



معاونت علوم پزشکی

منشور اخلاق پژوهش

با یاری از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظر به اهمیت جایگاه دانشگاه در اعتلای فرهنگ و تمدن بشری، ما دانشجویان و اعضا هیأت علمی واحدهای دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

- ۱- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت.
- ۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهیدگان (انسان، حیوان و نبات) و سایر صاحبان حق.
- ۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه بکاران پژوهش.
- ۴- اصل منفعت ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش.
- ۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از هرگونه جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.
- ۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و کلیه افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق.
- ۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب نقد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی.
- ۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به بکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.
- ۹- اصل برانت: التزام به برانت جویی از هرگونه رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به شائبه های غیر علمی می آلاینند.



تعهدنامه اصالت پایان نامه کارشناسی ارشد یا رساله دکترای حرفه ای، تخصصی و بالینی

اینجانب **محمد مهدی برفر** دانش آموخته مقطع دکتری حرفه ای در رشته **دامپزشکی** می باشم که در تاریخ **۱۴۰۲/۶/۱۲** از پایان نامه خود تحت عنوان:

" ارزیابی هسیستوپاتولوژیک و بیان ژن تجویز سکر توم مشتق از سلول های بنیادی خون قاعدگی به

همراه ملاتونین اگزوزن در مدل موش های مبتلا به آژواسپر می غیر انسدادی "

دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم:

۱. این پایان نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و ...) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و قوانین موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در قسمت منابع درج نموده ام.

۲. این پایان نامه / رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی در مقاطع مختلف پایین تر و یا بالاتر و همچنین در سایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳. چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هر گونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... را از این پایان نامه داشته باشم، حتماً با هماهنگی و کسب اجازه از معاونت پژوهش و فناوری واحد خود اقدام خواهم نمود.

۴. چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی اینجانب مجاز است مطابق با ضوابط و مقررات با بنده رفتار نماید.

نام و نام خانوادگی:

محمد مهدی برفر

تاریخ و امضاء:



صورتحلّسه دفاع از پایان نامه دکترای حرفه ای (عمومی)

نام و نام خانوادگی دانشجو: محمد مهدی برقر	شماره دانشجویی: ۹۶۰۲۴۱۹۵۲
کد رساله: 20472927098930714019162676099	کد اخلاق:
عنوان: ارزیابی هیستوپاتولوژیک و بیان ژن تجویز سکروتوم مشتق از سلولهای بنیادی خون قاعدگی به همراه ملاتونین اگزوزن در مدل موش مبتلا به آواسپریمی غیر انسدادی	
تعداد واحد پایان نامه: ۶	رشته و گرایش: دامپزشکی (دکترای حرفه ای)

۱۴۰۲/۰۶/۱۲

دفاع از پایان نامه در تاریخ و ساعت با حضور اعضای هیات داوران به شرح فوق برگزار و رای نهایی در خصوص ارائه دفاعیه به شرح ذیل ارائه گردید.

پایان نامه مورد قبول است	پایان نامه با اصلاحات مورد قبول است	پایان نامه مورد قبول نیست
و نمره (از 18) به عدد/حرف ۱۷/۹۹ و با درجه ص به تصویب رسید.		

اعضای هیات داوری پایان نامه:

سمت	نام و نام خانوادگی	تاریخ و امضاء
استاد راهنمای اول	حنانه گلشاهی	۱۳/۰۶/۱۴۰۲
استاد راهنمای دوم	سیده زینب پیغمبرزاده	۱۳/۰۶/۱۴۰۲
استاد داور 1	محمد رضا تابنده	
استاد داور 2		
استاد داور 3		
استاد داور 4		
ناظر	کدیران شوشتر	

* این قسمت توسط گروه آموزشی، دانشکده و دانشگاه تکمیل گردد *

نمره حاصل از ارزیابی مقاله/مقالات دانشجو بر اساس ضوابط (تا سقف 2 نمره) برابر ص محاسبه و نمره نهایی دفاع از پایان نامه (مجموع نمره دفاع و مقاله) با درجه ص و با عدد / با حروف ۱۷/۹۹ تعیین گردید.		
مدیر گروه آموزشی	مدیر پژوهش دانشکده / رئیس دانشکده	معاون پژوهش و فناوری واحد
تاریخ/امضاء	تاریخ/امضاء	تاریخ/امضاء



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد شوشتر

دانشکده کشاورزی، گروه دامپزشکی

پایان نامه برای دریافت درجه دکتری عمومی در رشته دامپزشکی

عنوان:

ارزیابی هسیستوپاتولوژیک و بیان ژن تجویز سکر توم مشتق از سلول های
بنیادی خون قاعدگی به همراه ملاتونین اگزوزن در مدل موش های مبتلا به
آزواسپرمی غیر انسدادی

استادان راهنما:

دکتر حنانه گلشاهی

دکتر سیده زینب پیغمبرزاده

نگارش:

محمد مهدی برفر

شهریور ۱۴۰۲

سپاسگزاری

با سپاس فراوان از
اساتید فرهیخته و فرزانه،

سرکار خانم دکتر حنانه گلشاهی و سرکار خانم دکتر سیده زینب پیغمبرزاده؛
که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نمودند و همواره راهنما و
راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بوده اند.

سرکار خانم عدالتخواه؛
که استادانه به من آموخت و مادرانه مرا یاری نمود

تقدیم به

تشکر و قدردانی
کجا خود شکر این نعمت گزارم ...

این پایان نامه را تقدیم می کنم به؛

مقدس ترین واژه ها در لغت نامه دلم،
پدر
که وصفش خارج از شرح و بیان است

مادر
که نامش همچو الفاظ خدایی بر زبان است

۱	چکیده
---	-------

فصل اول: کلیات تحقیق

۳	۱-۱- ناباروری
۴	۱-۱-۱- آزواسپرمی
۴	۱-۱-۱-۱- اتیولوژی آزواسپرمی
۵	۱-۱-۱-۱-۱- علل پس بیضه ای
۵	۱-۱-۱-۱-۲- علل داخل بیضه ای
۵	۱-۱-۱-۱-۳- علل پیش بیضه ای
۶	۱-۱-۲- روند بروز آزواسپرمی غیر انسدادی
۷	۱-۱-۳- ارزیابی های بالینی
۷	۱-۳-۱-۱- ارزیابی های اولیه
۷	۱-۳-۱-۱-۱- اخذ تاریخچه
۸	۱-۳-۱-۱-۲- معاینات فیزیکی
۸	۱-۳-۱-۱-۳- بررسی های هورمونی
۸	۱-۳-۱-۱-۴- مدیریت درمانی بیماران مبتلا به آزواسپرمی
۸	۱-۴-۱-۱-۱- فناوری کمک باروری
۹	۱-۴-۱-۱-۲- نقش استرس اکسیداتیو (OS) در ایجاد ناباروری
۹	۱-۴-۱-۱-۳- ملاتونین و نقش آنتی اکسیدانی
۱۱	۱-۴-۱-۲- سلول های بنیادی
۱۱	۱-۴-۱-۲-۱- سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی
۱۲	۱-۴-۱-۲-۲- طبقه بندی سلول های بنیادی
۱۳	۱-۴-۱-۲-۳- بر اساس توان تمایزی
۱۳	۱-۴-۱-۲-۴-۱- سلول های بنیادی همه توان
۱۳	۱-۴-۱-۲-۴-۲- سلول های بنیادی پرتوان
۱۳	۱-۴-۱-۲-۴-۳- سلول های بنیادی چند توان
۱۳	۱-۴-۱-۲-۴-۴- سلول های بنیادی کم توان
۱۴	۱-۴-۱-۲-۴-۵- سلول های بنیادی تک توان
۱۴	۱-۴-۲-۲- بر اساس منشأ

۱۴ ۱-۲-۲-۴-۱ سلول های بنیادی جنینی
۱۴ ۲-۲-۲-۴-۱ سلول های بنیادی پرتوان القایی
۱۴ ۳-۲-۲-۴-۱ سلول های بنیادی بالغ
۱۶ ۱-۳-۲-۲-۴-۱ سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs)
۱۶ ۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ سلول بنیادی مشتق از خون قاعدگی
۱۶ ۱-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ هویت MenSCs
۱۶ ۲-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ قدرت تمایزی سلول های بنیادی خون قاعدگی
۱۷ ۳-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ مکانیسم های درمانی MenSCs
۱۷ ۱-۳-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ اثرات پاراکراینی MenSC
۱۷ ۱-۱-۳-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ اثرات رگ زایی
۱۷ ۲-۱-۳-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ اثرات تعدیل کنندگی ایمنی و خاصیت ضد التهابی سلول های بنیادی خون قاعدگی
۱۸ ۳-۱-۳-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ اثرات آنتی فیبروتیک
۱۸ ۴-۱-۳-۱-۱-۳-۲-۲-۴-۱ اثرات آنتی آپتوتیک
۱۹ ۵-۱ درمان عاری از سلول
۱۹ ۱-۵-۱ چالش های درمان با سلول های بنیادی

فصل دوم: پیشینه تحقیق

۲۳ ۱-۲ مبانی نظری و مفهومی
۲۳ ۱-۱-۲ استرس اکسیداتیو و ناباروری
۲۳ ۲-۱-۲ بکارگیری سلول های بنیادی در مدل های ناباروری مردان
۲۳ ۱-۲-۱-۲ سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا
۲۳ ۱-۱-۲-۱-۲ مطالعات حیوانی
۲۴ ۲-۲-۱-۲ سلول های بنیادی جنینی
۲۴ ۱-۲-۲-۱-۲ مطالعات حیوانی
۲۵ ۳-۲-۱-۲ سلول های بنیادی پرتوان القایی
۲۵ ۱-۳-۲-۱-۲ مطالعات حیوانی
۲۵ ۴-۲-۱-۲ سلول های بنیادی مزانشیمال
۲۵ ۱-۴-۲-۱-۲ سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان
۲۶ ۱-۱-۴-۲-۱-۲ مطالعات حیوانی
۲۷ ۲-۴-۲-۱-۲ سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی
۲۷ ۱-۲-۴-۲-۱-۲ مطالعات حیوانی

۲۸	۱-۲-۴-۳-سلول های بنیادی مزانشیمی بندناف
۲۸	۱-۲-۴-۳-۱- مطالعات حیوانی
۲۹	۲-۲-مطالعات و پژوهش های علمی مرتبط
۲۹	۱-۲-۲-۱-بکارگیری سکرئوم مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی در بهبود اختلالات ناباروری
۲۹	۲-۲-۲-مطالعات حیوانی
۲۹	۱-۲-۲-۲-مدل حیوانی ماده
۳۰	۲-۲-۲-۲-مدل حیوانی نر
۳۲	۳-۲-۲-کارآزمایی های بالینی
۳۲	۱-۳-۲-۲-در آقایان
۳۲	۴-۲-۲-ملاتونین و نقش آنتی اکسیدانی

فصل سوم: مواد و روش تحقیق

۳۵	۱-۳-اخلاق
۳۵	۲-۳-جداسازی و کشت سلولهای بنیادی خون قاعدگی
۳۵	۱-۲-۳-فرآیند جمع آوری و ذخیره سازی سلولهای بنیادی مشتق از خون قاعدگی
۳۶	۲-۲-۳-دستورالعمل جمع آوری نمونه خون قاعدگی
۳۷	۳-۲-۳-انکوباسیون اولیه و جداسازی سلول های بنیادی
۳۷	۴-۲-۳-پاساژ سلول های بنیادی
۳۸	۵-۲-۳-کنترل کیفیت سلول های بنیادی
۳۸	۶-۲-۳-منجمد کردن سلول های بنیادی
۳۸	۷-۲-۳-تست های Safety
۳۸	۱-۷-۲-۳-سنجش استریلیتی محیط کشت:
۳۸	۲-۷-۲-۳-سنجش اندوتوکسین:
۳۸	۳-۷-۲-۳-سنجش مایکوپلاسما:
۳۹	۸-۲-۳-خلوص/مشخصه یابی
۳۹	۱-۸-۲-۳-میزان زنده مانی و رشد:
۳۹	۲-۸-۲-۳-مشخصه یابی:
۳۹	۳-۸-۲-۳-تست پایداری:
۳۹	۹-۲-۳-مراحل تهیه فرآورده سلولی
۴۰	۳-۳-ایجاد مدل آزواسپرمی
۴۰	۱-۳-۳-پروتکل مطالعه
۴۰	۲-۳-۳-نحوه تجویز سکروتوم مستخرج از سلول بنیادی مشتق از خون قاعدگی

۴۱ ۳-۳-۳- نحوه تجویز ملاتونین
۴۱ ۳-۴-۳- نحوه نمونه گیری و ارزیابی نمونه
۴۱ ۳-۴-۱- توزین موش ها و اندازه گیری اندیکس وزن بیضه
۴۱ ۳-۴-۲- اخذ نمونه خون و جمع آوری سرم
۴۲ ۳-۴-۳- ارزیابی پارامترهای اسپرم
۴۲ ۳-۴-۱- استحصال اسپرم
۴۲ ۳-۴-۲- ارزیابی تعداد اسپرم
۴۲ ۳-۴-۳- ارزیابی زنده مانای اسپرم
۴۲ ۳-۴-۴- ارزیابی مورفولوژی اسپرم
۴۳ ۳-۴-۵- آنالیز سطح سرمی هورمونهای LH و FSH، Test
۴۳ ۳-۵- ارزیابی هیستوپاتولوژیک
۴۳ ۳-۵-۱- تهیه بلوک پاراتینی
۴۳ ۳-۵-۲- برش بلوک پاراتینی
۴۴ ۳-۵-۳- رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین
۴۴ ۳-۶- بررسی بیان ژن
۴۵ ۳-۶-۱- گام اول - استخراج RNA:
۴۶ ۳-۶-۱-۱- ارزیابی کیفیت RNA:
۴۷ ۳-۶-۱-۲- سنتز cDNA :
۴۹ ۳-۶-۱-۳- PCR جهت بیان ژن ها
۵۰ ۳-۷- آنالیز آماری

فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها

۵۲ ۴-۱- مقدمه
۵۲ ۴-۱-۱- مورفولوژی سلولهای بنیادین مشتق از خون قاعدگی
۵۲ ۴-۱-۲- بیان شاخص های اختصاصی سلول های بنیادین
۵۲ ۴-۱-۳- نتایج بررسی کنترل کیفی
۵۴ ۴-۲- نتایج مطالعات درون تنی
۵۴ ۴-۲-۱- تغییرات وزن بدن
۵۵ ۴-۲-۲- تغییرات اندیکس وزن بیضه
۵۶ ۴-۳- آنالیز پارامتر های اسپرم
۵۶ ۴-۳-۱- غلظت اسپرم
۵۷ ۴-۳-۲- تحرک اسپرم

۵۷	۳-۳-۴-زنده مانی اسپرم.....
۵۹	۴-۳-۴-مورفولوژی اسپرم ها.....
۶۰	۴-۴-نتایج تغییرات سطح سرمی هورمون های تستوسترون ، LH ، FSH.....
۶۰	۴-۴-۱-تغییرات سطح سرمی هورمون LH.....
۶۰	۴-۴-۲-تغییرات سطح سرمی هورمون تستوسترون.....
۶۱	۴-۴-۳-تغییرات سطح سرمی هورمون FSH.....
۶۱	۴-۵-تغییرات هیستوپاتولوژی.....
۶۳	۴-۶-۶-نتایج مولکولی.....
۶۳	۴-۶-۱-بیان ژن VASA.....
۶۴	۴-۶-۲-بیان ژن Bax.....
۶۵	۴-۶-۳-بیان ژن DAZL.....
۶۶	۴-۶-۴-بیان ژن Sycp3.....
۶۷	۴-۶-۵-بیان ژن Stra8.....

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۶۹	۵-۱-بحث.....
۷۴	۵-۲-نتیجه گیری.....
۷۴	۵-۳-پیشنهادهات.....

منابع و مآخذ

۷۶	منابع و مآخذ.....
۸۷	چکیده انگلیسی.....

فهرست جدول ها

عنوان	شماره صفحه
جدول ۱-۱- طبقه بندی انواع آزواسپرمی.....	۴
جدول ۱-۳- تست های کنترل کیفی.....	۳۹
جدول ۲-۳- گروه بندی حیوانات آزمایشگاهی.....	۴۰
جدول ۳-۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده.....	۴۵

فهرست تصویرها

عنوان	شماره صفحه
تصویر ۱-۱- روند اسپرماتوپژنز.....	۶
تصویر ۲-۱- لوله های منی ساز	۷
تصویر ۳-۱- ترشحات خارج سلولی MSC سکر توم ها	۱۹
تصویر ۱-۳- نحوه جاگذاری کاپ در واژن	۳۷
تصویر ۲-۳- آماده سازی بیضه جهت تزریق	۴۱
تصویر ۳-۳- بررسی کیفیت RNA استخراج شده از نمونه های بافتی	۴۷
تصویر ۱-۴- مورفولوژی سلولهای کشت داده شده بیماران	۵۳
تصویر ۲-۴- درصد تغییرات وزنی در گروه های مختلف	۵۴
تصویر ۳-۴- مقایسه اندیکس وزن بیضه در گروه های مختلف	۵۵
تصویر ۴-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر روی غلظت اسپرم	۵۶
تصویر ۵-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر تحرک اسپرم ها	۵۷
تصویر ۶-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر مورفولوژی اسپرم ها	۵۸
تصویر ۷-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر مورفولوژی اسپرم	۵۹
تصویر ۸-۴- تصاویر اسپرم های رنگ آمیزی شده با ائوزین نیگروزین در گروه های Sham	۵۹
تصویر ۹-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر روی سطوح سرمی هومون Testosterone	۶۰
تصویر ۱۰-۴- آنالیز سطح سرمی هورمون FSH	۶۱
تصویر ۱۱-۴- ارزیابی هسیتوپاتولوژی بافت بیضه	۶۲
تصویر ۱۲-۴- مقایسه بیان ژن VASA در گروه ها	۶۳
تصویر ۱۳-۴- مقایسه بیان ژن Bax در گروه ها	۶۴
تصویر ۱۳-۴- مقایسه بیان ژن DAZL در گروه ها	۶۵
تصویر ۱۴-۴- مقایسه بیان ژن Sycp3 در گروه ها	۶۶
تصویر ۱۵-۴- مقایسه بیان ژن Stra8 در گروه ها	۶۷

چکیده

در قرن حاضر ناباروری در حدود ده تا پانزده درصد از زوج ها را در سرتاسر جهان با مشکل مواجه ساخته که حدود سی درصد از آن مربوط به فاکتورهای مردانه می باشد. چالش عمده در درمان ناباروری در مردان، فقدان اسپرم در مایع منی است که با اصطلاح آزواسپرمی شناخته شده و تقریباً ۱۰ تا ۱۵٪ از جمعیت مردان نابارور را شامل می شود. علیرغم مواردی از مداخلات درمانی، در حال حاضر هیچ درمان موثری برای بیماران فاقد اسپرم بالغ در بیضه برای داشتن فرزند بیولوژیک وجود ندارد و در نهایت آنها را به سمت استفاده از جنین اهدایی سوق می دهد. در این پژوهش اثربخشی استفاده از سکروتوم مستخرج از سلولهای بنیادی مشتق از خون قاعدگی را به همراه ملاتونین اگزوزن در مدل حیوانی آزواسپرمی مورد ارزیابی و بعد از گذشت مدت زمان دو ماه از درمان، حیوانات مورد مطالعه از نظر اثربخشی مورد بررسی های بافت شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی قرار گرفت. ارزیابی نتایج درون تنی نشان داد درصد تغییرات وزنی در گروه های دریافت کننده ملاتونین و سکروتوم-ملاتونین مثبت بود. این درحالیست که درحیوانات مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی، کاهش وزن مشهود بود. همچنین ملاتونین و سکروتوم سبب بهبود اندیکس وزن بیضه در حیوانات مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی گشت (به ترتیب $P=0.0000232$ و $P=0.00158$). تجویز سکروتوم، ملاتونین و همچنین تجویز توامان سکروتوم-ملاتونین سبب افزایش غلظت، تحرک و زنده مانی اسپرم ها شد. همینطور مشخص شد مورفولوژی اسپرم در هر سه گروه درمانی، نسبت به گروه آزواسپرمی بهبود یافت. از ارزیابی های هورمونی سطح سرم خون می توان دریافت سطح تستوسترون سرمی در حیوانات مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی دریافت کننده ملاتونین، سکروتوم و تجویز توامان سکروتوم-ملاتونین افزایش داشته است. آنالیز سطح سرمی هورمون LH تغییرات معناداری را در سطح این هورمون در بین گروههای مختلف درمانی نشان نداد. ارزیابی های هیستوپاتولوژی در هر سه گروه درمانی، نشان دهنده بهبود آسیب های بافتی بود. سطح بیان ژن های *DAZL*، *Bax*، *VASA*، *Stra8* و *SYCP3* نیز، در هر سه گروه درمانی نسبت به گروه آزواسپرمی تغییر یافته بودند. می توان نتیجه گرفت مداخله سکروتوم به همراه ملاتونین اگزوزن سبب افزایش درصد تغییرات وزن بدن، ایندکس وزن بیضه، پارامتر های اسپرم (مورفولوژی، تحرک، زنده مانی و غلظت)، سطح سرمی هورمون تستوسترون، بازسازی آسیب های بافتی و همچنین تغییرات سطح بیان ژنی نسبت به گروه آزواسپرمی می گردد.

واژه های کلیدی: ناباروری، آزواسپرمی، سکروتوم مستخرج از سلولهای بنیادی مشتق از خون قاعدگی، بوسولفان، ملاتونین

کلیات تحقیق

۱-۱- ناباروری

۱-۲- نقش استرس اکسیداتیو (OS) در ایجاد ناباروری

۱-۳- ملاتونین و نقش آنتی اکسیدانی

۱-۴- سلول های بنیادی

۱-۵- درمان عاری از سلول

۱-۱- ناباروری

ناباروری به عدم ایجاد بارداری بالینی پس از ۱۲ ماه رابطه جنسی منظم و محافظت نشده در زوجین با سنین کمتر تر از ۳۵ و ۶ ماه در سنین بالای ۳۵ سال اطلاق می شود. از حدود ۵۰ سال پیش تاکنون، به دلیل کاهش نرخ باروری^۱ و متعاقب آن کاهش فرزندآوری، جهان با کاهش قابل توجه جمعیت در مناطق گوناگون رو به رو شده است و این روند نیز ادامه دار خواهد بود (۱).

