشاهده شد استفاده از IGF-I به طور قابل توجهی منجر به افزایش بیان ژن *BCL2* و کاهش بیان ژن *BAX* شد که این نتایج با یافته‌های حاصل از مطالعه پن و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی داشت که آن‌ها نیز نشان دادند که سطح بیان *BAX* در اسپرم تیمار شده با IGF-I به طور قابل توجهی نسبت به گروه شاهد کمتر است و سطح ژن *BCL2* نیز در این گروه بالاتر از گروه شاهد است (۱۵).

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از مقدار مناسب IGF-I در محیط کشت موجب بهبود میزان کلونی‌زایی از نظر تعداد و مساحت در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود و همچنین بهبود میزان زنده‌مانی و کاهش سطح آپوپتوزیس را در این سلول‌ها به دنبال دارد. بیان ژن‌های *BCL2* و *BAX* به عنوان عوامل بازدارنده و پیش‌برنده آپوپتوزیس نیز در حضور IGF-I به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابد. بنابراین استفاده از دوز مناسب IGF-I در محیط کشت می‌تواند روشی موثر در راستای بهبود کیفیت و زنده‌مانی و کاهش آپوپتوزیس و مرگ سلولی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند باشد.

منابع مورد استفاده

1. Ashkenazi, A. 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 19: 325–331.

2. Cannarella, R., Mancuso, F., Condorelli, R.A., Arato, I., et al. 2019. Effects of GH and IGF1 on basal and FSH-modulated porcine sertoli cells in-vitro. *Journal of Clinical Medicine*. 8: 811.

3. Clark, A.M., Garland, K.K., Russell, L.D. 2000. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of Reproduction*. 63:1825–1838.

4. Creemers, L.B., den Ouden, K., van Pelt, A.M.M., de Rooij, D.G. 2002. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction Cambridge England*. 124: 791–799.

5. Garbuzov, A., Pech, M.F., Hasegawa, K., Sukhwani, M., et al. 2018. Purification of GFRα1+ and GFRα1–spermatogonial stem cells reveals a niche-dependent mechanism for fate determination. *Stem Cell Reports*. 10: 553–567.

6. Griffeth, R.J., Bianda, V., Nef, S. 2014. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic and Clinical Andrology*. 24:1–10.

7. Hamra, F.K., Chapman, K.M., Nguyen, D.M., Williams-Stephens, A.A., et al. 2005. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Science*. 102:17430.

8. Hofmann, M.C., Braydich-Stolle, L., Dym, M. 2005. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Developmental Biology*. 279: 114–124.

9. Lacerda, S., Aponte, P.M., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., et al. 2018. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Animal Reproduction*. 9: 798–788.

10. Lakshmanan, I. and Batra, S.K. 2013. Protocol for apoptosis assay by flow cytometry using annexin V staining method. *Bio Protocol*. 3(6).

11. Mora Rodríguez, J.A., Porchia, L.M., Camargo, F., López-Bayghen, E. 2019. The use of insulin-like growth factor 1 improved the parameters of the seminogram in a patient with severe oligoasthenoteratozoospermia. *SAGE Open Medical Case Reports*. 7: 2050313X19834154.

12. Oatley, M.J., Racicot, K.E., Oatley, J.M. 2011. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biology of Reproduction*. 84: 639–645.

13. Ohlsson, C., Mohan, S., Sjogren, K., Tivesten, A., et al. 2009. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Reviews*. 30: 494–535.

14. Panahi B.Q. and Tajik, P., Movahedin, M., Moghaddam, G., Geranmayeh, M.H. 2014. Study of insulin-like growth factor 1 effects on bovine type A spermatogonia proliferation and viability. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 38: 693–698.

15. Pan, Y., Cui, Y., Baloch, A.R., Fan, J., et al. 2015. Insulinlike growth factor I improves yak (Bos grunniens) spermatozoa motility and the oocyte cleavage rate by modulating the expression of Bax and Bcl-2. *Theriogenology*. 84: 756–762.

16. Pitetti, J.L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., et al. 2013. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Molecular Endocrinology*. 27:814–27.

17. Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., et al. 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*. 142: 20–24.

18. Sahare, M.G. and Imai, H. 2018. Recent advances of in vitro culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*. 17: 134–142.

19. Steger, K. and Wrobel, K.H. 1996. Postnatal development of

ovine seminiferous tubules: an electron microscopical and morphometric study. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges*. 178: 201–213.

20. Tüttelmann, F., Ruckert, C., Röpke, A. 2018. Disorders of spermatogenesis. *Journal of Medical Genetics*. 30: 12–20.

21. Veisi, M., Mansouri, K., Assadollahi, V., Jalili, C., et al. 2021. Evaluation of co-cultured spermatogonial stem cells encapsulated in alginate hydrogel with Sertoli cells and their transplantation into azoospermic mice. *Zygote*. 6: 1–8.

22. Yang, F., Whelan, E.C., Guan, X., Deng, B., et al. 2021. FGF9 promotes mouse spermatogonial stem cell proliferation mediated by p38 MAPK signaling. *Cell Proliferation*. 54:e12933.

23. Yoon, M.J., Berger, T., Roser, J.F. 2011. Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR) in equine testes. *Reproduction in Domestics Animal*. 46: 221–228.

24. Zhao, H., Nie, J., Zhu, X., Lu, Y., et al. 2018. In vitro differentiation of spermatogonial stem cells using testicular cells from Guangxi Bama mini-pig. *Journal of Veterinary Science*. 19:592–599.

25. Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., et al. 2019. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76: 2681–2695.