در حال حاضر ناباروری به چالشی فراگیر در بین بسیاری از زوجین تبدیل شده است و تخمین زده می شود که بیش از ۱۸۵ میلیون نفر را در سراسر جهان تحت تاثیر این مساله قرار داده است (۲). به طور کلی حدود ۸ الی ۱۲ درصد از زوجین در سراسر جهان با مشکل ناباروری مواجه هستند. از بین علل ناباروری، فاکتور های زنانه و مردانه هرکدام حدود ۳۰٪ موارد ناباروی را شامل می شوند و حدود ۲۰٪ از موارد نیز مربوط به هر دو زوج است. در حدود ۱۵ تا ۲۰٪ از موارد نیز منشأ ناباروری نامشخص است. (۳)

عوامل گوناگونی بر قدرت باروری مردان اثر گذار است. از این رو معاینه دقیق بیماران جهت تشخیص علل قابل درمان با رویکرد تغییر شیوه زندگی یا اتخاذ مداخلات درمانی ضروری است. علاوه بر آنالیز و ارزیابی کیفیت مایع منی در تعیین علل ناباروری مردان، آزمایش های تشخیصی پیشرفته ای جهت بهبود تشخیص و مدیریت شرایط نیز ضروری به نظر می رسد. ناباروری همچنین سبب بروز معضلات روانی و اجتماعی قابل توجهی می گردد. همچنین بار اقتصادی قابل توجهی را بر بیماران و سیستم های مراقبت بهداشتی تحمیل می کند. با تشخیص زودهنگام و مدیریت مناسب، می توان این عوامل را تا حد قابل توجهی کاهش داد (۳، ۴). در سال ۱۹۹۲، یک متاآنالیز بزرگ توسط کارلسن و همکارانش مشخص یافت که تعداد اسپرم ها در طی یک دوره ۶۰ ساله، حدود ۵۰ درصد کاهش یافته است (۵). متعاقباً، مطالعات متعددی کاهش میزان مشابهی را در سطح جهانی نشان داده اند، اگرچه برخی نیز این ادعا را رد کرده اند. یک بررسی سیستماتیک دیگر که توسط لوین و همکاران صورت پذیرفت، نشان داد که تعداد اسپرم بین سال های ۱۹۷۳ تا ۲۰۱۱ بین ۵۰ تا ۶۰ درصد کاهش یافته است (۶).

بسیاری از علل و عوامل موثر در بروز ناباروری مردان، می توانند به صورت مادرزادی، اکتسابی و ناشناخته طبقه بندی شوند. از علل ژنتیکی شناخته شده اولیه در ناباروری مردان، می توان به فقدان مادرزادی دو طرفه مجرای دفران مرتبط با جهش های ژن فیبروز کیستیک^۲، سندرم کالمن^۳، ناهنجاری های کروموزومی و ریزحذف های کروموزوم Y^۴ اشاره کرد که منجر به نقص اسپرماتوژنیک می شود. در بین عوامل اکتسابی،

¹ Fertility

² Cystic Fibrosis

³ Kallmann syndrome

⁴ Y-microdeletions

واریکوسل^۱ با شیوع ۴۰٪ شایع‌ترین و البته قابل اصلاح‌ترین علت ناباروری در مردان است. حدود ۳۰ تا ۵۰٪ از موارد ناباروری مردانه نیز منشأ ناشناخته دارند (۷).

۱-۱-۱-۱-آزواسپرمی

یکی از چالش‌های بزرگ در درمان ناباروری آقایان، فقدان اسپرم^۲ در مایع منی می‌باشد که با اصطلاح آزواسپرمی^۳ شناخته می‌شود که ۱٪ از جمعیت مردان و ۱۵٪ از مردان نابارور با این مشکل مواجه هستند. تشخیص اولیه آزواسپرمی مستلزم عدم وجود اسپرم در حداقل دو نمونه منی سانتریفیوژ شده (3000 RPM/15 min) به فاصله حداقل ۲ هفته می‌باشد.

۱-۱-۱-۱-۱-اتیولوژی آزواسپرمی

آزواسپرمی را می‌توان ناشی از علل غیر انسدادی^۴ (NOA) (اختلالات پیش بیضه‌ای^۵، داخل بیضه‌ای^۶) یا علل انسدادی^۷ (OA) (پس بیضه‌ای^۸) طبقه‌بندی کرد (جدول ۱-۱).

جدول ۱-۱- طبقه‌بندی انواع آزواسپرمی (۸)

FSH	تستوسترون	حجم مایع منی	اتیولوژی	
کم	کم	طبیعی/کم	هیپوگنادوتروپیک-هایپوگنادیسم	پیش بیضه‌ای
کم	زیاد/طبیعی/کم	طبیعی/کم	استروئیدهای آنابولیک	
زیاد	کم	طبیعی	اختلالات اولیه	داخل بیضه‌ای
زیاد	کم	طبیعی	اختلالات ژنتیکی	
طبیعی	طبیعی	طبیعی	واژکتومی	پس بیضه‌ای
طبیعی	طبیعی	طبیعی	انسداد در اپیتویدیدیم ^۹	
طبیعی/زیاد	طبیعی	کم	انسداد مجرای انزالی ^{۱۰}	
طبیعی/زیاد	طبیعی	کم	اختلال عملکرد انزال ^{۱۱}	

¹ Varicocele

² Sperm

³ Azoospermia

⁴ Non obstructive Azoospermia (NOA)

⁵ Pre testicular

⁶ Testicular

⁷ Obstructive Azoospermia (OA)

⁸ Post testicular

⁹ Epididymal obstruction

¹⁰ Ejaculatory duct obstruction

¹¹ Disorders of Ejaculation

۱-۱-۱-۱-۱-علل پس بیضه ای

علل پس بیضه آژواسپرمی یا به دلیل انسداد در مسیر انتقال اسپرم و یا اختلال در مجرای انزالی بروز می کند. در آژواسپرمی انسدادی روند اسپرماتوژنز و همچنین عملکرد غدد درون ریز و برون ریز طبیعی بوده و نقص مربوط به انسداد در مجرای انزالی می باشد. در واقع امکان یافتن اسپرم در بیضه وجود دارد ولی به دلیل انسداد در مسیر، اسپرم در مایع منی یافت نمی شود. از مهم ترین عواملی که سبب بروز اختلالات پس بیضه ای می گردد می توان به عدم وجود وازودفران^۱، انسداد عروقی^۲، انسداد اپیدیدیم، انسداد در مجرای انزالی و اختلالات مربوط به انزال اشاره نمود [۱۳].

۱-۱-۱-۲-علل داخل بیضه ای

علل داخل بیضه ای که به طور کلی نارسایی اولیه بیضه نامیده می شود، شامل ناهنجاری در فرآیند اسپرم زایی^۳ است که در داخل بیضه رخ می دهد. از جمله شایع ترین عوامل دخیل در این دسته می توان به واریکوسل، عدم نزول بیضه به درون اسکروتوم^۴، پیچ خوردگی بیضه^۵، ارکیت ناشی از اوریون^۶، اثرات گنادتوکسیک^۷ ناشی از داروها، ناهنجاری های ژنتیکی^۸ و علل ایدیوپاتیک^۹ اشاره کرد.

۱-۱-۱-۳-علل پیش بیضه ای

علل پیش بیضه ای آژواسپرمی شامل مشکلات هورمونی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادی است که اثرات نامطلوبی بر روند اسپرماتوژنز می گذارد و تحت عنوان نارسایی ثانویه بیضه شناخته می شود که تا ۳ درصد از مردان نابارور را تحت تاثیر قرار می دهد. هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک^{۱۰} علت نادر ناباروری در مردان است و با کاهش تستوسترون، هورمون لوتئینیزه کننده^{۱۱} (LH) و هورمون محرک فولیکول^{۱۲} (FSH) مشخص می شود که می تواند مادرزادی یا اکتسابی باشد و به عنوان یکی از علل قابل درمان در نظر گرفته می شود. تومورهای غده هیپوفیز، ترومای غده هیپوفیز، سندرم کالمن و استفاده از استروئیدهای آنابولیک از علل شایع هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک می باشند.

¹ Absence of the vasa deferentia

² Vasal obstruction

³ Spermatogenesis

⁴ Undescended testes

⁵ Testicular torsion

⁶ Mumps orchitis

⁷ Gonadotoxic effects

⁸ Genetic abnormalities

⁹ Idiopathic causes

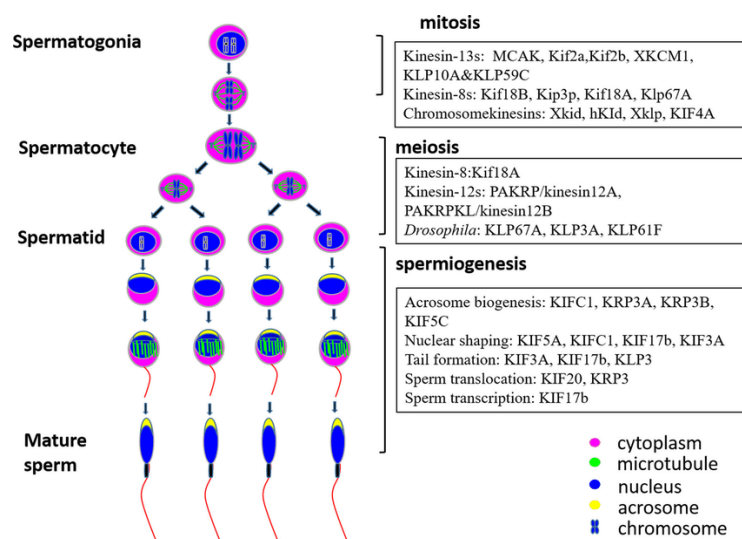
¹⁰ Hypogonadotropic hypogonadism

¹¹ luteinizing hormone (LH)

¹² Follicle-stimulating hormone (FSH)

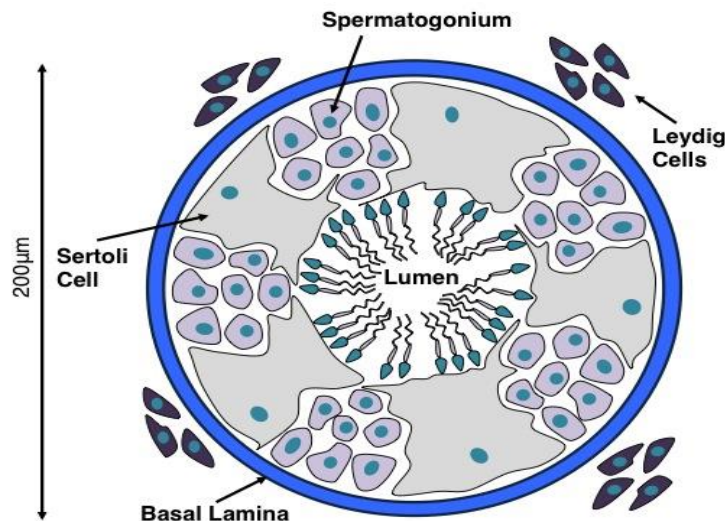
۱-۱-۲- روند بروز آواسپرمی غیر انسدادی

در رخداد آواسپرمی غیر انسدادی شرایط متعدد مادرزادی یا اکتسابی، اغلب منجر به نقص در فرآیند اسپرماتوژنز می شوند (۹). اسپرماتوژنز فرآیندی است که طی آن، اسپرماتوگونی نابالغ به اسپرماتوزا بالغ (اسپرم) تبدیل می شود و که این امر با تکثیر و تمایز اسپرماتوگونی ها صورت می پذیرد (تصویر ۱-۱). این سلول ها روی غشا پایه لوله های منی ساز واقع شده اند و سلول های سرتولی^۱ نیز آنها را احاطه کرده اند (تصویر ۱-۲). این مجموعه، محیطی را فراهم می آورد که باعث عملکرد و بقای اسپرماتوژنز می شود. انجام صحیح این روند برای باروری مردان ضروری است. هر گونه تغییر در این محیط باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز می شود که به نوبه خود می تواند باعث ناباروری موقت یا دائم شود. به طور کلی در بیضه و در روند اسپرماتوژنز چهار نوع سلول اصلی دخیل می باشند که عبارتند از: سرتولی، لیدیگ^۲، سلول زایا^۳ و سلول شبه عضلانی اطراف لوله های منی ساز (۱۰). از طرفی بیضه دارای دو فعالیت اصلی می باشد، که شامل تولید هورمون های استروئیدی^۴ (استروئیدوژنز^۵) و تولید اسپرماتوزوا^۶ (اسپرماتوژنز) هستند که حاصل همکاری بین سلول های مذکور می باشد. استروئیدوژنز توسط سلول های لیدیگ صورت می گیرد و اسپرماتوژنز درون لوله های منی ساز انجام می شود. سلول های سرتولی اولین نوع سلول هایی می باشند که در طول دوره تکاملی تمایز می یابند. نتیجه این اتفاق، تکامل لوله های اسپرم ساز، جلوگیری از ورود سلول های بنیادی به تقسیم میوز، تکثیر آنها و شروع فعالیت سلول های لیدیگ می باشد (۱۱، ۱۲).



تصویر ۱-۱- روند اسپرماتوژنز (۱۰)

¹ Sertoli
² Leydig
³ Germ cell
⁴ Steroid hormone
⁵ Steroidogenesis
⁶ Spermatozoa



تصویر ۱-۲- لوله های منی ساز (۱۱)

۱-۱-۳- ارزیابی های بالینی

اخذ شرح حال کامل پزشکی، معاینه فیزیکی و بررسی هورمونی اجزای اصلی ارزیابی اولیه مردان مبتلا به آژواسپرمی است. در مراحل بعدی، بهره گیری از تکنیک های تصویر برداری، بیوپسی بافت بیضه و همچنین بررسی های ژنتیکی بسیار حائز اهمیت است.

۱-۱-۳-۱- ارزیابی های اولیه

۱-۱-۳-۱-۱-۱- اخذ تاریخچه

اخذ تاریخچه جهت تشخیص نوع آژواسپرمی بسیار حائز اهمیت است. فرد مبتلا به آژواسپرمی می بایست از نظر تاریخچه ابتلا به تروما، پیچ خوردگی، کریپتواریکیسمس مورد ارزیابی قرار بگیرد. همچنین داشتن سابقه قبلی جراحی لگن، اینگوینال یا کیسه بیضه نیز مهم است. هر گونه سابقه باروری قبلی می تواند در تشخیص OA و NOA مفید باشد. عفونت های دستگاه تناسلی، مانند اورتریت و اپیدیدیمیت می توانند باعث OA شوند، در حالی که اورکیت اوریون می تواند باعث بروز NOA شود. وجود هرگونه سابقه ابتلا به دیابت، سیروز کبدی، نارسایی مزمن کلیوی، بدخیمی های قلبی عروقی، شیمی درمانی و رادیو تراپی و مصرف داروهای خاص می توانند بر تولید و/یا انتقال اسپرم اثر گذار باشد، در نتیجه در فرآیند اخذ تاریخچه می بایست به دقت مورد توجه قرار گیرند.

۱-۱-۱-۳-۲-معاینات فیزیکی

با توجه به اینکه توزیع مو و ژنیکوماستی می تواند نشان دهنده کمبود تستوسترون یا عدم تعادل هورمونی باشد، معاینه فیزیکی باید با بررسی عادت بدن شروع شود. انحنای آلت تناسلی، هیپوسپیدیاس^۱، اسکارهای جراحی و بطور کلی وجود هر گونه ناهنجاری در دستگاه تناسلی باید مورد توجه قرار گیرد.

۱-۱-۱-۳-۳-بررسی های هورمونی

فرآیند اسپرم سازی توسط محور هیپوفیر-هیپوتالاموس- گنادی کنترل می شود. لذا بررسی های هورمونی جهت شناسایی هرگونه ناهنجاری در سطح هورمونی جهت شناسایی مبتلایان با اهمیت است.

۱-۱-۱-۴-مدیریت درمانی بیماران مبتلا به آزواسپرمی

پیشرفت های اخیر در آزمایش های ژنتیکی و روش های میکروسرجری همراه با فناوری کمک باروری^۲ (ART) که از محدود گزینه های درمانی به حساب می آیند، به شناسایی و درمان این بیماران کمک کرده است. در آزواسپرمی انسدادی، مدیریت شامل بازسازی میکروسرجری در صورت امکان با استفاده از وازو واستومی^۳ یا وازو اپیدیدیموستومی^۴ است. آسپیراسیون میکروسکوپی اسپرم موجود در اپیدیدیم^۵ (PESA) با لقاح آزمایشگاهی^۶ (IVF) یا تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسمی^۷ (ICSI) برای مواردی که قابل بازسازی نیستند استفاده می شود. مدیریت NOA شامل مداخلات پزشکی در موارد هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک مادرزادی و استخراج اسپرم به روش میکروداایکشن بیضه با IVF و ICSI برای متقاضیان واجدالشرایط بر اساس بررسی های آزمایشگاهی و ژنتیکی است [۸].

۱-۱-۱-۴-۱-فناوری کمک باروری

استفاده از تکنیک های کمک باروری به طور قابل ملاحظه ای توانایی زوج های نابارور را برای داشتن فرزند بیولوژیک بهبود بخشیده است. برای تلقیح داخل رحمی، اسپرم های متحرک پیشرونده از مایع منی جدا شده و در طول زمان تخمک گذاری مستقیماً به داخل حفره رحم تلقیح می شوند. در موارد ناباروری شدیدتر با عامل مردانه می توان از ICSI استفاده کرد. علیرغم موفقیت آمیز بودن این تکنیک ها، برخی از زوج ها هنوز نتایج ضعیفی دارند که ممکن است ناشی از کیفیت پایین تخمک، اسپرم و یا هر دو باشد. لی و همکاران نشان دادند که چرخه های تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسمی با استفاده از اسپرم مردان مبتلا به

¹ Hypospadias

² Assisted Reproductive Technology (ART)

³ Vasovasostomy

⁴ Vasoepididymostomy

⁵ Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA)

⁶ In vitro fertilization (IVF)

⁷ Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

الیگواسنتوتراتوزواسپرمی شدید و آزواسپرمی غیر انسدادی از نظر کاشت جنین و بارداری بالینی نتایج ضعیف تری نسبت به مردانی داشتند که نرموزواسپرمی داشتند [۶۸].

۱-۲- نقش استرس اکسیداتیو (OS) ^۱ در ایجاد ناباروری

گونه‌های اکسیژن فعال ^۲ (ROS) که از محصولات طبیعی متابولیسم سلولی می‌باشند، از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیدکننده بسیار واکنش‌پذیر هستند که شامل یون‌هایی نظیر سوپراکسید ^۳ (O_2^{\bullet})، پراکسید هیدروژن ^۴ (H_2O_2)، پراکسیل ^۵ (ROO^{\bullet}) و هیدروکسیل ^۶ (OH^{\bullet}) می‌باشند. از منظر فیزیولوژیکی، متابولیت‌های اکسیژن فعال برای فرآیندهای آپوپتوزی در بدن ضروری هستند (۱۳).

ROS مستقیماً در ایجاد آسیب اکسیداتیو نامطلوب به ماکرومولکول‌های سلولی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در سلول‌های زایا نقش دارد، که می‌تواند منجر به مرگ این سلول‌ها شود. در واقع، تولید بیش از حد ROS و استرس اکسیداتیو متعاقب آن نقش مهمی در مهار رشد سلول‌های زایا دارد.

منابع اصلی ROS در اسپرم شامل لکوسیت‌های فعال در پلاسمای منی و میتوکندری در اسپرم است. همچنین شواهد زیادی نشان می‌دهد که آسیب ناشی از ROS به اسپرم یکی از عوامل اصلی رخداد ناباروری در ۳۰ تا ۸۰ درصد از مردان نابارور است (۱۴).

تاثیر ROS بر اسپرم از طریق ایجاد آسیب به غشای اسپرم است که در نهایت منجر به کاهش تحرک و توانایی آن برای ترکیب شدن با تخمک و همچنین آسیب به DNA اسپرم می‌باشد (۱۵).

استرس اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد که تولید ROS‌ها، از دفاع آنتی‌اکسیدانی طبیعی خود بدن فراتر رود و منجر به آسیب سلولی گردد (۱۶).

۱-۳- ملاتونین ^۷ و نقش آنتی‌اکسیدانی

فرآیندها و رفتارهای فیزیولوژیکی در بسیاری از پستانداران ریتمیک است. اخیراً توجه به نقش ریتم شبانه‌روزی در کنترل عملکرد تولید مثلی افزایش یافته است. غده پینه آل ^۸ یک غده درون ریز مهم است که ترشح ملاتونین (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*) را بر عهده دارد. هورمون ملاتونین در هماهنگ‌سازی پاسخ‌های تولید مثلی حیوانات به شرایط نوری محیط، ایقاي نقش می‌کند. شواهدی وجود دارد که ثابت می‌کند ملاتونین ممکن است در تنظیم بیولوژیکی و فرآیند تولید مثل در انسان نیز نقش داشته باشد (۱۷).

در سال ۱۹۶۳، ورتمن و همکاران ابتدا گزارش دادند تزریق ملاتونین وزن تخمدان‌های موش‌های ماده را کاهش می‌دهد. از آن زمان، شواهد فراوانی نشان داد غده پینه آل، از طریق ترشح ملاتونین، بر عملکرد

¹ Oxidative stress (OS)

² Reactive Oxygen Species (ROS)

³ Superoxide

⁴ Hydrogen peroxide

⁵ Peroxyl radicals (ROO^{\bullet})

⁶ Hydroxyl

⁷ Melatonin

⁸ Pineal gland

تولید مثلی در طیف گسترده ای از گونه ها تأثیر می گذارد. همچنین در اکثر حیوانات (اما نه همه)، ملاتونین اثر ضد گنادوتروفیک دارد (۱۸).

ملاتونین دارای یکسری عملکرد طبیعی دیگر، نظیر خاصیت آنتی اکسیدانی، تنظیم کنندگی سیستم ایمنی^۱، تنظیم کنندگی سیگنالهای سلولی، اثرات نوروپروتکتیو و ضد توموری است. مطالعات مختلفی نشان داده که ملاتونین، با خاصیت آنتی اکسیدانی خود قادر به حذف رادیکالهای آزاد بسیار واکنش پذیر نظیر OH[•] است.

غلظت این هورمون در خون به طور روزانه و طبق فصول مختلف در پستانداران متغیر است. غده پینه آل نقش مهمی در تنظیم فعالیت نورواندوکرینی سیستم تولید مثلی انسان ایفا میکند. مطالعات سال های اخیر همچنین نشان داده است که ملاتونین به دلیل دارا بودن گیرنده های ملاتونینی بر روی ساختارهای مختلف مانند مغز، شبکه، سیستم قلبی - عروقی بر آنها تأثیر میگذارد و در تنظیم چندین فعالیت فیزیولوژیک نظیر تنظیم روند خواب شبانه روزی نقش دارد (۱۹، ۲۰).

به طور کلی ملاتونین در هومئوستاز^۲ و حفاظت سلولی نیز موثر است و سبب محافظت سلولهای بنیادی مزانشیمی^۳ (MSCs) از روندهای اکسیداسیون، التهاب، آپوپتوز، ایسکمی و روند پیری می شود (۲۱). همچنین همانگونه که اشاره گردید ملاتونین در دتوکسیفیه کردن ROS و رادیکالهای آزاد نقش ایفا میکند که این امر به واسطه آزادسازی آنزیمهای آنتی اکسیدانی شامل کاتالاز (CAT)^۴، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)^۵، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)^۶ و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)^۷ انجام میشود. (۲۲)

ملاتونین همچنین سبب تنظیم فعالیت بیضه ها از طریق محور هیپوفیزی - هیپوتالاموس میگردد و به علاوه دارای خواص ضد التهابی^۸ و پرولیفراتیو^۹ است و سبب مهار موتاسیون^{۱۰} DNA ناشی از آسیب اکسیداتیو میشود و در تخمدان و بیضه سبب کاهش بیان کاسپاز سه^{۱۱} در مقابل آسیب داروهای شیمی درمانی میگردد. مطالعات نشان داده اند که به علت وجود گیرنده های ملاتونین بر روی سلولهای اپیدیدیم و اسپرماتوزوآ ملاتونین ممکن است دارای نقش حفاظتی در ساختار لیپیدی غشای آنها بوده و عملکرد میتوکندریهای تاژک اسپرم و در نتیجه قدرت تحرک اسپرمها را تحت تأثیر قرار دهند. همچنین مطالعات نشان داده اند که ملاتونین نقش مهمی در تنظیم بازسازی و تمایز سولهای بنیادی مختلف مانند سلولهای بنیادی مزانشیمی و اسپرماتوژنیک دارد (۲۳، ۲۴).

¹ Immune System

² Homeostasis

³ Mesenchymal stem cell (MSC)

⁴ Catalase (CAT)

⁵ Glutathione Reductase (GR)

⁶ Superoxide dismutase (SOD)

⁷ Glutathione peroxidase (GPx)

⁸ Anti Inflammatory

⁹ Proliferative

¹⁰ Mutation

¹¹ Caspase 3

در مطالعه ای، Bowen Niu و همکاران برای تعیین اینکه آیا ملاتونین می‌تواند بر روی کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال^۱ (SSCs) در شرایط آزمایشگاهی تأثیر بگذارد یا خیر. لذا این محققین اسپرماتوگونی‌ها را با استفاده از تکنیک‌های اتصال افتراقی جدا و خالص کردند و سلول‌ها را با استفاده از محیط SSC حاوی غلظت‌های مختلف ملاتونین کشت دادند. نتایج نشان داد که ملاتونین می‌تواند تشکیل و اندازه کلونی های SSC را افزایش دهد (۲۱).

۴-۱- سلول های بنیادی

سلول های بنیادی^۲، سلول های غیر تخصصی^۳ بدن هستند. این سلول ها، پایه سایر سلول ها در هر ارگان و بافتی در بدن می باشند که با تخصص ویژه و همچنین با تقسیم میوز عهده دار تشکیل بافت هستند و بلافاصله پس از لقاح عملکرد خود را آغاز می کنند. آنها قادر به تمایز به هر سلولی از ارگانیسم هستند. در تعریف، سلول های بنیادی به سلول هایی گفته می شود که توانایی تمایز^۴ و خودنوسازی^۵ یعنی توانایی تقسیم به تعداد زیاد و بدون تغییر ماهیت ژنتیکی را دارند. این در حالیست که سایر سلول های فاقد این توانایی ها هستند. سلول های بنیادی هم در جنین و هم در سلول های بالغ وجود دارند. چندین مرحله تا اختصاصی شدن هر سلول بنیادی وجود دارد. قدرت رشد با هر مرحله کاهش می‌یابد، به این معنی که یک سلول بنیادی تک‌توان قادر به تمایز به تعداد سلول‌های پرتوان نیست.

در برخی ارگانیسم‌های چند سلولی، سلول‌های بنیادی می‌توانند به عنوان مخزن سلولی برای تولید، نگهداری، ترمیم یا حتی بازسازی بسیاری از بافت‌ها عمل کنند (۲۵، ۲۶). سلول های بنیادی به عنوان یک جمعیت مجزا از سلول ها توصیف شده است که در راس سلسله مراتب تمایز سلولی برگشت ناپذیر قرار دارند (۲۷). سلول های بنیادی پتانسیلی بالقوه برای تبدیل به انواع سلول های تمایز یافته بدن را دارند که بعنوان یک ابزار ترمیمی برای بافت های آسیب دیده بدن عمل می کنند (۲۸).

۴-۱-۱- سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی

سلول های بنیادی، پتانسیل زیادی برای تبدیل شدن به یکی از مهمترین جنبه های پزشکی را دارند. به علاوه، این واقعیت که آنها نقش زیادی در توسعه طب ترمیمی ایفا می کنند، موجب مطالعه و تحقیق بر روی آنها شده که اطلاعات زیادی را در مورد رویدادهای پیچیده ای که در طول رشد انسان رخ می دهد نشان می دهد. تفاوت بین یک سلول بنیادی و یک سلول تمایز یافته، در سطح DNA سلول ها مشخص می شود. در یک سلول بنیادی تمایز نیافته، DNA با ژن های فعال مرتب شده است. هنگامی که سیگنال‌ها وارد سلول

¹ Spermatogonial stem cells (SSCs)

² Stem cell

³ Non-specialized

⁴ Differentiation power

⁵ Self-Renewing

می‌شوند و فرآیند تمایز آغاز می‌شود، ژن‌هایی که دیگر مورد نیاز نیستند خاموش می‌شوند، اما ژن‌های مورد نیاز برای عملکرد تخصصی فعال باقی می‌مانند (۲۷، ۲۹، ۳۰).

بسیاری از شرایط پزشکی جدی، مانند نقص مادرزادی یا سرطان، به دلیل تمایز نامناسب یا تقسیم سلولی بی‌رویه ایجاد می‌شوند. در حال حاضر، در شرایط پاتولوژیک مختلفی از سلول‌های بنیادی استفاده شده است که می‌توان به درمان آسیب‌های نخاعی، نارسایی‌های قلبی (۳۱)، دژنراسیون شبکیه و ماکولا (۳۲)، پارگی تاندون و دیابت نوع ۱ اشاره کرد (۳۳).

تحقیقات بر سلول‌های بنیادی می‌تواند به درک بیشتر و بهتر فیزیولوژی این سلول‌ها کمک کند که ممکن است منجر به یافتن راه‌های جدیدی در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج فعلی شود. این سلول‌ها بیش از ۵۰ سال است که به طور تجربی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۳۴). پیوند این سلول‌ها می‌تواند اتولوگ^۱ (زمانی که از سلول‌های خود بیمار استفاده می‌شود)، آلوژنیک^۲ (زمانی که سلول بنیادی از اهداکننده می‌آید)، یا سینرژیک^۳ (از دو قلوهای همسان) باشد (۲۷).

استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی در حیطه‌های مختلف صورت است. برای مثال M Alessandrini و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌ای به بررسی اثرات سلول‌های بنیادی جنینی، مزانشیمال و پر توان القایی بر آسیب‌های عصبی متعاقب ام‌اس^۴ (MS)، سکته مغزی^۵ و آسیب‌های نخاعی پرداختند. آنها عنوان کردند که استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی در پزشکی بازساختی می‌تواند در آیند نوید بخش درمان اختلالات عصبی باشد (۳۵).

همچنین مطالعات بسیار زیادی مبنی بر اثر بخشی سلول‌های بنیادی در اختلالات ناباروری چه در بانوان و چه در آقایان وجود دارد. به عنوان مثال در سال ۲۰۲۱، Sarama Saha و همکاران به بررسی نقش سلول‌های بنیادی بر ناباروری پرداختند. آنها عنوان کردند MSCs ها توانایی بازسازی اندومتر و بهبود عملکرد تخمدان را دارا می‌باشد (۳۶).

۱-۴-۲- طبقه بندی سلول های بنیادی

سلول‌های بنیادی را می‌توان بر اساس منشأ^۶ به دو دسته سلول‌های بنیادی جنینی^۷ (ESCs)، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی^۸ (iPSC) و سلول‌های بنیادی بالغ^۹ (ASCs) بالغ طبقه بندی کرد. در طبقه بندی

¹ Autologous

² Allogeneic

³ Syngenic

⁴ Multiple sclerosis (MS)

⁵ Stroke

⁶ Origine

⁷ Embryonic stem cell

⁸ Induced pluripotent stem cells (iPSCs)

⁹ Embryonic Stem Cell

به شیوه ای دیگر همچنین این سلول ها بر اساس توانایی تمایز به پنج دسته همه توان^۱، پر توان^۲، چند توان^۳، توان محدود^۴ و تک توان^۵ طبقه بندی کرد (۲۷).

۱-۲-۴-۱- بر اساس توان تمایزی

۱-۲-۴-۱-۱- سلول های بنیادی همه توان

سلول های بنیادی همه توان قادر به تقسیم و تمایز به تمام سلول های ارگانیسم ها هستند. Totipotency دارای بالاترین پتانسیل تمایز است و به سلول ها اجازه می دهد تا ساختارهای جنینی و خارج جنینی را تشکیل دهند. یکی از نمونه های سلول های همه توان، زیگوت است که پس از بارور کردن تخمک توسط اسپرم به وجود می آید. این سلول ها بعداً می توانند به هر یک از سه لایه زاینده تبدیل شوند یا جفت را تشکیل دهند. تقریباً پس از ۴ روز، توده سلولی داخلی بلاستوسیست، پرتوان می شود. این ساختار منبع سلول های پرتوان است (۲۷).

۱-۲-۴-۱-۲- سلول های بنیادی پرتوان

سلول های بنیادی پرتوان^۶ (PSC) سلول های تمام لایه های زاینده را تشکیل می دهند، اما نه ساختارهای خارج جنینی، مانند جفت. سلول های بنیادی جنینی یک نمونه از این سلول ها هستند. ESC ها از توده سلولی درونی جنین های قبل از لانه گزینی مشتق می شوند (۲۷، ۳۷).

۱-۲-۴-۱-۳- سلول های بنیادی چند توان

سلول های بنیادی چند توان دارای طیف تمایز کمتری تری نسبت به PSC ها هستند، اما می توانند در سلول های مجزا از دودمان سلولی خاص تخصص داشته باشند. یک نمونه سلول بنیادی خونساز است که می تواند به چندین نوع سلول خونی تبدیل شود. پس از تمایز، یک سلول بنیادی خونساز به یک سلول الیگوپوتنت تبدیل می شود. سپس توانایی تمایز آن به سلول های اصل و نسب خود محدود می شود. با این حال، برخی از سلول های چند توانی قادر به تبدیل به انواع سلول های نامرتبط هستند، که پیشنهاد می کند آنها را سلول های پرتوان نامگذاری کنند (۲۷).

۱-۲-۴-۱-۴- سلول های بنیادی کم توان

سلول های بنیادی کم توان می توانند به چندین نوع سلول تمایز یابند. سلول بنیادی میلوئیدی نمونه ای است که می تواند به گلبول های سفید تقسیم شود اما به گلبول های قرمز تقسیم نمی شود (۳۸).

¹ Totipotent

² Pluripotent

³ Multipotent

⁴ Oligopotent

⁵ Unipotent

⁶ Pluripotent stem cell (PSC)

۱-۴-۲-۱-۵-سلول های بنیادی تک توان

سلول های بنیادی تک توان با محدودترین قابلیت های تمایز و خاصیت ویژه تقسیم مکرر مشخص می شوند. این سلول ها فقط قادر به تمایز به یک نوع سلول هستند، به عنوان مثال کراتینوسیت ها (۲۷).

۱-۴-۲-۲-بر اساس منشا

۱-۴-۲-۱-سلول های بنیادی جنینی

سلول های بنیادی جنینی، سلول هایی پر توانند که اغلب از توده سلول داخلی^۱ بلاستوسیت جنینی منشا می گیرند. این سلول ها قادرند به هر سه لایه جنینی اکتودرم^۲، مزودرم^۳ و اندودرم^۴ تمایز یابند. همچنین ویژگی های منحصربه فرد بسیاری از جمله نامیرا بودن، بیان فاکتور نسخه برداری Oct-4، توانایی تمایز به انواع رده های سلولی و همچنین امکان پذیر بودن دست ورزی آزمایشگاهی این سلول ها اشاره نمود (۳۹). هر چند که به دلایل گفته شده، از این سلول ها در تحقیقاتی نظیر تمایز به رده های خاص، سلول درمانی و نیز تولید حیوانات تراریخته استفاده می شود، اما چالش هایی نظیر احتمال بروز پاسخ ایمنی فرد پذیرنده، احتمال وقوع تراشوم و بدخیمی (به دلیل فعالیت تلومراز بالا و تکثیر طولانی مدت قابل توجه) و همچنین لزوم تخریب جنین برای دست یابی به این سلول ها از لایه داخلی بلاستوسیت جنینی، استفاده از دسته از سلول های بنیادی را با محدودیت هایی مواجه ساخته است (۴۰).

۱-۴-۲-۲-سلول های بنیادی پرتوان القایی

سلول های بنیادی پرتوان القایی، نوعی از سلول های بنیادی پرتوان مشتق شده از سلول های سوماتیک بالغ هستند که از طریق بیان اجباری ژن ها و عوامل مهم برای حفظ ویژگی های تعیین کننده، به طور ژنتیکی به حالت سلول شبه بنیادی جنینی برنامه ریزی شده اند (۴۱).

۱-۴-۲-۳-سلول های بنیادی بالغ

سلول های بنیادی بالغ، سلول هایی تمایز نیافته اند که حضور آنها بین سلول های تمایز یافته بافت ها و اندام های مختلف مشخص شده است. این سلول ها از بافت های مختلف جدا شده اند و احتمالاً پتانسیل تمایزی آنها، وابسته به محیط و موضع آنهاست. این سلول ها ویژگی های اختصاصی ندارند، اما با تاثیر پذیری از سیگنالینگ ها خاص می توانند به سلول هایی با عملکرد تخصصی و ویژگی های فنوتیپی متفاوت از سلول های اجدادی اولیه تمایز یابند (۴۲).

این سلول ها در طولانی مدت می توانند بدون آنکه پیر شوند، سلول های مشابه خود را به وجود آورند. همچنین می توانند به یک سلول بالغ با ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی خاص تبدیل شوند. این سلول

¹ Inner cell mass

² Ectoderm

³ Mesoderm

⁴ Endoderm

ها پیش از تمایز کامل به سلول هدف، به نوعی از سلول های بنیادی بینابینی (پیش ساز^۱ و اجدادی^۲) تبدیل می شوند. هر چند باید توجه داشت که تعداد این سلول ها نسبت به سلول های بنیادی جنینی، بسیار کمتر است (۴۳، ۲۵).

همانگونه که گفته شد، سلول های بنیادی بالغ در تمام بافت های جانوری دیده شده اند که این امر سبب تفاوت در ویژگی های این سلول ها نسبت به یک دیگر می شوند. مغز استخوان^۳، خون محیطی^۴، طناب نخاعی^۵، پالپ دندانی^۶، عروق خونی^۷، عضله اسکلتی^۸، بافت چربی^۹، پوست^{۱۰}، قرنیه^{۱۱}، پانکراس^{۱۲}، کبد^{۱۳}، بافت جنینی^{۱۴}، صفاق^{۱۵}، ریه^{۱۶}، بافت اندومتر^{۱۷} و خون قاعدگی^{۱۸} از جمله بافت هایی هستند که می توانند منشا سلول های بنیادی بالغ باشند (۴۴).

مغز استخوان، در دسترس ترین و متداول ترین منبع سلول های بنیادی می باشد. سلول های بنیادی مغز استخوان، شناخته شده ترین سلول های بنیادی هستند و در کانون توجه محققان حیطه پزشکی بازساختی می باشند. مغز استخوان از دو سیستم اصلی بافت خون ساز و استرومای حمایت کننده از آن تشکیل شده است و شامل دو جمعیت اصلی از سلول های بنیادی می باشند که عبارتند از سلول های بنیادی خون ساز^{۱۹} (HSC) و غیر خون ساز که از بافت استرومایی مغز استخوان مشتق می باشد.

سلول های بنیادی خون ساز رده های مختلف سلول های خونی را ایجاد می کنند و توانایی ترمیم سیستم خون ساز را دارند. سلول های بنیادی غیر خون ساز (با منشا استرومای مغز استخوان) با ترشح فاکتورهای رشد و تماس سلولی از عملکرد سیستم خون ساز حمایت می کنند. این دسته از سلول های بنیادی که به رده های مختلف سلولی تمایز می یابند، سلول های بنیادی مزانشیمی^{۲۰} نامیده می شوند. این سلول ها نیز مانند تمام سلول های بنیادی، دارای توانایی خود نوزایی و قابلیت تمایز به بافت های مختلف مزانشیمی مانند استخوان، غضروف، چربی و عضله را دارند (۴۵).

¹ Progenitor cells

² Precursor Cells

³ Bone marrow

⁴ Peripheral blood

⁵ Spinal cord

⁶ Dental pulp

⁷ Blood vessels

⁸ Skeletal muscle

⁹ Adipose tissue

¹⁰ Skin

¹¹ Cornea

¹² Pancrease

¹³ liver

¹⁴ Fetal tissue

¹⁵ Peritoneum

¹⁶ lung

¹⁷ Endometrial tissue

¹⁸ Menstrual blood

¹⁹ Hematopoietic stem cells (HSC)

²⁰ Mesenchymal stem cells (MSC)

۱-۴-۲-۳-۱-سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs)

سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های بنیادی پرتوانی هستند و از بافت های چربی، مغز استخوان، ژله وارتون، استخوان، خون بند ناف و خون محیطی مشتق می شوند. آن ها همچنین برای القای بازسازی بافتی با جذب مستقیم در پزشکی باز ساختی مورد استفاده قرار می گیرد. سلول های بنیادی خون قاعدگی^۱ (MenSCs) به عنوان یک منبع غنی از سلول های بنیادی مزانشیمی مطرح هستند (۴۶، ۴۷).

۱-۴-۲-۳-۱-۱-سلول بنیادی مشتق از خون قاعدگی

در سال ۲۰۰۷، Meng و همکاران، برای اولین بار منبع جدیدی از سلول های بنیادی را از خون قاعدگی انسان به نام سلول های بازسازی کننده آندومتر شناسایی کردند (۴۸-۵۰).

تحقیقات در مورد پیوند سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به دلیل خواص این سلول ها از جمله خاصیت خود نوسازی، تمایز، رگ زایی، خاصیت ضد التهابی و تنظیم کنندگی ایمنولوژیکی در حال افزایش است. MenSC ها دارای مزایای بسیاری هستند، از جمله سهولت در جمع آوری، روش های جمع آوری غیرتهاجمی، ظرفیت های تمایزی فراوان، توانایی تکثیر سریع، پایداری ژنومی و نرخ تکثیر بالا بدون القای تومور یا ایمنی زا بودن. در نتیجه، سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی ممکن است منبع سلولی ایده آلی جهت استفاده در علم پزشکی باز ساختی باشد (۴۷).

اخیرا گزارش شده که با فراهم کردن شرایط کشت بهینه، MenSC می تواند در هر ۲۰ ساعت دو برابر شود، که این میزان دو برابر سریع تر از سرعت تکثیر BM-MSC در شرایط مشابه است. MenSC با طیف گسترده ای از سلول های ایمنی تعامل دارد و در تنظیم ایمنی سلولی و هومورال شرکت می کند. بیان MHC-I توسط MenSC نیز نشان دهنده توانایی آنها در تعدیل ایمنی است (۵۰).

۱-۴-۲-۳-۱-۱-۱-هویت MenSCs

MenSC ها توانایی بیان نشانگرهای سلول های بنیادی مزانشیمی نظیر CD73، CD90، CD105، CD49، CD44، CD29، CD9 و HLA-ABC را دارند. MenSC ها همچنین می توانند نشانگرهای سطحی سلول های بنیادی جنینی مانند Oct-4 و SSEA-3/4 و PDGFR- β را بیان کنند. اما توانایی بیان نشانگر های سطحی سلول های بنیادی خونساز (شامل CD19، CD34، CD45، و CD133) و HLA-DR را ندارند (۵۱، ۵۲).

۱-۴-۲-۳-۱-۱-۲-قدرت تمایزی سلول های بنیادی خون قاعدگی

برخی از مطالعات نشان دادند که MenSC ها توانایی تمایز به سلول های مختلف مانند چربی، استخوان ساز، کاردیوژنیک، غضروفی، کاردیومیوسیتی، عضلانی، نوروزنیک، شبه گلیال، اندوتلیال، شبه تخمک،

¹ Menstrual blood stem cells

گرانولوز، اپیتلیال تنفسی، بافت اپیتلیال کبدی، پانکراتیک و میوسیت ها را دارند (۵۳). محققان همچنین دریافته‌اند که MenSCها چند توان با پتانسیل تمایز به سلول‌های زایا، سلول‌های آندومتر و رده‌های سلولی اندوتلیال، استخوان‌ساز، چربی، قلب، اپیتلیال تنفسی، نوروسیتیک، غضروفی، میوسیتی، کبدی و پانکراس هستند (۵۴).

MenSCs ۱-۴-۲-۳-۱-۳-مکانیسم های درمانی

MenSC ۱-۴-۲-۳-۱-۱-۳-۱-۳-۱-۳-۱ اثرات یاراکر اینی،

۱-۴-۲-۳-۱-۱-۳-۱-۱-۳-۱-۱ اثرات رگ زایی

¹ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs)

در مطالعه ای ژانگ و همکاران مشخص کردند که محیط کشت رویی MenSCs نقش مهمی در رگزایی در موش ها دارند که با فعال شدن مسیرهای AKT و ERK و بیان بیش از حد برخی از عوامل مانند VEGFR1، VEGFR2، eNOS، VEGFA و TIE2inHUECs مرتبط است. مطالعات نشان داد که MenSC می تواند اندومتر آسیب دیده را بازسازی و اختلالات باروری را در موش ها درمان کند، که عمدتاً به رگزایی ناشی از مداخله MenSCs ها بستگی دارد (۵۹).

فیبروبلاست های استرومایی سلول های خون قاعدگی دارای اثرات تعدیل کنندگی ایمنی و همچنین دارای اثرات ضد التهابی هستند. MenSC ها می توانند آپوپتوز سلول های MLE-12 را از طریق کاهش بیان سایتوکان هایی مانند GM-CSF, GITR, RANTES, MIP-1 γ , eotaxin, MCP-5 و CCL1 که با واکنش های التهابی مرتبط هستند، سرکوب کنند (۴۷).

یافته ها نشان میدهد MenSC ها توانایی بیان نشانگر میوفیبروبلاست ها^۱ (α -SMA) را دارند که نشان دهنده فعالیت ضد فیبروتیک سلول های مذکور است. R. Y. Eremichev و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۸ انجام شد نشان دادند که کشت سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی با FBS منجر به بیان فاکتور های انتی فیبروتیک می شوند. این در حالی بود که کشت سلول های مذکور با PBS نتوانست منجر به بیان فاکتورهای آنتی فیبروتیک گردد (۶۰).

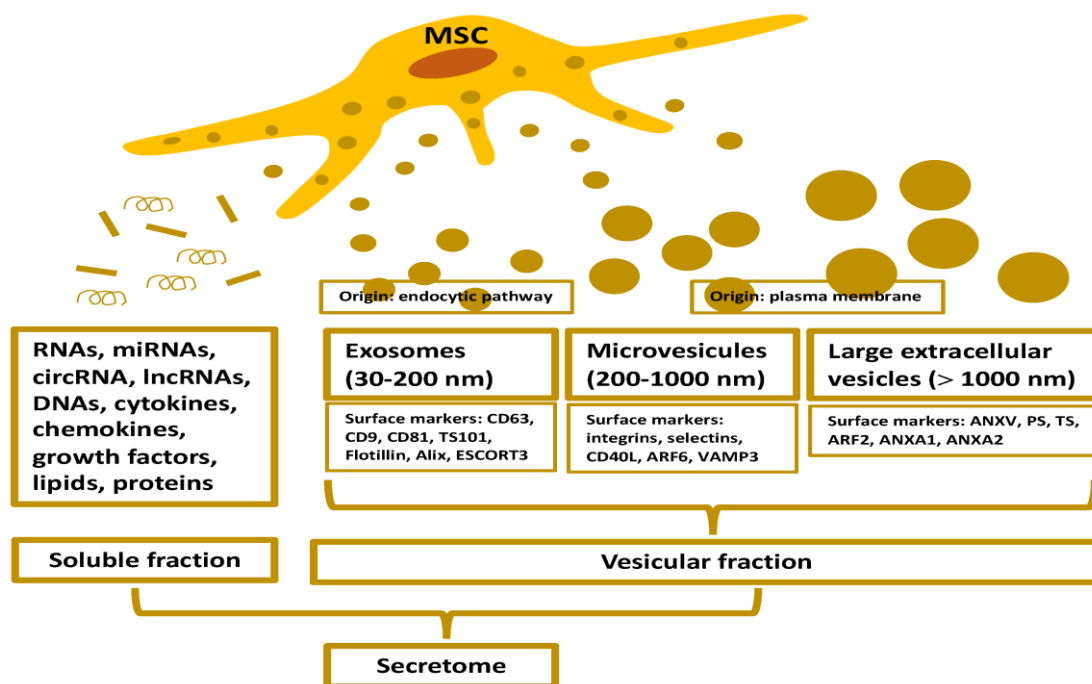
۱-۴-۲-۳-۱-۱-۳-۱-۴-۱ اثرات آنتی آپاپتوتیک

MenSC ها با ترشح سایتوکینین هایی نظیر ICAM-1، angiopoietin-2، Axl، angiogenin، IGFBP-6، osteoprotegerin و IL-6 و IL-8 موجب مهار آپوپتوز می شود (۶۲).

۵-۱- درمان عاری از سلول

۵-۱-۱- چالش های درمان با سلول های بنیادی

درمان با کمک سلول های بنیادی به دلیل توان تمایزی بالای آنها، همچنان در کانون توجهات باقی مانده است. با این حال، مطالعات جدید نشان داده اند که معمولاً کمتر از یک درصد از سلول های بنیادی مزانشیمی بیش از یک هفته متعاقب تجویز سیستمیک قدرت زنده مانی در بافت را دارند و اثر بخشی سلول های بنیادی بیشتر به واسطه فعالیت پاراکرین سلول ها و نه تمایز مستقیم آنهاست (۶۳، ۶۴). وزیکول های خارج سلولی^۱ (EVs) می توانند تقریباً توسط هر سلول یک ارگانیسم، از جمله سلول های بنیادی آزاد شوند و از طریق تحویل mRNA ها، لیپیدها و پروتئین های خود در ارتباط بین سلولی نقش دارند (۶۵). سکرئوم مشتق از سلول های بنیادی که در محیط کشت این سلول ها ترشح می شود، حاوی سایتوکین ها، فاکتور های رشد، اگزوزوم ها (قطر ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر)، میکرو وزیکول^۲ ها (MV) (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر)، اجسام آپاپتوتیک (۵۰ تا ۵۰۰ نانومتر) و ... می باشد (تصویر ۱-۳) (۶۶، ۶۷).



تصویر ۱-۳- ترشحات خارج سلولی MSC سکرئوم ها

خود اگزوزوم ها حاوی پروتئین، لیپید، قطعاتی DNA، microRNA و mRNA است. همچنین این ساختارها حاوی non-coding RNA نیز هستند. این ترشحات به دلیل نقششان، در سلول درمانی با به کار گیری MSC مورد بررسی قرار گرفته اند. این وزیکول ها در ارتباط سلول به سلول، پیام رسانی سلولی و تغییر متابولیسم سلولی یا بافتی در فواصل کوتاه یا طولانی در بدن نقش دارند. اگزوزوم ها و MV ها می توانند بر

¹ Extracellular vesicles

² Microvesicle

پاسخ بافت به آسیب، عفونت و بیماری ها تأثیر بگذارند. اگزوزوم های مشتق شده از MSC دارای محتوایاتی از جمله سیتوکین ها و فاکتورهای رشد، لیپیدهای سیگنال دهنده، mRNA ها و miRNA های تنظیمی می باشند. تا جایی که می توان از اگزوزوم های MSC در پزشکی بازساختی بدون مداخله سلول استفاده کرد (۶۷، ۶۸).

با این حال، محتویات اگزوزوم MSC های مختلف، یکسان و مشابه نیست، بلکه با توجه به منشأ بافتی که از آن MSC سرچشمه می گیرد، متفاوت است. با این حال، به نظر می رسد محتوای اگزوزوم تولید شده توسط سلول های بنیادی مزانشیمی هنگامی که این سلول های با سلول های تومور یا در ریزمحیط تومور کشت داده می شوند، تغییر می کنند. بنابراین، توجه دقیق به جزئیات در تولید اگزوزوم های MSC ممکن است یک الگوی درمانی جدید برای درمان های مبتنی بر MSC بدون سلول با کاهش خطرات مربوطه ارائه دهد (۶۹).

اصولا سلول های بنیادی به تغییرات محیطی و سیگنال های استرسی از بافت های آسیب دیده از طریق ترشح طیف وسیعی از فاکتورهای محلول پاسخ می دهند، به طور مثال Prockop و همکارانش در مطالعه ای در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که در پاسخ به هیپوکسی، سلول های MSCs تولید چندین فاکتور رگزا و ضد آپوپتوزی را افزایش می دهند، این عوامل شامل اینترلوکین-۶ (IL-6)^۱، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی^۲ (VEGF)، پروتئین کموتاکتیک مونوسیت و لیگاند کموکین^۳ (CCL2)، و استانیوکلکسین-۱^۴ (STC-1) می باشند (۷۰، ۷۱). در تایید این یافته ها مطالعات دیگری نشان داده اند که تحریک MSCs با سیگنال های متفاوت سیتوکین های التهابی شامل لیپوپلی ساکراید (LPS)، IL-1 β ، (IFN- γ)، و سرم حاصل از بیماران مبتلا به سندرم دیسترس تنفسی حاد موجب تحریک ترشح تعدیل کننده های ایمنی متفاوتی از جمله پروتئینی به نام ژن تحریک شده با TNF-6، پروستاگلاندین^۵ (PGE2)، ایندول آمین^۶ ۳و۲-دی اکسیژناز^۷ (IDO)، IL-10، آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین-۱^۷ (IL-1RA) می شود (۷۲-۷۴). در مطالعات اخیر سعی شده است به زوایای اثرات مختلف پاراکرین MSCs هم در برون تنی و هم در درون تنی پرداخته شود (۷۵، ۷۶). گزارشات حاصل از مطالعات نشان داده اند که فاکتورهای فعال زیستی این سلول ها در انجام اثرات متفاوت MSCs از جمله تعدیل سیستم ایمنی و پاسخ های التهابی، کاهش استرس های اکسیداتیو، فیبروز، آپوپتوز نقش مهمی ایفا می کنند. این فاکتورها رگزایی، پاکسازی باکتری ها، و بازسازی بافتی را تحریک می کنند. به علاوه، وزیکول های خارج سلولی متنوعی در محیط کشت این سلول ها ترشح می شوند که در پاسخ های درمانی این سلول ها نقش به سزایی دارند (۷۷، ۷۸). این وزیکول ها در سائزهای میکرو و نانو توسط یک غشای دولایه پوشیده شده اند که از طریق برهم کنش لیگاند-گیرنده یا با وارد شدن به سلول های هدف از

¹ Interleukin-6 (IL-6)

² Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

³ C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2)

⁴ Stanniocalcin 1 (STC-1)

⁵ Prostaglandin E2 (PGE2)

⁶ Indoleamine 2, 3-dioxygenase

⁷ Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA)

طریق اندوسیتوز، فاگوسیتوز، و فیوژن مستقیم به غشای سلول های هدف اثرات خود را اعمال می کنند (۷۹، ۸۰).

مطالعات اخیر نشان می دهد که سلول های بنیادی مزانشیمی همچنین وزیکول های خارج سلولی با اندازه های مختلف از جمله اگزوزوم هایی که حاوی mRNA های حامل، microRNA و پروتئین ها عمل می کنند را تولید و به قسمت های آسیب دیده بدن منتقل کرده و به این شکل موجب اثر گذاری خود می شوند تا کنون بیش از ۶۰۰ کارآزمایی بالینی در www.clinicaltrials.gov فهرست شده است که از MSC ها استفاده می کنند. استفاده گسترده از آنها در طیف گسترده ای از مدل های حیوانی علیه بیماری ها و همچنین ایمنی بخشی عالی آنها در سبب شده تا در علم پزشکی نیز جالب توجه به نظر بیایند (۸۱).

با این وجود، شناسایی مکانیسم های دقیق عملکردی این سلول ها در بیماران انسانی که جهت درمان یک بیماری مورد استفاده قرار می گیرند و یا اینکه در شرایط خاص تجویز می شود، همچنان نیازمند تحقیقات گسترده است (۸۲).

پیشینه تحقیق

۲-۱- مبانی نظری و مفهومی

۲-۲- مطالعات و پژوهش های علمی مرتبط

۲-۱- مبانی نظری و مفهومی

۲-۱-۱- استرس اکسیداتیو و ناباروری

نظریه موسوم به تاثیر رادیکال های آزاد بر ناباروری نشان می دهد ROS نقش اساسی در این فرآیند دارند. با این حال، ROS همچنین وظایف مهمی را به عنوان مثال در بلوغ اسپرم انجام می دهد. مطالعات نشان از رابطه سبک زندگی و باروری مردان به دلیل اثرگذاری استرس اکسیداتیو دارد. بدون شک ROS یک عامل ممانعت کننده مهم در رشد و عملکرد اسپرم های سالم و همچنین فرآیندهایی است که باروری را کاهش می دهد (۸۳).

C Wright و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی آسیب وارده به DNA اسپرم متعاقب تاثیر استرس اکسیداتیو پرداختند. آنها معتقد اند استرس اکسیداتیو علت اصلی تکه تکه شدن DNA در ناباروری مردان است اما ممکن است در بسیاری از موارد قابل کنترل باشد (۸۴).

Erfaneh Barati و همکاران در سال ۲۰۱۹، به بررسی رابطه OS و ناباروری در آقایان پرداختند. محققان این مطالعه دریافتند OS، عامل اصلی ناباروری مردان است. علیرغم نیاز به سطوح پایین ROS برای عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم، افزایش سطح آن، عملکرد اسپرم را مختل کرده و در نتیجه با مکانیسم هایی مانند پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب DNA منجر به ناباروری می گردد (۸۵).

ROS Chunfeng Qian و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه با هدف ارزیابی تاثیرات استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی بر مهار آپوپتوز و استرس اکسیداتیو بر روند اسپرم زایی در بیضه موش های مبتلا به مسمویت ناشی از بوسولفان دریافتند، ROS مستقیماً در آسیب اکسیداتیو نامطلوب ماکرومولکول های سلولی مانند پروتئین ها و اسید های نوکلئیک در سلول های زایا نقش دارد، که می تواند منجر به مرگ این سلول ها شوند. در واقع، تولید بیش از حد ROS و استرس اکسیداتیو متعاقب آن نقش مهمی در مهار رشد سلول های زایا دارد (۸۶).

۲-۱-۲- بکارگیری سلول های بنیادی در مدل های ناباروری مردان

۲-۱-۲-۱- سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال

۲-۱-۲-۱-۲- مطالعات حیوانی

Gunapala Shetty و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۲۱ انجام شد، مشاهده کردند پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال پس از بلوغ، سبب بازایی روند اسپرماتوژنز در میمون های رزوسی که تحت پرتودرمانی قرار گرفته بودند، شد (۸۷). همچنین این محقق و همکاران در مطالعه ی مشابهی دیگر در سال ۲۰۲۰، موفق به بازایی تولید اسپرم عملکردی پس از پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال در میمون های رزوس بالغی که تحت پرتودرمانی قرار گرفته بودند، شدند (۸۸).

Brian P. Hermann و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ای که با هدف بازیابی روند اسپرماتوژنز در بیضه های میمون رزوس های پرتودرمانی شده صورت پذیرفت، موفق به مشاهده اسپرم کاربردی متعاقب پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیاال شدند (۸۹).

Hossein Azizi و همکاران (۲۰۲۱) موفق به مشاهده بازیابی روند اسپرماتوژنز در موش های مدل آزواسپرمی غیر انسدادی متعاقب پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیاال شدند. نتایج این مطالعه تأیید کرد که zbtb16 در سلول های زایای تمایز نیافته واقع در غشای پایه لوله های اسپرم ساز بیضه ها و در سلول های بنیادی SSC در شرایط آزمایشگاهی بیان می شود. علاوه بر این مشاهدات، اسپرمزایی از سر گرفته شد. همچنین روند باروری به دنبال پیوند سلول های تمایز نیافته به موش های تحت درمان با بوسولفان مشاهده شد (۹۰).

همچنین Hiroshi Kubota و همکاران (۲۰۰۹) موفق به مشاهده اسپرم در موش های W^v/W^v پس از پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیاال شدند (۹۱).

Hiroko Morimoto و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹، دریافتند پس از پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیاال به لوله های اسپرم ساز موش های BDF1 مدل آزواسپرمی، SSC ها از طریق سد خونی بیضه^۱ (BTB) از بین سلول های سرتولی منتقل شده و در یک نیچ سلولی مستقر می شوند. همچنین مشاهده کردند که در نتیجه این روند، اسپرمزایی طبیعی نیز بازسازی می گردد (۹۲).

Lihua Dong و همکاران (۲۰۱۹) موفق به مشاهده سلول های شبه SSC دو هفته پس از پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیاال استخراج شده از بافت بیضه دو پسر مبتلا به کریپتوآرکیدیسیم دو طرفه به موش های نود آنابارور شدند (۹۳).

۲-۲-۱-۲- سلول های بنیادی جنینی

۲-۲-۱-۲- مطالعات حیوانی

Zohreh Makoolati و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند سلول های زایای مشتق از سلول های بنیادی جنینی پس از پیوند به بیضه موش های بالغ مبتلا به آزواسپرمی، اسپرماتوژنز را القا می کنند. بررسی ها نشان داد پس از پیوند سلول های مذکور، تعداد اسپرماتوگونی و وزن بیضه ها نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت (۹۴).

Celso Silva و همکاران (۲۰۰۹)، پس از کشت سلول های ESC که تحت درمان با اسید رتینوئیک آل ترانس^۳ و تستوسترون قرار گرفته بودند، موفق به مشاهده افزایش معنا دار بیان ژن های مربوط به سلول های زایای نر در شرایط آزمایشگاهی شدند. همچنین نتایج حاکی از تاثیر گذاری RA و تستوسترون بر این فرآیند بود (۹۵).

در مطالعه ای مشابه نیز Syed Mohmad Shah و همکاران (۲۰۱۷)، نشان دادند ESC ها توانایی بیان ژن های مرتبط با سلول های زایا را در شرایط آزمایشگاهی و در مواجهه با RA دارا هستند (۹۶).

¹ Blood Testis Barrier (BTB)

² Nude mice

³ All-Trans Retinoic Acid (RA)

Syed M. Shah نیز در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۶ انجام شده بود، در یافتند که سلول های ES می توانند با فعال سازی مسیرهای سیگنالینگ در حضور عواملی از محیط شرطی سلولی بالغ^۱، به سلول های زایا و گامت ها تمایز یابند. می توان نتیجه گرفت که محیط کشت سلول های بیضه^۲ (TCM) حاوی عواملی است که قادر به تمایز سلول های ES به اسپرماتوسیت ها و تخمک ها هستند (۹۷).

۲-۱-۲-۳- سلول های بنیادی پر توان القایی

۲-۱-۲-۳-۱- مطالعات حیوانی

دکتر Rahmania و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی پیوند iPSC موش به بیضه موش های مدل آزواسپرمی پرداختند. نتایج این مطالعه تمایز سلول های بنیادی شبه اسپرماتوگونیال را از iPSC ها نشان داد (۹۸). Olivier Botman و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی پتانسیل iPSC بر درمان ناباروری پرداختند. با توجه به آزمایشات پیش بالینی متعدد مشخص شد که iPSC ها به دلیل ظرفیت ترمیمی بافت می توانند بر رشد سلول های زایای انسان اثرگذار باشند و نقایص منجر به ناباروری برطرف سازند (۹۹). Cyril Ramathal و همکاران (۲۰۱۴)، پتانسیل درمانی پیوند iPSC های مشتق شده از مردان آزواسپرمی و بارور را پس از پیوند به لوله های اسپرم ساز موشی، مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های این مطالعه نشان می دهد که پیوند iPSCs انسانی، توانایی تمایز سلول های زاینده در موش های مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی را دارا می باشد (۱۰۰). Yong Zhu و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی پتانسیل بکارگیری iPSC در درمان ناباروری پرداختند. در این مطالعه مشخص شد سلول های iPS موش، پتانسیل تمایز به سلول های زایای نر را در محیط برون تنی دارند (۱۰۱).

۲-۱-۲-۴- سلول های بنیادی مزانشیمال

۲-۱-۲-۴-۱- سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در سال های اخیر استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی افق جدیدی در درمان بیماری های مختلف از جمله ناباروری گشوده است. مطالعات مختلف امکان تمایز این سلول ها را به سلول های مشابه سلول های زاینده تحت شرایط القا کننده مناسب همچنین انتقال به بافت های گنادی اثبات کرده اند. هرچند که اغلب مطالعات بر سلول های بنیادی مشتق از BM-MSCs و UC-MSCs صورت گرفته است و نقش این سلول ها در احیای اسپرماتوژنز به تایید رسیده است (۱۰۲).

¹ Cell-Conditioned Medium (TCM)

² Testicular cell-conditioned medium (TCM)

۲-۱-۴-۱-۱- مطالعات حیوانی

دکتر Alireza Abdanipour و همکاران (۲۰۱۹)، در مطالعه ای که در موش انجام شد، به بررسی BM- MSCs و تمایزشان به سلول های شبه زایای (germ-like) مردانه در کشت همزمان با سلول های بیضه پرداختند. یافته های این مطالعه نشان می دهد که کشت غیرمستقیم BM-MSCs با سلول های بیضه در حضور BMP4 باعث تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های شبه زایای مردانه (MG-LCs) بیان کننده ژن های Dazl و Stra8 می شود (۱۰۳).

دکتر Amin Tamadon و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی القای اسپرماتوژنز توسط سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان در همستر های آزواسپرمی شده توسط بوسولفان پرداختند. پیوند BMSCs سبب القای موفقیت آمیز اسپرمزایی در لوله های منی ساز همستر های مبتلا به آزواسپرمی گشت. بنابراین، سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می توانند کاندیدای جذابی در بیماران آزواسپرمی باشند (۱۰۴).

دکتر Amin Tamadon و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی القای اسپرماتوژنز پس از درمان با BM-MSCs در خوکچه های هندی آزواسپرمیک پرداختند. BMSCs در درمان خوکچه های هندی مبتلا به آزواسپرمی (القا شده با بوسولفان) موثر بودند و باروری در این حیوانات، پس از پیوند BMSCs مشاهده شد (۱۰۵). مطالعات مشابه توسط Rahmanifar و همکاران (۲۰۱۶) و Vahdati و همکاران (۲۰۱۷) بر روی BM-MSCs که به ترتیب در رت و همستر انجام شد نیز یافته های پیشین را بواسطه ی مشاهده ی سلول های اسپرماتوگونیا ل در لوله های سمینفروس گروه درمان شده با سلول بنیادی ثابت کرد (۱۰۶، ۱۰۷). دکتر Amal I Hassan و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه ای به بررسی اثرات درمانی BMSCs در برابر اثرات سمی سرب بر غدد جنسی موش های نر آزمایشگاهی پرداختند. این مطالعه ثابت کرد که وضعیت باروری موش های نر گروه تحت مواجهه با سرب پس از درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی بهبود یافته است. این نتایج نشان می دهد که سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند منبعی غنی و کاربردی برای درمان ناباروری باشند (۱۰۸).

Hassan و همکاران (۲۰۱۴) BM-MSCs را بر مدل های موشی که در معرض لید نیترا^۱ قرار گرفته بودند بررسی کردند. تزریق سلول های بنیادی سبب کاهش مالون دی آلدئید^۲ (MDA) بیضه ای و افزایش فعالیت CAT، SOD و GPx شد. همچنین درمان با سلول های بنیادی سبب افزایش میزان تستوسترون و بهبود تعداد و تحرک اسپرمها در مقایسه با گروه کنترل گردید (۱۰۸).

Sabaghi و همکاران (۲۰۱۲)، BM-MSCs برای ارزیابی توانایی این سلول ها در درمان ناباروری به رت های دارای تورشن بیضه تزریق کردند. اگرچه در این مطالعه پس از تزریق سلول اسپرماتوژنز در بیضه مشاهده نشد، اما بیان مارکرهای سلولهای زاینده OCT-4 و Vasa حاکی از آغاز تمایز به این سلول ها بود (۱۰۹).

¹ Pb(NO₃)₂

² Malondialdehyde (MDA)

دکتر HUA و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه ای به بررسی نتایج پیوند BM-MSCs بز جهت بازیابی اسپرماتوژنز در موش های فاقد سلول زایای جنسی پرداختند. در این مطالعه مشخص شد این سلولهای بنیادی پتانسیل تمایز به سلول های زایای نر را دارند و پیوند این سلول ها منجر به اسپرماتوژنیز در گیرندگان فاقد سلول های زایا می شود (۲۱).

Ghassemzadeh- Hassan kolaei و همکاران (۲۰۱۶) با تزریق BM-MSCs اتولوگ به بیضه رت های نابارور با بررسی های ایمونوهیستوشیمی حضور سلولهای بنیادی در بیضه و توان مهاجرت به غشای پایه ی لوله های سمینفروس و نیز تمایز به اسپرماتوگونی را بواسطه ی مشاهده ی افزایش مارکر های اسپرماتوگونی Dazl و Stella گزارش کردند (۱۱۰).

Mohammad Ghasemzadeh-Hasankolaei و همکاران در یک مطالعه (۲۰۱۶) قابلیت تمایزی سلولهای بنیادی مغز استخوان گوسفند را به سلول های زاینده مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که TGF- β 1 در تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به اسپرماتوگونی موثرتر از رتینویک اسید است و این سلول ها قادرند در لوله های سمی نفروس قرار گرفته و ایجاد کلنی کنند (۱۱۱).

Anand و همکاران (۲۰۱۶) تغییرات نیچ سلولی موش بواسطه تیمار با بوسولفان را بررسی کرده و اثر مثبت نیچ پیوندی شامل BM-MSCs و سلولهای سرتولی را گزارش کردند (۱۱۲).

Zhang و همکارانش (۲۰۱۴) با نشان دادن افزایش بیان مارکر های مولکولی سلول های بنیادی اسپرماتوگونیل و اسپرماتوگونی (Vasa, Stella, SMAD1, Dazl, GCNF, HSP90 α , integrin β 1, c-kit) اثبات کردند که انتقال BM-MSCs کشت داده شده همراه با سلول های سرتولی میتواند تمایز سلول های بنیادی به سلول های اسپرماتوژنیک را در رت های آژواسپرمی القا کند (۱۱۳).

۲-۱-۲-۴-۲-سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

۲-۱-۲-۴-۱-مطالعات حیوانی

دکتر Fereshteh Mehraein و همکاران در مطالعه ای به بررسی پتانسیل درمانی سلول های بنیادی مشتق از چربی دور چشم^۱ (OF-SCs) در موش های آژواسپرمی شده توسط بوسولفان پرداختند. نتایج فلوسایتومتری، ایمونوهیستوشیمی و آنالیز RT-qPCR در روز ۲۱ تمایز نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی تمایز نیافته، قادر اند به سلول های زایای نر تمایز یابند. علاوه بر این، پیوند این سلول ها، باعث بهبود اسپرماتوژنز در اکثر لوله های اسپرم ساز شد (۱۱۴).

Mehrabani و همکاران (۲۰۱۵) نتایج به دست آمده از مطالعه رت های آژواسپرمی القا شده توسط بوسولفان نشان داد که حضور سلول های زاینده اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرم را در مقاطع بافتی تهیه شده از لوله های سمی نفروس بیضه ی تیمار شده با سلول های مشتق از بافت چربی در مقایسه با نمونه کنترل نشان می داد (۱۱۵).

¹ Human orbital fat tissues (OF-SCs)

دکتر Fatma Y. Meligy و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی اثر درمانی ADSCs بر آسیب بیضه ای ناشی از سیس پلاتین در رت های نر بالغ پرداختند. بر طبق یافته های این مطالعه مشخص گردید این سلول ها می توانند از بیضه در برابر تغییرات آسیب زای ناشی از سیس پلاتین محافظت کنند و همچنین تزریق این سلولها منجر به بهبود ساختار بیضه و افزایش سطح تستوسترون در موش های آزواسپرمیک می شود (۱۱۶).

Karimaghai و همکاران (۲۰۱۸) از ADSCs در درمان همستر دچار اختلال آزواسپرمی (القا شده توسط بوسولفان) استفاده کردند که در مشاهده اسپرم در اپیدیدیم در مقایسه با بیضه های تیمار نشده نشان دهنده ی تاثیر سلولهای بنیادی استفاده شده در القای اسپرماتوژنز بود (۱۱۷).

در سال ۲۰۱۵ اثر سلول های مزانشیمی چربی انسان در رت های دچار تورشن بیضه مورد مطالعه قرار گرفت و کاهش آپوپتوز بوسیله ی آنالیز TUNEL assay و Western blot بر روی Caspase 3 و Bax اثبات گردید. همچنین آنالیز MDA نشان داد که این سلولها بطور قابل ملاحظه ای استرس اکسیداتیو را در بافت های بیضه ای آسیب دیده کاهش می دهند. بعلاوه افزایش سطح تستوسترون و نیز تعدیل سطح FSH که بواسطه ی آسیب بیضه افزایش یافته بود مشاهده شد (۱۱۸).

Cakici و همکارانش (۲۰۱۴) اثر انتقال ADSCs را بر ناباروری در رت بررسی کردند. آنها متوجه شدند که این سلول ها اسپرماتوژنز را در برخی از لوله های سمی نفروس رت های تیمار شده با بوسولفان احیا می کند. حضور سلول های VASA⁺/GFP⁺ و GFP⁺/SCPI⁺ در بیضه نشان دهنده ی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های اسپرماتوژنیک در یک ریز محیط بود (۱۱۹).

۲-۱-۲-۳- سلول های بنیادی مزانشیمی بندناف

۲-۱-۲-۳-۱- مطالعات حیوانی

Qian و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند سلول های بنیادی مشتق از مایع آمنیون انسان^۱ (hAFMSCs) با مهار آپاپتوز و استرس اکسیداتیو، اسپرم زایی را در موش های مدل آزواسپرمی، بازیابی می کنند. سلول های بنیادی مشتق از مایع آمنیون ممکن است رویکردی امیدوارکننده ای برای استفاده در پزشکی بازساختی باشد، زیرا این سلول ها می توانند اسپرم زایی را در مدل موش آزواسپرمی شده توسط بوسولفان بازگردانند و فعالیت در رده سلولی سرتولی این موش ها را با مقاومت در برابر آپاپتوز و استرس اکسیداتیو تسهیل کنند (۱۲۰).

در سال ۲۰۱۵ Chen و همکارانش با توجه به مشاهده ی بیان مارکرهای سلولهای زاینده از جمله VASA، c-kit و اینتگرین و نیز بررسیهای هیستولوژیکی نشان دادند که سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف توانایی تمایز به سلولهای مشابه سلولهای زاینده و نیز بهبود آسیب بافت بیضه را در موشهای تیمار شده با بوسولفان دارا هستند (۱۲۱).

Allah و همکاران (۲۰۱۷) قابلیت تمایزی سلولهای بنیادی مزانشیمی و هماتوپویتیک و سلول های تک لایه مشتق از خون بند ناف را مقایسه کردند سلولهای بنیادی مزانشیمی قابلیت احیای اسپرماتوژنز را در بیضه

¹ Human amniotic fluid mesenchymal stem cells (hAFMSCs)

ی مدل موشی از واسپر می بواسطه بوسولفان نشان دادند که این نتیجه در مورد دو منبع دیگر مورد مقایسه صدق نکرد (۱۲۲).

Yang و همکاران (۲۰۱۴) اظهار داشتند که انتقال^۱ UCSCs به بیضه ی موش تیمار شده با بوسولفان سبب افزایش بیان مارکرهای سلولهای زاینده می شود و سطح پروتئین های مربوط به ژنهای ویژه ی سلول های زاینده نظیر VASA، MIWI و SCP3 در بیضه های تزریق شده توسط سلول بنیادی افزایش نشان داد در نتیجه این سلول ها بعنوان گزینه ای مناسب جهت درمان ناباروری پیشنهاد داده شوند (۱۲۳).

۲-۲- مطالعات و پژوهش های علمی مرتبط

۲-۲-۱- بکارگیری سکر توم مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی در بهبود اختلالات ناباروری

مطالعات اخیر نشان داده که بخشی از اثرات درمانی سلول های بنیادی به واسطه ترشح فاکتور های پاراکرائینی از این سلول ها می باشد. سکر توم مشتق از MSC به دورن محیط کشت رویی این سلول ها در محیط آزمایشگاهی ترشح می شود (۸۰، ۱۲۴).

نکته قابل توجه دیگر آن است که استفاده از محیط کشت رویی عاری از سلول به جای سلول درمانی دارای مزایایی از جمله از بین رفتن امکان تومور زایی درونزاد ناشی از تزریق سلولی، ایمونوژنیستی کمتر و به حداقل رسیدن احتمال بروز آمبولی ریوی می باشد. همچنین از نظر تکنیکال نیز استفاده از محیط کشت رویی فوایدی همچون سهولت بسته بندی، نگهداری و ذخیره سازی آسان تر، هزینه تولید کمتر و فرآوری به صورت محصول قابل تزریق که قابل استفاده در شرایط اورژانس است، را خواهد داشت. در نتیجه این محیط کشت حاوی مقادیر فراوان کموکاین ها، سایتوکاین ها، فاکتور های رشد، mRNA و میکرو RNA، پروتئین ها، Non-coding RNA و ... می باشد که با عملکرد های ضد التهابی، احیاکنندگی و تعدیل کننده سیستم ایمنی هستند، از نظر ایمنی و پایداری نسبت به این سلول ها برتری دارند. بنابراین فرآورده های سلول های بنیادی می توانند بسیاری از چالش های درمانی در علم پزشکی را برطرف سازند (۱۲۵).

با این حال، توسعه و عملکرد بالینی آنها به دلیل فقدان مطالعات کافی جای بحث است. همچنین شایان ذکر است که هیچ دستورالعمل خاصی برای تجزیه و تحلیل قدرت محصولات مبتنی بر ترشح MSC وجود ندارد. با این حال، با جستجو در منابع می توانیم از مطالعاتی که در این حیطه انجام شده اند، بهره جویم.

۲-۲-۲- مطالعات حیوانی

۲-۲-۲-۱- مدل حیوانی ماده

Jichun Tan و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثرات درمانی اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی بر رت های مبتلا به نارسایی زودرس تخمدان^۲ (POI) پرداختند. در این مطالعه

^۱ Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs)

^۲ Premature ovarian insufficiency (POI)

مشخص شد قرار گرفتن در معرض MenSCs-Exos، باعث افزایش تکثیر سلول های گرانولوزا در فولیکول های آغازی و اولیه در شرایط آزمایشگاهی می شود (۱۲۶).

در سال ۲۰۲۱ در مطالعه مشابهی، Ayman Al-Hendy و همکاران به بررسی سکرئوم مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در موش های C57BL/6 مبتلا به POI متعاقب تزریق بوسولفان پرداختند. نتیجه حاصل از این مطالعه حاکی از اثر بخش بودن سکرئوم hMSC و افزایش تکثیر سلول های گرانولوزای انسانی (HGrC1) بود. همچنین محققان این مطالعه باور دارند درمان hMSC-CM می تواند زنده ماندن سلول های گرانولوزای تخمدان را افزایش دهد، ساختار تخمدان را بازسازی کند و سبب تحریک تولید استروژن گردد (۱۲۷).

۲-۲-۲-۲-۲ مدل حیوانی نر

Anna Monakova و همکاران در سال ۲۰۲۲ به بررسی اثر ترشحات پاراکراینی سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در مدل موش های نابارور با هدف بازیابی ترشح تستوسترون از سلول های لیدیگ پرداختند. نمونه های بافت چربی از ۸ اهدا کننده بین ۱۸ تا ۵۳ سال تهیه شد. به کار گیری سکرئوم مترشحه از سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، سبب افزایش ترشح تستوسترون در حیوانات مبتلا به ناباروری شد (۱۲۸).

Yi-ting Cai و همکاران مطالعه ای با هدف اثربخشی درمان متوالی ترشحات سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در موش های آزواسپرمی شده با بوسولفان، انجام دادند. محیط کشت BM-SCs یا محیط کشت سلول های ¹HEK-293 (CM-۲۹۳)، مورد استفاده قرار گرفت. موش های آزواسپرمی شده، ۲۰۰ میکرولیتر MSC-CM یا CM-۲۹۳ دو بار در هفته به مدت سه هفته متوالی به صورت داخل وریدی دریافت کردند. ارزیابی بافتشناسی، بازیابی اسپرماتوژنز، بیان ژنهای مرتبط با میوز و همچنین فاکتورهای عملکردی سد سلولی سرتولی پس از هشت هفته از آغاز درمان بررسی شدند. در گروه دریافت کننده BMSC-CM بیشترین کلنی سلول های اسپرماتوگونی مشاهده شد. اما هیچ اسپرماتیدی مشاهده نشد. بیان ژن های مرتبط با میوز شامل Dazl، Vasa، Miwi، Stra8، CyclinA1، Pdgfra، و Scp3 در بیضه حیوانات دریافت کننده BMSC-CM در مقایسه با گروه آزواسپرمیک به طور قابل ملاحظه ای بیشتر بود. همچنین سطوح فاکتورهای عملکردی سد سلولی سرتولی، شامل ICAM-1 و N-cadherin نیز به طور قابل توجهی در طول درمان با BMSC-CM افزایش یافت. نتایج نشان داد که ترشحات پاراکراینی MSC می تواند به طور قابل توجهی بازسازی ساختارهای اسپرماتوگونی در مدل های آزواسپرمی ناشی از بوسولفان را بهبود بخشد و سبب ترمیم ساختارهای توبولی شود (۱۲۹).

Efimenko و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه ای به بررسی اثرات تجویز ترشحات سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی پرداختند. این مطالعه بر روی رت های ویستار نر مبتلا به کریپتوآرکیدیزم دوطرفه به منظور بازیابی اسپرماتوژنز متعاقب تزریق سکرئوم AD-MSCs انجام شد. نتایج به دست آمده از موفقیت آمیز بودن بکار گیری ترشحات این سلول ها در بازیابی فرآیند اسپرماتوژنز حکایت داشت (۱۳۰).

¹ Human Embryonic Kidney (HEK) 293

در مطالعه مشابه دیگری، Anastasia Efimenko و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثرات پاراکرینی سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان را بر بازیابی روند اسپرماتوزن در مدل حیوانی مبتلا به کریپتوآرکیدیسم مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد سکر توم AD-MSC، باعث تحریک بازیابی نیچ های SSC می شود. در این بررسی با توجه به اثرات قابل مقایسه MSC و سکر توم MSC، عملکرد پاراکرین MSC ثابت شد. همچنین احتمال داده شد که بازیابی نیچ های سلولی توسط مدیاتورهای مترشحه از MSC و تاثیرشان بر اجزای مهم نیچ های SSC، از جمله سلول های لیدیگ و سرتولی باشد. روی هم رفته، داده های این مطالعه، نقش هماهنگ کننده MSC را در بازیابی سلول های بنیادی و اهمیت تحقیقات بیشتر در این زمینه را نشان داد (۱۳۱).

دکتر Amin Tamadon و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه ای به نتایج درمانی استفاده از AD-MSCs و BM-MSCs به منظور نشان دادن اثر محیط های کشت به جای استفاده از MSCs پرداختند. بازیابی اسپرماتوزن به طور موثری در لوله های منی ساز موش های آزواسپرمی القا شده با بوسولفان متعاقب تجویز BM-CM، AT-MSCs و BM-MSCs در هر سه گروه تحت درمان مشاهده شد. هر چند که نتایج حاکی از اثر بخش بودن درمان BM-MSCs نسبت به درمان های AT-MSCs و BMCM بود. آنالیز های هیستومورفومتری و فلوسیتومتری به وضوح نشان داده که بازیابی اسپرماتوزن با استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی از طریق دو مکانیسم بازسازی اسپرماتوگونی ها و همچنین تکثیر و تمایز اسپرماتوگونی ها در نتیجه استفاده از محیط کشت سلول های بنیادی مزانشیمی صورت می گیرد (۱۳۲).

در مطالعه دیگری اثر درمانی ADSC-CM بر روی تغییرات هیستوموفولوژیک بیضه مواجهه شده با بوسولفان در مدل موش مورد بررسی قرار گرفت. سی و پنج روز پس از تزریق بوسولفان، اسپرم و بافت بیضه برای مطالعات استریولوژیکی و مولکولی برداشته شد. در گروه بوسولفان به طور قابل توجهی کاهش حجم بیضه، بافت بینابینی، و لوله های منی ساز در مقایسه با گروه های دیگر مشاهده شد. اگرچه حجم بیضه برای گروه های دریافت کننده بوسولفان و ADSC-CM بدون تغییر باقی ماند، اما تعداد سلول های بیضه در گروه بوسولفان نسبت به سایر گروه ها کاهش یافت. در گروه دریافت کننده ADSC-CM تعداد سلول های بیضه در مقایسه با گروه بوسولفان به طور قابل توجهی افزایش داشت. تعداد و تحرک اسپرم و همچنین تراکم طول لوله های اسپرم ساز در گروه دریافت کننده ADSC-CM نسبت به گروه بوسولفان افزایش داشت (۱۳۳).

در سال ۲۰۱۸، Hongbo Wei و همکاران، پتانسیل درمانی اگزوزوم سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را در مدل حیوانی مبتلا به اختلال نعوض مورد ارزیابی قرار دادند. در این بررسی بازیابی عملکرد نعوظ در گروه دریافت کنند اگزوزوم مشاهده شد. درمان MSC-Exos به طور قابل توجهی محتوای ماهیچه صاف و میزان نیتریک اکسید سنتاز عصبی را در اجسام غاری افزایش داد (۱۳۴).

۲-۳-۳-کارآزمایی های بالینی

۲-۳-۱-در آقایان

در سال ۲۰۱۹، Nada Alaaeddine و همکاران به بررسی اثر AD-MSCs-CM پرداختند. نمونه‌های اسپرم از ۳۰ مرد سالم جمع‌آوری و به دو گروه non-stressed و H₂O₂-stress تقسیم شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از اهداکنندگان سالم تحت لیپوساکشن کشت داده شده و CM در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جمع‌آوری شد. هر دو گروه اسپرم با CM کشت داده شدند و پس از طی یک دوره زمانی، ارزیابی پارامترهای اسپرم انجام شد. در این مطالعه مشخص شد AD-MSCs-CM کیفیت اسپرم را بهبود می‌بخشد، در نتیجه می‌تواند در درمان ناباروری و متعاقباً افزایش نتایج IVF مورد استفاده قرار گیرد (۱۳۵).

۲-۴-۲-ملاتونین و نقش آنتی اکسیدانی

امروزه نقش آنتی اکسیدانی ملاتونین در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. این هورمون قادر به حذف رادیکال‌های آزاد بسیار واکنش پذیر از جمله OH- است. این هورمون به صورت اندوکراین از غده پینه آل ترشح شده و نقش تنظیمی در سیگنالینگ‌های سلولی دارد و همچنین دارای اثرات نروپروتکتیو است. R J Reiter و همکاران (۲۰۰۰) به بررسی اثرات ملاتونین در کاهش استرس اکسیداتیو پرداختند. آنان در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که ملاتونین اثرات آنتی اکسیدانی زیادی بر اشعه ماوراء بنفش و یونیزان، سموم شیمیایی و داروها دارد. محافظت آنتی اکسیدانی که توسط ملاتونین ایجاد می‌شود نیز در ارگانیزم‌های مختلف تک سلولی و پستانداران مشاهده شده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که مقاومت در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد یکی از ویژگی‌های ملاتونین در بسیاری از گونه‌ها و علیه بسیاری از رادیکال‌های آزاد و واکنش پذیر است (۲۰).

سطح هورمون ملاتونین در فصول مختلف و حتی در شبانه روز متغیر است. غده پینه آل نقش مهمی در تنظیم فعالیت اندوکرینی سیستم تولید مثلی انسان ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر نقش ملاتونین به دلیل دارا بودن گیرنده‌های ملاتونینی بر ساختارهای مختلف مانند مغز، شبکه، سیستم قلبی-عروقی بر آن تأثیر می‌گذارد و در تنظیم چندین فعالیت بیولوژیکی نظیر تنظیم روند خواب شبانه روزی نقش دارد (۱۹، ۲۰). همچنین ثابت شده ملاتونین در هومئوستاز و حفاظت سلولی نیز موثر است و سبب محافظت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از روند‌های اکسیداسیون، التهاب، آپاپتوز، ایسکمی و روند پیری می‌شود (۲۲).

ملاتونین همچنین سبب تنظیم فعالیت بیضه‌ها از طریق محور هیپوفیز-هیپوتالاموس می‌گردد و به علاوه دارای خواص ضد التهابی و پروليفراتیو است و سبب مهار موتاسیون DNA ناشی از آسیب اکسیداتیو می‌شود و در تخمدان و بیضه سبب کاهش بیان کاسپاز سه در مقابل آسیب داروهای شیمی درمانی می‌گردد. محققان بر این باورند که به دلیل وجود گیرنده‌های ملاتونین بر روی سلول‌های اپیدیدیم و اسپرماتوزا، احتمال می‌رود این هورمون دارای وظایف حفاظتی در ساختار لیپیدی غشای سلول‌های مذکور بوده و عملکرد میتوکندری‌های تاژک اسپرم و در نتیجه قدرت تحرک اسپرم‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۱۳۶).

H S Talpur و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۸ انجام شد به این نتیجه رسیدند که ملاتونین نقش مهمی در تنظیم و بازسازی و تمایز سلولهای بنیادی مختلف نظیر سلول های بنیادی مزانشیمی و اسپرماتوژنیک دارد (۲۳).

Ahmad و Haldar در سال ۲۰۱۰ ملاتونین را با دوز $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ به مدت ده روز به صورت داخل بیضه در سنجاب (*Funambulus pennanti*) تجویز کردند. نتایج مطالعه نشان داد که فعالیت $3\beta\text{-HSD}$ بیان Mel1aR در تیموس چک گردید علاوه بر آن، پارامترهای ایمنی جنرال نیز مورد بررسی قرار گرفتند. بیان AR ، ABP ، وزن بیضه، فعالیت $3\beta\text{-HSD}$ ، سطح تستوسترون و اسپرماتوژنز کاهش یافته بود اما بیان Mel1aR در تیموس بالا رفته بود و میزان بیان آن در بافت بیضه و ماکروفاژهای بیضه ای متعاقب تزریق قابل توجه بود. وزن بافتهای لنفاوی، تعداد لنفوسیت ها و پرولیفراسیون لنفوسیتها نیز در طحال، تیموس و ملاتونین سرمی و بیان IL-2 به دنبال تجویز داخل بیضه افزایش یافت. تجویز داخل بیضه ای ملاتونین سبب کاهش استروئیدوژنز با افزایش تاثیر ملاتونین بر روی عملکرد اندوکرین سلولهای لیدیگ شد. همچنین افزایش سطح ایمنی بیضه و ایمنی عمومی بدن نیز رخ داد (۱۳۷).

Ghasemi و همکاران در سال ۲۰۱۰ 10 mg/kg ملاتونین را به مدت پنج روز متعاقب تزریق بوسولفان به موشها تجویز کردند. نتایج مطالعه نشان داد که در گروههای دریافت کننده بوسولفان میزان آپاپتوز و اندیکس BrdU به ترتیب افزایش و کاهش یافته بود. در حالیکه دریافت ملاتونین سبب کاهش بروز پدیده آپاپتوز و همچنین تغییر در فعالیت پرولیفریشن جرم سل ها شد (۱۳۸).

Mirhosein و همکاران در سال ۲۰۱۴ دریافتند که در موشهایی که بوسولفان دریافت میکنند قطر لوله های سمینفر و طول لایه اپیتلیالی لوله ها کاهش قابل ملاحظه ای پیدا میکند. در مقابل در گروهی که ملاتونین را ۴۵ روز پس از دریافت بوسولفان به میزان 20 mg/kg به مدت ۲ ماه به صورت داخل صفاقی به آنها تجویز شد، میزان آپاپتوز کاهش یافته بود اما به طور کامل سبب مهار پروسه آپاپتوز نشده بود (۱۳۹).

علیرغم مطالعاتی که تا کنون بر روی درمان بواسطه ی سلول های بنیادی بوسیله منابع سلولی مختلف و اغلب در مدل های حیوانی صورت گرفته است هنوز نتایج قابل توجهی که از نظر کلینیکی قابل اجرا باشد حاصل نشده است. لذا بر آن شدیم با هدف معرفی منبع موثر عاری از سلول و عاری از محدودیت های ذکر شده در مقایسه با سایر منابع و حصول نتایج قابل گسترش در بالین و استفاده های کلینیکی در آینده و برداشتن گامی موثر در جهت درمان بیماران آژواسپرمی غیر انسدادی، اثر بخشی استفاده از سکروتوم استخراج شده از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی را در مدل های حیوانی آژواسپرمی مورد مطالعه و ارزیابی قرار دهیم. همچنین با توجه به نقش حفاظتی ملاتونین و همچنین وجود گیرنده های ملاتونینی در بافت بیضه، در تحقیق حاضر اثر تجویز ملاتونین اگزوزن نیز بر حفاظت و بازتوانی سلول های زایا بافت ژرمینال بیضه متعاقب شیمی درمانی با بوسولفان مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

مواد و روش تحقیق

۳-۱-اخلاق

۳-۲-جداسازی و کشت سلولهای بنیادی خون قاعدگی

۳-۳-ایجاد مدل آزواسپرمی

۳-۴-نحوه نمونه گیری و ارزیابی نمونه

۳-۵-ارزیابی هیستوپاتولوژیک

۳-۶-بررسی بیان ژن

۳-۷-آنالیز آماری

۳-۱-اخلاق

تمامی پروتکل های محتوی مداخلات درمانی بر روی حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل های انستیتوی بین المللی سلامت و ضوابط اخلاق مطالعه، با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی منطبق بر اصول اخلاق زیستی و حسب تایید کمیته اخلاق زیستی پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا (IR.ACECR.AEC.1401.009) بود. علاوه بر این و بر اساس نظارت تیم دامپزشکی، مراقب های لازم از حیوانات تحت تیمار را در نظر گرفته و از ورود حیوانات ناتوان و به مطالعه جلوگیری شد. همچنین در طول مطالعه تمامی حیوانات از دسترسی آزاد به آب و غذا برخوردار بودند.

۳-۲-جدا سازی و کشت سلولهای بنیادی خون قاعدگی

۳-۲-۱-فرآیند جمع آوری و ذخیره سازی سلولهای بنیادی مشتق از خون قاعدگی

نمونه سلول های بنیادین مشتق از خون قاعدگی از بین ده اهدا کنندگان زن ۴۵ - ۲۰ ساله و دارای سیکل قاعدگی منظم جمع آوری شد. موارد عدم پذیرش فرد جهت اهدای نمونه به شرح زیر بود:

- مصرف دخانیات و نوشیدنی های الکلی
- داشتن عفونت واژینال
- سابقه اندومتریوز یا کیست تخمدان
- داشتن بیماری خود ایمنی
- سابقه بدخیمی
- مبتلا به ویروس هپاتیت و ایدز
- داشتن بیماری های آلرژیک
- داشتن بیماری عصبی
- داشتن اختلال در زمینه اندوکرینولوژی مثل دیابت و تیروئید

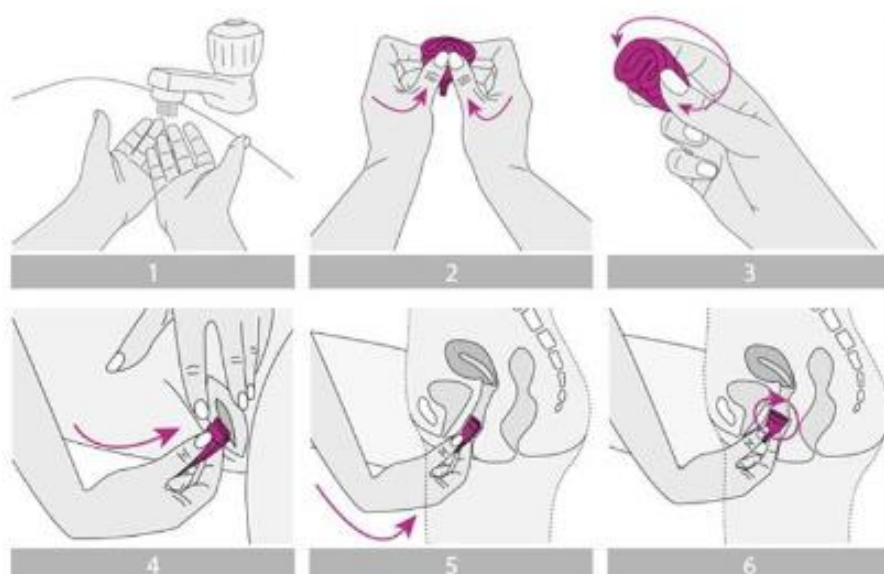
به هر اهدا کننده خون قاعدگی کیتی با محتویات زیر داده شد تا پس از جمع آوری نمونه خود، آن را به آسانی به آزمایشگاه منتقل نماید.

محتویات کیت شامل موارد زیر بود:

- دو عدد لوله محتوی بافر ضد انعقاد خون
- دو کیسه حاوی یخ خشک
- کاپ جمع آوری نمونه خون قاعدگی
- بروشور مربوط به دستورالعمل استفاده از کاپ خون قاعدگی
- CD مربوط به دستورالعمل استفاده از کاپ خون قاعدگی
- دو عدد دستمال مرطوب ضد عفونی کننده برای ناحیه واژینال
- کارت مربوط به اطلاعات فرد دهنده، تاریخ جمع آوری و دیگر جزئیات مربوطه
- نوار پارافیلیم
- فرم رضایت نامه

۳-۲-۲- دستورالعمل جمع آوری نمونه خون قاعدگی

- تخلیه مثانه قبل از گذاشتن کاپ در واژن
- داوطلب بعد از شستشوی دست ها، کاپ را توسط آب داغ شسته و سپس شبیه الگوی نمایش داده شده در تصویر شماره ۱-۳ دو طرف کاپ را فشار داده تا کاملا تا خورده و شکل U پیدا کند و بین دو انگشت نگهداری نماید.
- برای جا گذاشتن کاپ، داوطلب باید کاملا در وضعیت راحت که عضلات واژن ریلکس هستند قرار گرفته و سپس کاپ را از سمت لبه های تا خورده داخل واژن قرار دهد تا جایی که پایه کاپ تقریبا در فاصله 1.5 سانتی متری از داخل واژن قابل لمس باشد.
- بعد از گذشت ۸ ساعت جهت برداشتن کاپ به آرامی باید پایه کاپ کشیده شود و خون داخل کاپ داخل لوله محتوی بافر ضد انعقاد خون تخلیه شود (تصویر ۳-۱).



تصویر ۳-۱- نحوه جاگذاری کاپ در واژن

۳-۲-۳- انکوباسیون اولیه و جداسازی سلول های بنیادی

بلافاصله خون جمع شده به وسیله Diva cup جمع آوری و به لوله فالكون محتوی ۵ میلی لیتر PBS حاوی 0.5 EDTA میلی مولار، 100 µg/mL استرپتوماسین، 100 U/mL پنی سیلین، 2.5 µg/ml Fungizone منتقل شدند. سپس نمونه به اتاق کشت کلاس B در محل اتاق تمیز به منظور کشت و جداسازی انتقال داده شد.

در اتاق تمیز در زیر هود لامینار فلو، نمونه خون از لوله کونیکال به یک فلاسک کشت سلولی ۲۵ میلی لیتری منتقل می شد و به فلاسک کشت، محیط کشت DMEM-F12 تازه غنی شده با PL (لیزات پلاکت) اضافه می شد. سپس فلاسک درون انکوباتور CO2 دار با دمای ۳۷ درجه و منتقل شده و به مدت ۴ تا ۵ شبانه روز انکوبه می شد. در این فاصله هر روز کیفیت نمونه سلولی موجود در فلاسک ها از نظر ظاهری (تغییر رنگ به سمت تیره شدن محیط رویی، کدورت و استشمام بوی نامطبوع، تشکیل کلونی های باکتریایی یا قارچی) مورد بررسی قرار گرفت و در صورتی که تغییر رنگ یا بو و یا رشد میکروبی در محیط رویی رخ نداد کشت ادامه یافت. پس از گذشت ۵ - ۴ شبانه روز از انکوبه اولیه سلول ها، محیط رویی سلول ها تعویض شد و مورفولوژی و کلونوژنیسیته سلولهای چسبنده کنترل گردید. تعویض محیط کشت رویی هر ۴۸ تا ۷۲ ساعت تکرار شد تا سلول های شناور حذف شوند و جمعیت سلول ها چسبیده به سطح کف فلاسک به ۸۰٪ برسد. این مرحله معمولاً ۱۲ - ۱۴ روز طول می کشید.

۳-۲-۴- پاساژ سلول های بنیادی

با رسیدن تراکم جمعیت سلولی چسبیده به کف هر فلاسک به ۸۰٪ محیط کشت رویی سلول ها به طور کامل تخلیه و لایه سلولی را با بافر PBS شستشو داده می شد. برای آزادسازی سلول ها، از محلول

تریپسین / EDTA استفاده شد. سپس سوسپانسیون سلولی با سرعت 800 RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. پس از شمارش سلولی محتوی هر فلاسک به دو فلاسک تبدیل گردید و فلاسک ها در انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. در این مرحله هر ۴۸ تا ۷۲ ساعت یک بار محیط رویی سلول ها تعویض شد تا به تراکم مجدد ۸۰٪ سلولی برسند.

۳-۲-۵- کنترل کیفیت سلول های بنیادی

در این مرحله سلول های کشت داده شده مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند بدین صورت که محیط رویی سلول ها جمع آوری شد و مورد ارزیابی آزمون های استریلیتی و اندوتوکسین قرار گرفتند. در حین پاساژ سلولی، در حدود $10^5 \times 5$ سلول به فلاسک کشت استریل ۲۵ میلی لیتری دیگری انتقال داده شدند و پس از انکوباسیون مورد ارزیابی آزمون سنجش کنترل کیفی قرار گرفتند.

۳-۲-۶- منجمد کردن سلول های بنیادی

بعد از رسیدن تراکم سلولی فلاسک های حاوی سلول های پاساژ P1 به ۸۰٪، برای آزاد سازی سلول ها، از محلول تریپسین / EDTA استفاده شد. سپس شمارش سلولی و تعیین زنده مانی سلول ها انجام شد. براساس تعداد سلول ها تعداد کرایووئال مورد نیاز تعیین شد، به طوری که در هر میکروویال $10^6 \times 1,5$ سلول در محیط فریز شامل DMSO و سرم فریز شد. این ویال ها تا زمانی که نتیجه آزمون های کنترل کیفیت نمونه مشخص می شدند، قرنطینه ماند و از آنها استفاده ن شد.

۳-۲-۷- تست های Safety

۳-۲-۷-۱- سنجش استریلیتی محیط کشت:

آلودگی باکتریایی و قارچی سلول های پاساژ یک از طریق آزمون استریلیتی مورد ارزیابی قرار می گرفت و نتیجه آزمون استریلیتی نمونه بعد از ۱۴ روز از شروع آزمون گزارش شد.

۳-۲-۷-۲- سنجش اندوتوکسین:

سنجش آلودگی سطح اندوتوکسین در سلولهای پاساژ یک نیز گزارش شد.

۳-۲-۷-۳- سنجش مایکوپلازما:

سنجش آلودگی نمونه ها به مایکوپلازما از طریق روش غیرمستقیم PCR گزارش شد.

۳-۲-۸-خلوص/مشخصه یابی

۳-۲-۸-۱-میزان زنده مانی و رشد:

قبل از انجماد سلول ها، شمارش سلولی و تعیین درصد زنده مانی سلول ها انجام می شد. تعداد سلول های لازم برای فریز در هر ویال حداقل شامل 1×10^6 سلول زنده با میزان زنده مانی بیش از ۸۰٪ بود.

- سلول ها باید بعد از هر پاساژ بعد از ۳ - ۲ روز به تراکم سلولی ۸۰٪ می رسیدند.

۳-۲-۸-۲-:مشخصه یابی

- مورفولوژی سلول ها (شبه فیبروبلاستی) در زیر میکروسکوپ بررسی شد.
- برای تعیین فنوتیپ سلول ها، نتیجه بیان مارکرهاي سطحي CD90, CD44, CD73 و CD45 به روش فلوسایتومتری گزارش شد.

۳-۲-۸-۳- تست پایداری:

پایداری سلول ها در طول تکثیر و پاساژ از طریق بررسی کاربوتیپ کروموزوم های سلول ها ارزیابی شد. در صورتی که سلول های موجود در ویال های فریز شده ویژگی های ذکر شده در جدول ۳-۱ را احراز می نمودند، کیفیت لازم برای ادامه کار را دارا می بودند:

جدول ۳-۱- تست های کنترل کیفی

QC Tests	Assay	Acceptance Criteria
Sterility test	Bacteria/fungi	Not detected
Mycoplasma	PCR	Not detected
Endotoxin	Gel Clot	Not detected
Morphology	Visual assessment/ Photographic records	Spindle-Shaped Morphology
Cell count	Trypan Blue	1×10^6 viable cells after thawing
Viability	Trypan Blue	> 80% live before cells freezing
Cell recovery	Expansion and recovery of viable cells in cultures 2-3 days after passaging	Confluency > 80%
Karyotyping	G-banding	Normal Human karyotype 46XX
Phenotype	Flow cytometry	High Expression of CD90, CD73, CD44 Low Expression of CD45

۳-۲-۹-مراحل تهیه فرآورده سلولی

سلول ها در محدوده پاساژ ۳ - ۱ با تراکم سلولی ۸۰ - ۷۰ درصد و با شمارش سلولی ۷۰۰ - ۸۰۰ هزار سلول در هر فلاسک کشت T25 تحت ۵ سی سی محیط کشت DMEM-F12 GMP grade حاوی PL به

مدت ۲۴ ساعت بودند. سپس محیط کشت رویی دور ریخته شد و متعاقب سه بار شست و شو با PBS سلولها با DMEM-F12 بدون فنول رد در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از ترکیب و مخلوط کردن سکرتوم های حاصل از سلول های پنج فرد اهداکننده، فیلتراسیون ۰٫۲۲ mm syringe filter انجام شد و سپس سانتریفیوژ (2000 RPM) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. در نهایت پس از انجام آزمون های کنترل کیفیت بر روی محیط کشت رویی جمع آوری شده شامل تست اندوتوکسین، تست استریلیتی، تست میکوپلازما صورت گرفت.

۳-۳-۱ ایجاد مدل آزواسپرمی

۳-۳-۱-۱ پروتکل مطالعه

تعداد ۳۰ سر موش نر نژاد Balb/C با وزن تقریبی ۱۸-۲۰ گرم به به سن ۶-۸ هفته جهت انجام مطالعه از انیستیتوپاستور (تهران- ایران) خریداری شدند و پس از گذشت یک هفته از قرنطینه برای انجام مطالعات آماده بودند. همه حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذا و در شرایط دمایی (22±2°C) و رطوبت مناسب (55±5%) و در قفسهای مخصوص از جنس پلی کربنات نگه داری شدند. حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه (در هر گروه شش سر) تقسیم بندی شدند. در گروههای ۲ تا ۵، جهت القای آزواسپرمی دو تزریق درون صفاقی بوسولفان با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به فاصله ۲۱ روز انجام شد. با توجه به اینکه طول دوره اسپرماتوژنز در موش سوری حدود ۳۵ روز است، برای ایجاد بیشینه تخریب اسپرماتوژنز، روزی که تزریق دوم بوسولفان صورت پذیرفت، به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. ۳۵ روز پس از تزریق دوم بوسولفان، در گروههای ۴-۷، موشها تحت درمان با فرآورده مشتق از سلول بنیادی و/ یا ملاتونین قرار گرفتند.

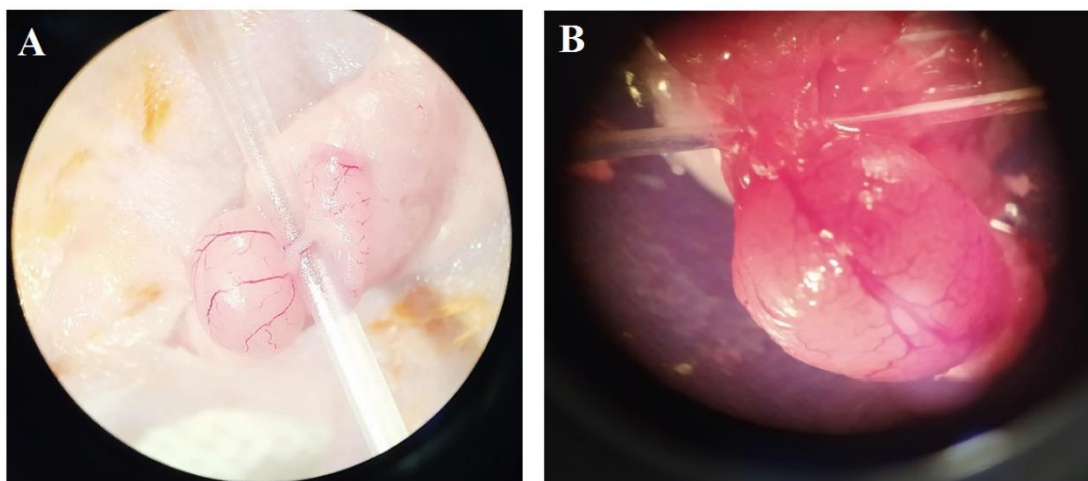
جدول ۳-۲- گروه بندی حیوانات آزمایشگاهی

شماره	نام گروه	نوع درمان
۱	Sham	—
۲	Azospermia	القای آزواسپرمی
۳	Azospermia+Melatonin	القای آزواسپرمی+دریافت ملاتونین
۴	Azospermia+Secretome	القای آزواسپرمی+دریافت کننده سکروتوم
۵	Azospermia+Melatonin+Secretome	القای آزواسپرمی+دریافت توامان ملاتونین+ سکروتوم

۳-۳-۲ نحوه تجویز سکروتوم مستخرج از سلول بنیادی مشتق از خون قاعدگی

در گروه های ۶ و ۷، ۳۵ روز پس از القای آزواسپرمی، پس از بیهوشی با کتامین (50-75 mg/kg) و مدتومدین (1 mg/kg)، تمام نواحی شکمی تراشیده و استریل شد و سپس در ناحیه شکمی موش ها برشی به

طول یک سانتی متر زده شد و بیضه های راست و چپ خارج شد. در هر بیضه به میزان حجم 10 µl سکروتوم به صورت آهسته به درون فضای رته تستیس تزریق شد (تصویر ۳-۲). سپس بیضه ها به درون ناحیه شکمی بازگردانده شدند و ناحیه شکمی بخیه شد. پس از آن نیز به صورت هفتگی میزان ۵۰۰ لاندا به صورت داخل صفاقی به مدت هشت هفته سکروتوم مشتق از سلولهای بنیادی را دریافت نمودند.



تصویر ۳-۲- (A) آماده سازی بیضه جهت تزریق، (B) پس از تزریق ده میکرولیتر سکروتوم مشتق از سلولهای بنیادی خون قاعدگی در داخل فضای رته تستیس

۳-۳-۳- نحوه تجویز ملاتونین

در گروههای ۳ و ۵، ملاتونین با دوز 8 mg/kg به صورت هفتگی و داخل صفاقی، متعاقب تایید القای آزواسپرمی به مدت ۸ هفته به حیوانات تزریق شد. در گروه ۳ نیز ملاتونین به مدت ۸ هفته به صورت هفتگی به حیوانات تزریق شد.

۳-۴-۳- نحوه نمونه گیری و ارزیابی نمونه

۳-۴-۳-۱- توزین موش ها و اندازه گیری اندیکس وزن بیضه

توزین موشها یکبار پیش از شروع مداخلات و یکبار پیش از یوتانازی انجام شد. اندیکس وزن بیضه نیز پس از یوتانازی بر طبق فرمول ذیل محاسبه شد:

$$\text{testis wet weight (mg)/body weight (g)} \times 100 \%$$

۳-۴-۳-۲- اخذ نمونه خون و جمع آوری سرم

برای اخذ خون و نمونه سرم ابتدا حیوانات با کتامین (50 mg/kg) بیهوش شدند. نمونه خون از قلب جمع آوری شد و سپس با کمک گاز C02 آسان کشی شد. جهت جداسازی سرم، پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ

با دور 3000×g در دمای چهار درجه سرم جدا شده و در فریزر منفی هشتاد جهت آنالیز سطوح FSH، Test و LH ذخیره شد. سپس حیوانات یوتانزی شده و نمونه های هردو بیضه خارج گردید. یک بیضه به محلول فرمالین بافر خنثی ۱۰ درصد جهت مطالعات هیستوپاتولوژی منتقل شد. بیضه دیگر پس از شست و شو و با PBS در فریزر منفی هشتاد جهت اندازه گیری سطوح بیان ژن ذخیره شدند.

۳-۴-۳-ارزیابی پارامترهای اسپرم

۳-۴-۳-۱-استحصال اسپرم

پس از یوتانازی، سپس محدوده زیر شکم حیوانات باز شد و مکان بیضه ها توسط بالشتک های چربی شناسایی شد. سپس توسط پنس و قیچی استریل دم اپیدیدیم از هر بیضه بریده شد و در پتری دیش استریل سریعاً به آزمایشگاه جنین شناسی منتقل شد. دم های اپیدیدیم در پتری دیش ۳,۵ سانتی متر فالكون حاوی یک قطره ۲۰۰ میکرولیتری محیط شست و شوی اسپرم (Ham's F10) و ۳,۵ میلی لیتر روغن مینرال سبک با گرید کشت جنین قرار گرفتند. سپس دم اپیدیدیم در زیر روغن توسط یک قیچی فاین برش خورد و مایع سیمن خارج شده از آن با قطره حاوی محیط شست و شو ترکیب شد. سپس نمونه ها برای مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، $CO_2:5.2\%$ و رطوبت ۹۹ درصد انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون حاضر در یک میکروتیوب ۰,۵ سی سی جمع آوری شد.

۳-۴-۳-۲-ارزیابی تعداد اسپرم

میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر ترکیب شد و پس از پیتاژ پی در پی، میزان ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام نئوبار قرار گرفت. سپس تعداد اسپرم های موجود در کوچکترین خانه از مربع شمارش گلبول های سفید برای ۵ خانه شمارش شد و میانگین ۵ خانه آن در عدد ۲۵۰,۰۰۰ و ضریب رقت (۱۰) ضرب شد. عدد بدست آمده بر اساس تعداد در میلی لیتر ثبت شد.

۳-۴-۳-۳-ارزیابی زنده مانی اسپرم

میزان ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم با ۳۰ میکرولیتر از رنگ اتوزین-نیگروزین مخلوط و به خوبی پیتاژ شد و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی یک لام شیشه ای قرار گرفت و یک لامل ۱۸*۱۸ بر روی آن قرار گرفت و با عدسی ۴۰ میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم هایی که رنگ اتوزین به خود گرفتند به عنوان اسپرم های مرده شمارش شدند. تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش گردید و سپس نتیجه به صورت درصد اسپرم های زنده اعلام شد.

۳-۴-۳-۴-ارزیابی مورفولوژی اسپرم

میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی یک لام شیشه ای قرار گرفت و سپس توسط لبه یک لام شیشه ای دیگر اسمیر تهیه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق خشک گردید. لام شیشه

ای حاضر به مدت ۵ دقیقه در الکل ۷۰ درصد و به میزان ۵ دقیقه در محلول رنگ همتوکسیلین قرار گرفت. سپس با جریان ملایم آب لوله شست و شو صورت پذیرفت. لام ها پس از خشک شدن توسط عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ و با استفاده از روغن مینرال مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتیجه به صورت درصد اسپرم های نرمال (نرمال از نظر سر، گردن و دم) اعلام گردید.

۳-۴-۵- آنالیز سطح سرمی هورمونهای LH و FSH

سطوح هورمونی در سرم با استفاده از رادیوایمونو اسی بر طبق پروتکل کارخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمام نمونه با دو بار تکرار بررسی شدند.

۳-۵- ارزیابی هیستوپاتولوژیک

۳-۵-۱- تهیه بلوک پارافینی

نمونه ها در محلول فرمالین بافر خنثی ۱۰٪ قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت محلول فرمالینی که بافت بیضه در آن قرار داشت تعویض شد. پس از گذشت ۴ روز از قرار گیری بافت در فرمالین برای تهیه بلوک پارافینی اقدام گردید.

برای تهیه بلوک پارافینی از بافت های قلبی مورد مطالعه، مراحل زیر طی شد:
در این مرحله نمونه بافت پس از فیکساسیون داخل دستگاه تیشو پروسسور گذاشته شدند. این دستگاه به صورت خودکار در چهار مرحله کار خود را انجام می دهد:

۱- مرحله فیکساسیون

۲- مرحله آبگیری

۳- مرحله شفاف کردن

۴- مرحله آغشتگی

بعد از انجام ۴ مرحله قبل قالب گیری انجام می شود و پس از قرار دادن بافت در داخل قالب آن را با پارافین مذاب پر کردیم. قالب به همراه بافت و پارافین مذاب به یخچال انتقال داده شد.

۳-۵-۲- برش بلوک پارافینی

پس از ساخت بلوک های پارافینی مرحله برش آنها به وسیله دستگاه میکروتوم دستی بشرح زیر است:
پس از قرار گیری بلوک پارافینی روی دستگاه میکروتوم زاویه تیغه بلوک را با تیغه میکروتوم محکم کردیم. سپس با چرخاندن دستگاه ابتدا با برش های ضخیم پارافین روی سطح بلوک برداشته شد. پس از تنظیم درجه میکرون دستگاه روی ۴ میکرون برش های پی در پی تهیه شد. برای باز شدن چین ها، برش ها به مدت چند ثانیه بر روی اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت چند ثانیه بر روی آب مقطر که توسط حمام بافتی به دمای ۴۲ درجه رسیده بود، شناور گردید تا کاملاً چین و چروک برش ها باز گردد. سپس یک اسلاید شیشه ای را برداشته و بطور زاویه دار داخل آب حمام بافتی فرو می بریم به نحوی که برش در وسط اسلاید قرار

گیرد. اسلاید را در جای مخصوص قرار داده تا خشک شود. سپس اسلاید را در زنبیل رنگ آمیزی قرار دادیم و بعد در فور با دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه قرار داده تا کاملاً بافت به سطح لام بچسبد.

۳-۵-۳- رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین

۱. مراحل انجام کار به شرح زیر بود:
۲. دو مرحله قرار گیری اسلایدها در گزلیل در هر مرحله به مدت ۱۰ دقیقه
۳. دو مرحله قرار گیری در الکل مطلق هر مرحله ۴ دقیقه
۴. دو مرحله قرار گیری در الکل ۹۶٪ هر مرحله ۴ دقیقه
۵. دو مرحله قرار گیری در الکل ۷۰٪ هر مرحله ۴ دقیقه
۶. شست و شو نمونه ها با آب شهری
۷. قرار گیری در رنگ هماتوکسیلین به مدت ۵ دقیقه به منظور رنگ کردن هسته ها
۸. قرار گیری در اسید الکل ۱٪
۹. شست و شو نمونه ها با آب شهری
۱۰. قرار گیری در ائوزین به مدت ۵ دقیقه
۱۱. دو مرحله قرار گیری در الکل ۷۰٪ هر مرحله ۲ دقیقه
۱۲. دو مرحله قرار گیری در الکل ۹۶٪ هر مرحله ۴ دقیقه
۱۳. دو مرحله قرار گیری در الکل مطلق هر مرحله ۴ دقیقه
۱۴. دو مرحله قرار گیری اسلایدها در گزلیل در هر مرحله به مدت ۱۰ دقیقه
۱۵. قرار دادن لامل

۳-۶- بررسی بیان ژن

پرایمرها برای ژن های منتخب با استفاده از سکانس بانک ژن طراحی شدند. سکانس پرایمرها به شرح ذیل می باشد (جدول ۳-۳):

جدول ۳-۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده

Primer	Primer Sequence	Product Size (bp)
Dazl-F	GACCGAAGCATACAGACAGTGG	165
Dazl-R	CCCTGAGATGAGTTAGCAGAGATG	
Vasa-F	GGGAGGCAGAAATACTCAAACCT	115
Vasa-R	TCTGATGAAGCTGAAGTCCTGTT	
Stra8-F	GCTCTTCAACAACCTAAGGAAGG	134
Stra8-R	CTTTGAGCTTCAGCAACTTATCCA	
Bax-F	CAATATGGAGCTGCAGAGGATGA	102
Bax-R	TTGAAGTTGCCATCAGCAAACAT	
Sycp3-F	ACTGTATTTACTCCTGCCCAAGG	100
Sycp3-R	ATCTTTAGATGTTTGCTCAGCGG	
B2M-F	ACTGACCGGCCTGTATGCTA	124
B2M-R	AATGTGAGGCGGGTGGTAC	

۳-۶-۱- گام اول - استخراج RNA:

پروتکل استخراج RNA طبق متد Bioneer:

گام اول در فرایند RT-PCR استخراج RNA از نمونه بافت ها می باشد. طبق پروتکل ذکر شده، به شیوه زیر عمل شد:

مرحله اول- جداسازی بافت، انتقال به میکروتیوب و اضافه کردن ۱۰۰۰ لاندا Accuzol

- از Accuzol جهت از بین بردن دیواره سلولی استفاده شد.
- جهت هموژن کردن نمونه، از Pellet pestel استفاده شد.

مرحله دوم- اضافه کردن Chloroform به میزان 20-25% میزان Accuzol

- در پروسه استخراج، با توجه به میزان هموژن شدن بافت، میزان کلرفرم مورد استفاده بین بازه تعریف شده، متغیر بود.

- کلرفرم به فنول موجود در لایزیز بافر Accuzol متصل شد و سبب رسوب pro ها شد.

- پس از تکمیل این مرحله، محلول موجود در میکروتیوب را ۲۰ مرتبه Up and down کردیم.

مرحله سوم- میکروتیوب حاوی آکواژول و کلرفرم را به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه کردیم. پس از

گذشت این مدت حالت دوفازی مشاهده شد.

مرحله چهارم- نمونه به مدت 15 دقیقه، 12000 RPM و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد.

مرحله پنجم- فاز آبی (Aqueous phase)، به میکروتیوب دیگری منتقل شد.

مرحله ششم- هم حجم فاز آبی، ایزوپروپانول به نمونه اضافه گشت.

مرحله هفتم- نمونه ۵ بار Up and down شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه به سردخانه منفی ۲۰ درجه

منتقل شد.

مرحله هشتم- در این مرحله نمونه به مدت 10 دقیقه، با دور 12000 RPM و در دمای ۴ درجه سانتی

گراد سانتریفیوژ گشت. در انتهای این مرحله و پس از اتمام سانتریفیوژ، RNA در پایین میکروتیوب و چسبیده

به دیواره پایینی مشاهده شد. سپس به آرامی شروع به خارج سازی ایزوپروپانول به گونه ای کردیم که به RNA استخراج شده، آسیبی وارد نشود.

مرحله نهم - پس از خشک شدن میکروتیوب حاوی RNA، نوبت به اضافه کردن اتانول ۸۰٪ به میزان ۱۰۰۰ لاندا رسید.

مرحله دهم - نمونه برای آخرین بار و به مدت ۵ دقیقه، با دور 12000 RPM و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گشت و سپس اقدام به خارج سازی اتانول از نمونه شد.

مرحله یازدهم - در این مرحله میکروتیوب به دقت و تماما خشک شد.

مرحله دوازدهم - در آخرین مرحله، به میکروتیوب DEPC-treated water اضافه شد (بسته به میزان

RNA استخراج شده، این میزان از ۱۵ لاندا تا ۳۰ لاندا متغییر بود). میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه روی Hot pellet تنظیم شده در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، قرار گرفت.

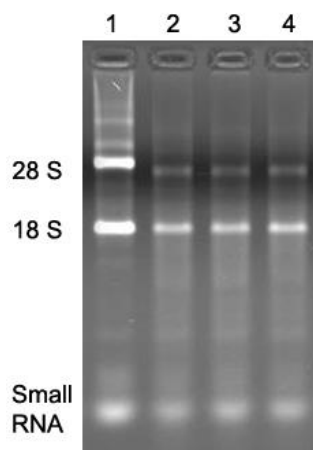
۳-۶-۱-۱-ارزیابی کیفیت RNA:

کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. غلظت و همچنین نسبت جذب نوری (OD_{۲۶۰}) به ۲۸۰ نانومتر مربوط به RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop ND-1000 (Wilmington, USA) تعیین شد. DNA و RNA در طول موج ۲۶۰ و پروتئین ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر جذب دارند. نکته دیگری که در استخراج RNA حائز اهمیت است، میزان پروتئینی است که به همراه آن استخراج می شود. جهت تعیین درجه خلوص RNA استخراج شده از نسبت جذب نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر استفاده می شود که بهترین نسبت بین ۱/۸ تا ۲ است. پایین بودن این نسبت نشان دهنده آلودگی با پروتئین است در غیر این صورت یک بار دیگر مرحله شستشو با اتانول ۷۵٪ انجام می گرفت.

به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. بدین منظور ژل آگارز ۱٪ با استفاده از بافر 1 × TBE^۲ و اتیدیوم برماید جهت رنگ آمیزی آماده شد. پس از آماده شدن ژل در تانک الکتروفورز قرار گرفت و تانک با بافر 1 × TBE پر شد، طوری که سطح ژل را بپوشاند. مقدار ۵/۰ از RNA با ۲ μl رنگ لودینگ با استفاده از سمپلر مخلوط شد و در چاهک ها لود گردید. ولتاژ دستگاه ۵ V/cm انتخاب شد و پس از این که رنگ لودینگ حدود ۴ سانتی متر از چاهک حرکت کرد، ولتاژ را قطع کرده و با استفاده از دستگاه UV Transilluminator، زیر نور فرابنفش عکس گرفته شد (تصویر ۳-۳)

^۱ Optical Density

^۲ Tris-Borate-EDTA



تصویر ۳-۳- بررسی کیفیت RNA استخراج شده از نمونه های بافتی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز. وضوح باندهای RNA ریبوزومی 28S و 18S در تمام نمونه ها نشان دهنده کیفیت خوب استخراج RNA است.

۳-۶-۱-۲- سنتز cDNA :

پس از تایید و بررسی کیفی نمونه های RNA، در مرحله بعد اقدام به تهیه cDNA با دو کیت ROJE و Thermo شد. سنتز cDNA بر طبق پروتکل های کیت های مذکور صورت پذیرفت که در زیر شرح داده خواهد شد.

پروتکل کیت ROJE:

طبق پروتکل این شرکت، مواد مورد نیاز جهت سنتز cDNA به شرح زیر می باشد:

۱. RNA الگو (RNA کل یا (Poly(A)mRNA) و سایر اجزای کیت، در میکروتیوب RNasefree مطابق جدول زیر مخلوط شد.

Component	Volume
Template RNA	1 ng -5μg
RTmix (2x)	10 μl
MixZyme	2 μl
RT-PCR Grade Water	Up to 20 μl

۲. مخلوط فوق، با ورتکس سریع مخلوط شد و سپس طبق برنامه دمایی توصیه شده، اقدام شد:

۳. انکوباسیون در دمای 25° سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

۴. انکوباسیون در دمای 47° سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه.

۵. انکوباسیون در دمای 85° سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. در آخر و پس از اتمام فرایند انکوباسیون، نمونه در دمای 4°C بر روی یخ خنک شد.

پروتکل کیت Thermo:

این پروتکل دو مرحله ای است:

مرحله اول - مطابق دستور زیر عمل شد:

۱. مواد زیر را به یک میکروتیوب RNase-free منقل کردیم.

RNA	1 µg
10X Reaction Buffer with MgCl ₂	1 µL
DNase I, RNase-free (#EN0521)	1 µL (1 U)
Water, nuclease-free	to 10 µL

۲. انکوباسیون نمونه 37° سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه

۳. انکوباسیون نمونه در 65° سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه

مرحله دوم - به نمونه تهیه شده در مرحله اول، مطابق دستور زیر مواد ذکر شده اضافه گردید:

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Oligo (dT)18 primer	1 µL
Random primer	1 µL
Total volume (First and second stage)	20 µL

برنامه دمایی مرحله دوم به شرح زیر می باشد:

۱. انکوباسیون نمونونه در ۲۵° سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

۲. انکوباسیون نمونه در 42°C به مدت ۶۰ دقیقه.

۳. انکوباسیون نمونونه در ۷۰° سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

پروتکل RT-PCR بر طبق اصول شرکت Ampliqon :

در مرحله آخر و جهت بررسی بیان ژن B2M مطابق دستور زیر عمل کردیم:

Master Mix	5 µl
Primer F (10 µM)	۰.۵ µl
Primer R (10 µM)	۰.۵ µl
PCR-grade H ₂ O	3 µl
cDNA	1 µl
Total Volume	10 µl

برنامه دمایی مطابق دستور زیر است:

Three-step PCR Program

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1a	15 minutes	95 °C
40	15 seconds	95 °C
	30 seconds	60 °C
	5 seconds	(B2M) °C ₇
		(Others) C 75°

۳-۱-۶-۳ PCR جهت بیان ژن ها

جهت بیان ژن مطابق دستور زیر عمل شد:

Master Mix	10 µl
Primer R ¹	0.4µl
Primer F ²	0.4µl
DDW ³	7.2µl
cDNA	2 µl
Total Volume	20 µl

ابتدا در میکروتیوب 0.2 µl Primer R, Primer F و Master Mix و DDW اضافه گشت. سپس به هر capillary tubes های 0.1 ml ، ۱۸ لانداز ترکیب ساخته شده اضافه گشت. در مرحله بعد اقدام به اضافه کردن cDNA های نمونه های مورد نظر شد. در ادامه با تکان دادن capillary tubes ، حباب های هوا از بین رفت و نمونه ها به دستگاه RT-PCR منتقل گشت. لازم به ذکر است برای هر کد نمونه، دو سمپل در نظر گرفته شد.

تنظیم برنامه دمایی مطابق دستور صورت پذیرفت:

Description	Duration of cycle	Temperature
Holding	15 minutes	95 °C
Denaturation	15 seconds	95 °C
Annealing	30 seconds	60 °C
Extension	5 seconds	75 °C

¹ Revers

² Forward

³ Double Distilled Water

۳-۷-آنالیز آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار R (Version 4.2.2) و پکیج Rstatics برای آنالیز دیتاها و همچنین پکیج ggplot-2 بای مصور سازی دیتاها انجام شد. آنالیزهای آماری با استفاده از تست ANOVA و Post-hoc-Tukey HSD انجام گردیده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

۴-۱- مقدمه

۴-۲- نتایج مطالعات درون تنی

۴-۳- آنالیز پارامترهای اسپرم

۴-۴- نتایج تغییرات سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون ، LH ، FSH

۴-۵- تغییرات هیستوپاتولوژی

۴-۶- نتایج مولکولی

۴-۱-۱- مقدمه

۴-۱-۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادین مشتق از خون قاعدگی

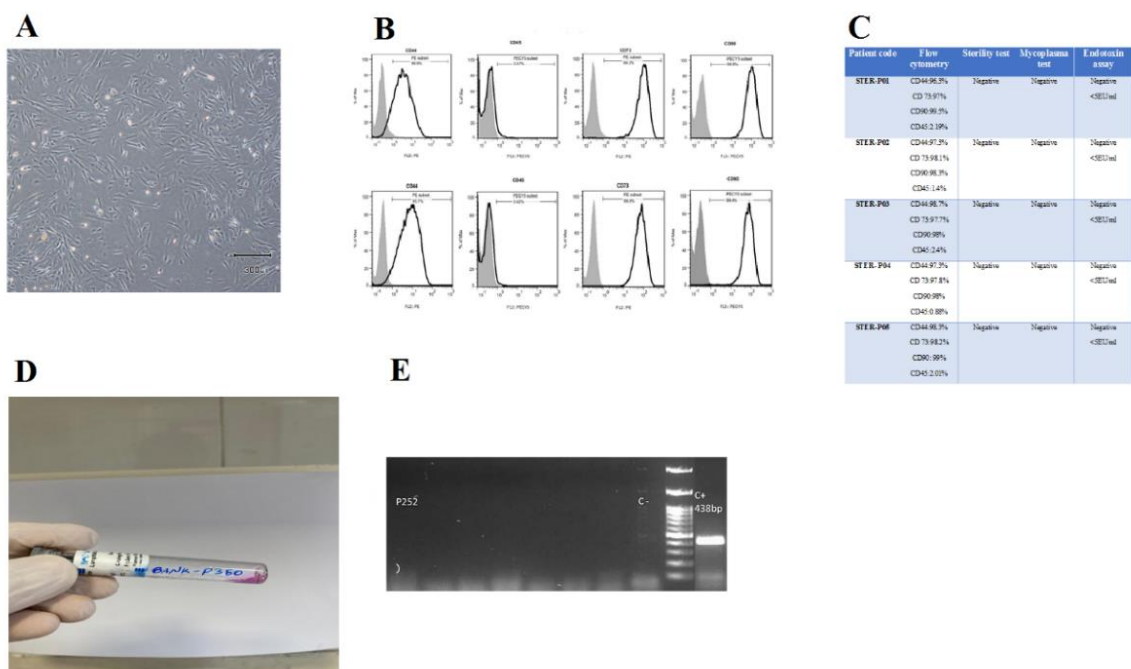
سلول‌های بنیادین خون قاعدگی پس از یک شبانه روز به کف فلاسک می‌چسبند. این سلول‌ها قادر به تشکیل کلنی بوده و پس از یک الی دو بار پاساژ کشیده تر می‌شوند و ظاهری فیبروبلاستی پیدا می‌کنند. بعد از حدود ۱۰ روز ۷۰ الی ۸۰ درصد فلاسک را پر می‌کنند بطوریکه پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد نیاز به ۲ بار پاساژ این سلول‌ها در هفته می‌باشد و سلول‌های بنیادین خون قاعدگی مورفولوژی دوکی شکل خود را در پاساژهای بالا نیز حفظ می‌کنند (تصویر ۱-۳).

۴-۱-۲- بیان شاخص‌های اختصاصی سلول‌های بنیادین

نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان می‌دهد که بیان مارکرهای CD73، CD90 و CD44 در سلول‌های بنیادین خون قاعدگی به صورت قابل توجهی اتفاق می‌افتد. این در حالیست که بیان مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیتیک از جمله CD45، در این سلول‌ها بیان قابل توجهی نشان ندادند. سلول‌های MenSCs و حذف سلول‌های هماتوپوئیتیک در طی جداسازی سلول‌های مزانشیمی از خون قاعدگی می‌باشد (تصویر ۴-۱).

۴-۱-۳- نتایج بررسی کنترل کیفی

تمام سلول‌های کشت داده شده الگوی کاریوتیپ نرمال داشتند و هیچگونه شواهدی مبنی بر رشد میکروبی وجود نداشت و استریلیتی سلول‌ها در تمام کشت‌ها تأیید شد. از نتیجه رنگ آمیزی گرم هیچ گونه تشکیل کلنی مشاهده نشد. به علاوه تمامی نمونه از نظر بین ژن مایکوپلاسما مورد بررسی قرار گرفتند و بررسی اندوتوکسین نیز نشانه دهنده عدم تشکیل کلات بود (تصویر ۴-۱).

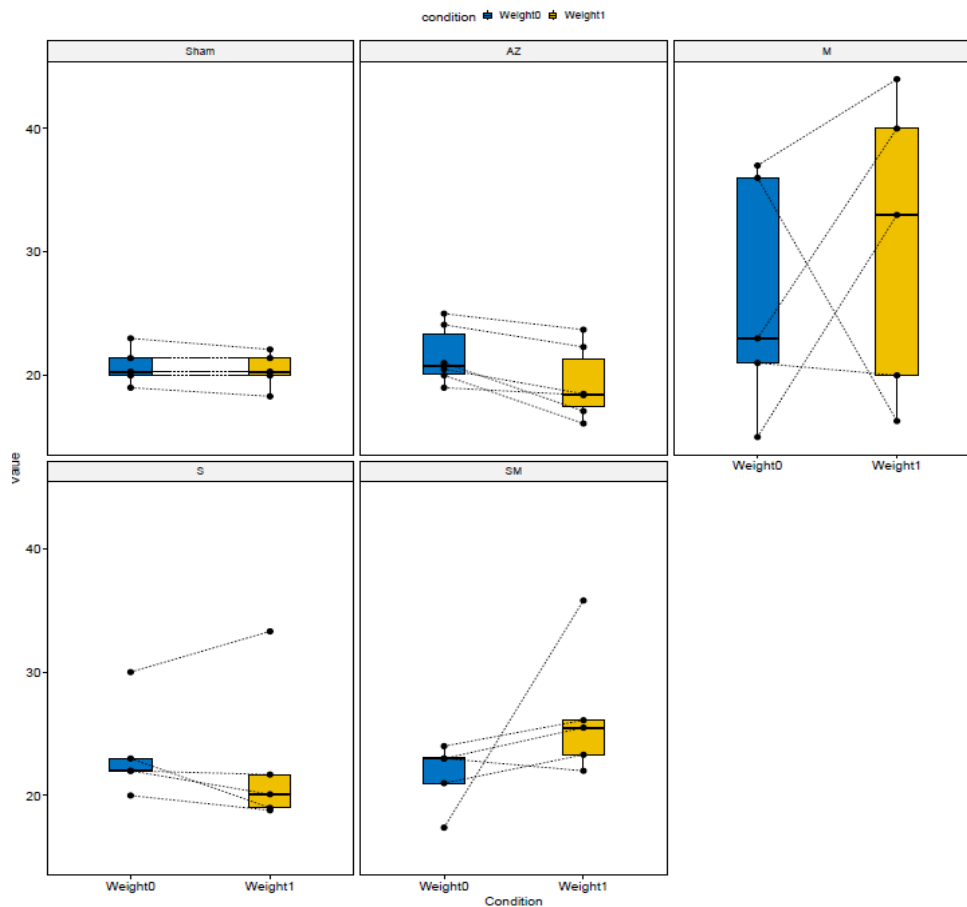


تصویر ۴-۱- (A) مورفولوژی سلولهای کشت داده شده بیماران در پاساژ اول (Scale bar: 300 μ m). (B) ایمونوفلورسانس سلولهای بنیادین خون قاعدگی. مربوط به دو اهدا کننده. این سلول ها مارکرهای سلول های بنیادین مزانشیمی را بیان کرده ولی قادر به بیان مارکرهای هماتوپوئیتیک نمی باشند. (C) نتایج تستهای کنترل کیفی سلولهای جمع آوری شده از اهداکنندگان. (D) پاسخ منفی تست اندوتوکسین (عدم تشکیل ژل کلات) سلولهای کشت داده شده. (E) عدم بیان ژن مایکوپلاسما در سلولهای کشت داده شده اهدا کنندگان

۲-۴- نتایج مطالعات درون تنی

۲-۴-۱- تغییرات وزن بدن

همانگونه که در تصویر ۲-۴ مشخص است درصد تغییرات وزنی (درصد تغییرات وزنی پیش از شروع مطالعه (W0) و وزن پیش از یوتانازی (W1) در گروه ۳ (دریافت کننده ملاتونین) و در گروه ۵ (دریافت کننده سکروتوم-ملاتونین) مثبت بود. در گروه ۴ (دریافت کننده سکروتوم) درصد تغییرات وزنی پس از مداخله نسبت به پیش از مداخله منفی بود. این درحالیست که در حیوانات مبتلا به آواسپرمی غیر انسدادی، کاهش وزن مشهود بود.

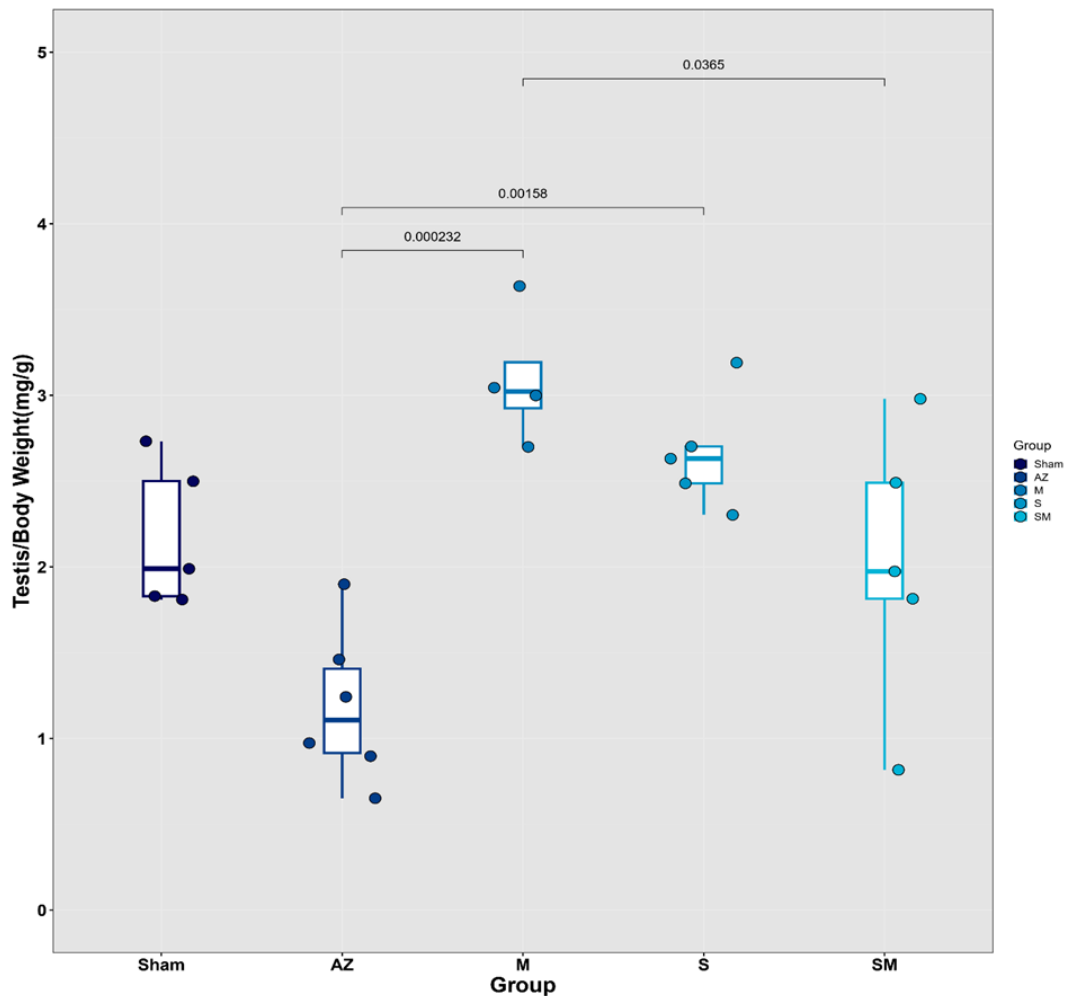


تصویر ۲-۴- درصد تغییرات وزنی در گروه های مختلف

Sham: شام، AZ: آواسپرمی، M: ملاتونین، S: سکروتوم، SM: سکروتوم-ملاتونین

۴-۲-۲- تغییرات اندیکس وزن بیضه

همانگونه که در تصویر ۳-۴ مشهود است بکارگیری ملاتونین و سکروتوم سبب بهبود اندیکس بیضه در حیوانات مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی گشت (به ترتیب $P=0.0000232$ و $P=0.00158$). همچنین افزایش اندیکس وزن بیضه در حیواناتی که ملاتونین دریافت کرده بودند نسبت به گروه دریافت کننده توامان سکروتوم-ملاتونین به طور معناداری بیشتر بود ($P=0.0365$).

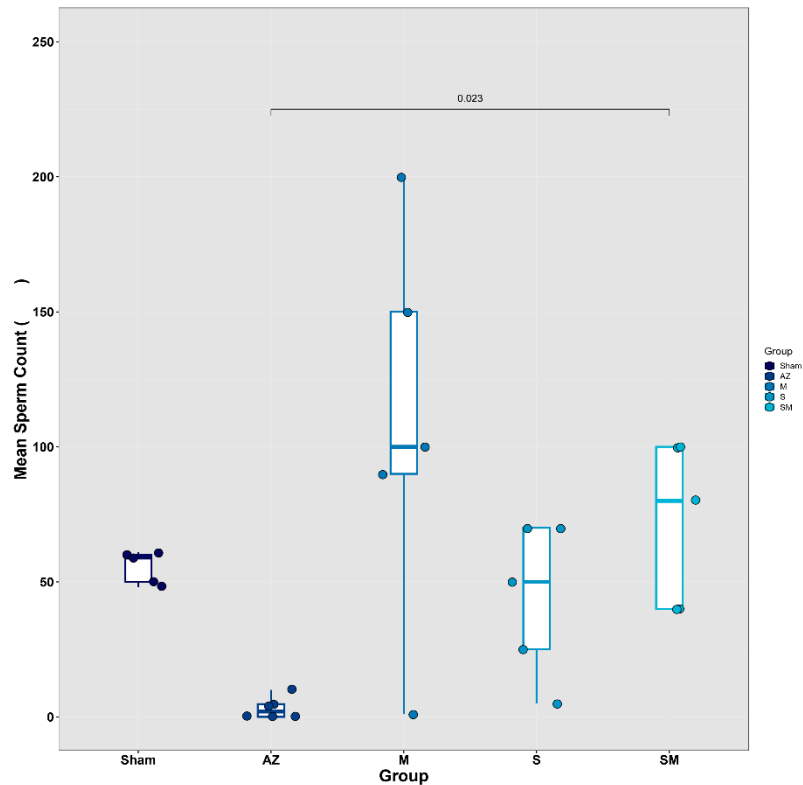


تصویر ۳-۴- مقایسه اندیکس وزن بیضه در گروه های مختلف
Sham: شام، AZ: آزواسپرمی، M: ملاتونین، S: سکروتوم، SM: سکروتوم-ملاتونین

۴-۳-آنالیز پارامترهای اسپرم

۴-۳-۱-غلظت اسپرم

مطابق تصویر ۴-۴، تجویز سکروتوم، ملاتونین و همچنین تجویز توامان سکروتوم-ملاتونین سبب افزایش غلظت اسپرم در حیوانات مبتلا به آذواسپرمی غیرانسدادی گشت هرچند که این افزایش تنها در گروه دریافت کننده توامان سکروتوم-ملاتونین معنادار بود ($P=0.023$).

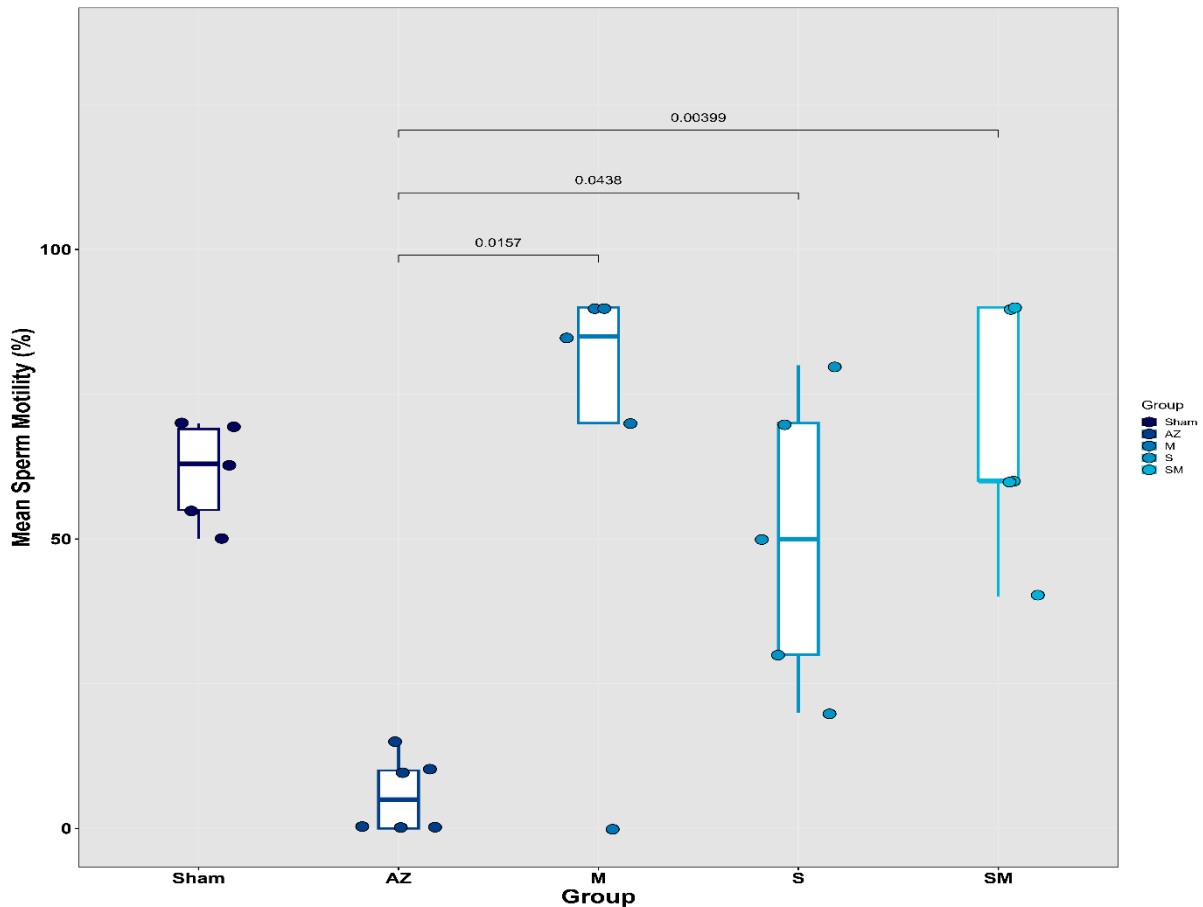


تصویر ۴-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر روی غلظت اسپرم

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

۴-۳-۲- تحرک اسپرم

مطابق تصویر ۴-۵، نتایج نشان دهنده این مساله بود که تجویز ملاتونین، سکروتوم و تجویز توامان سکروتوم-ملاتونین سبب افزایش قابل توجه در تحرک اسپرم ها شد (به ترتیب $P=0.0039$, $P=0.0438$, $P=0.0157$).

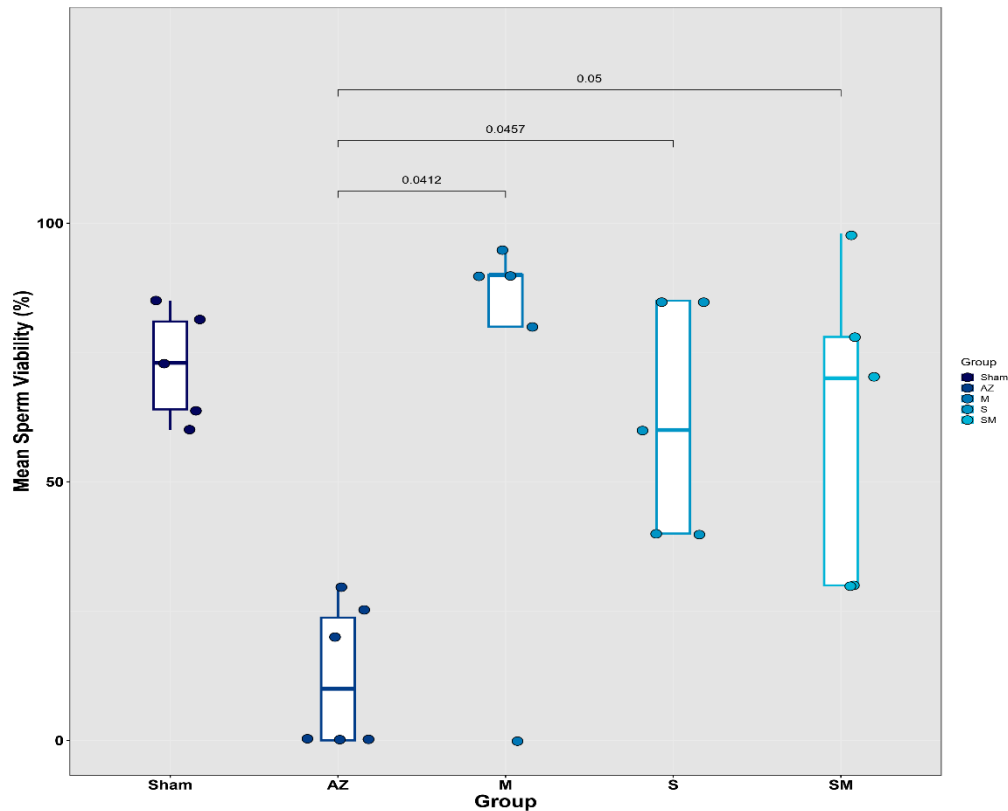


تصویر ۴-۵- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم-ملاتونین بر تحرک اسپرم ها

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

۴-۳-۳- زنده مانی اسپرم ها

مطابق تصویر ۴-۶، از نظر زنده مانی اسپرم ها نیز تجویز ملاتونین، سکروتوم و دریافت توامان سکروتوم-ملاتونین سبب افزایش میزان زنده مانی اسپرم ها به طور معنادار شده بود (به ترتیب $P=0.05$ ، $P=0.0457$ ، $P=0.0412$).

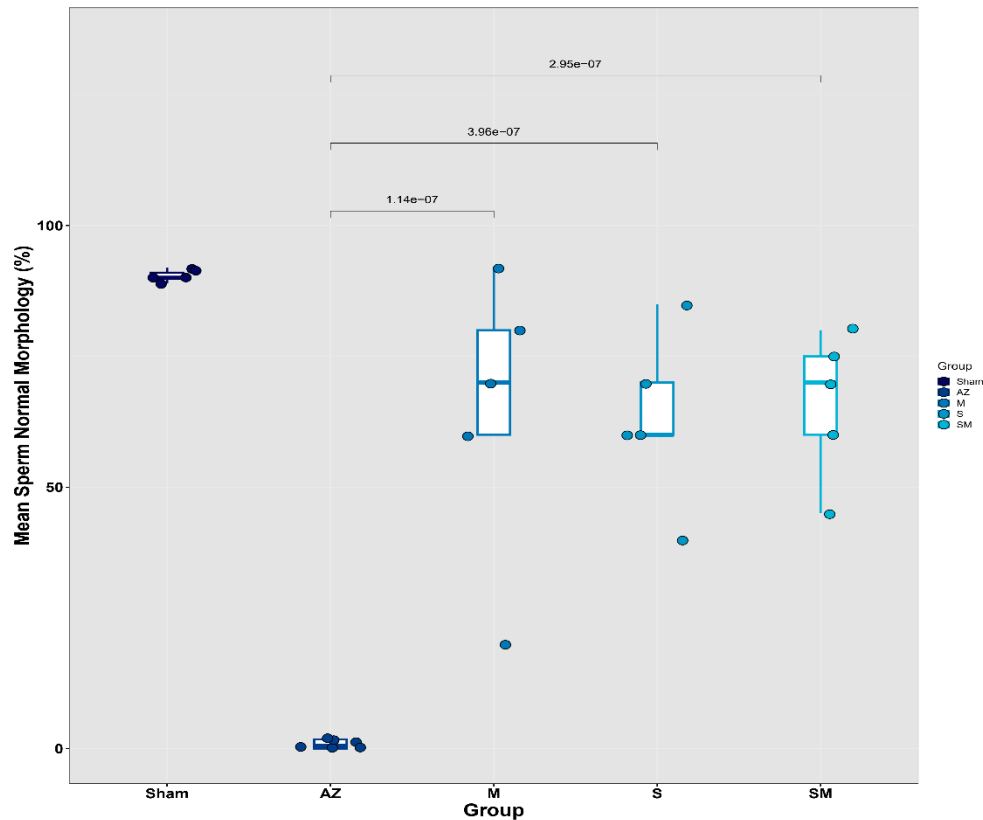


تصویر ۴-۶- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم-ملاتونین بر موفولوژی اسپرم ها

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

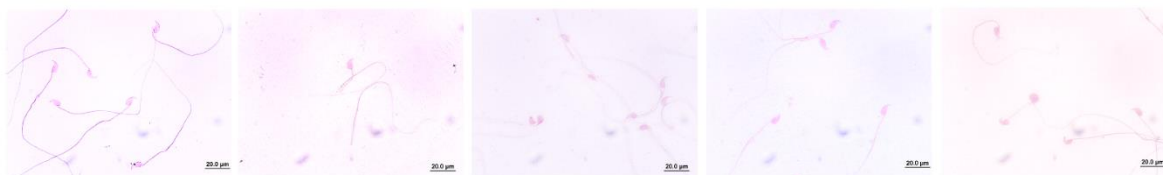
۴-۳-۴- مورفولوژی اسپرم ها

با توجه به تصویر ۷-۴ و ۸-۴، تجویز ملاتونین، سکروتوم و دریافت توامان سکروتوم-ملاتونین سبب بهبود مورفولوژی اسپرم ها به طور قابل توجهی شده بود. (به ترتیب $P=1.14 \times 10^{-7}$ ، $P=3.96 \times 10^{-7}$ ، $P=2.95 \times 10^{-7}$)



تصویر ۷-۴- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم -ملاتونین بر مورفولوژی اسپرم.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.



تصویر ۸-۴- تصاویر اسپرم های رنگ آمیزی شده با اتوزین نیگروزین در گروه های Sham: شم، AZ: آزواسپرمی، M: ملاتونین، S: سکروتوم، SM: سکروتوم-ملاتونین (Scale bar: 20 μm)

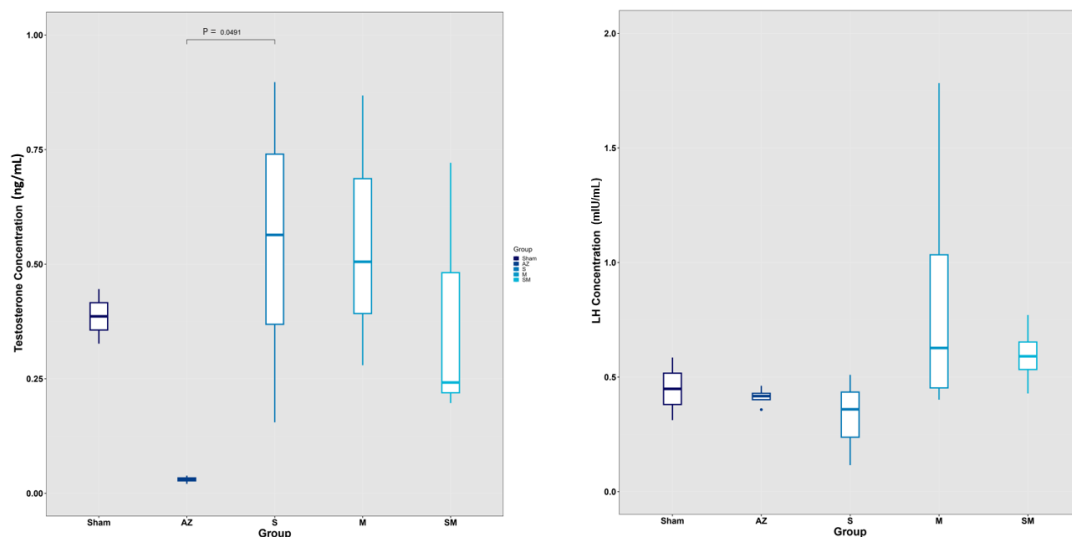
۴-۴-نتایج تغییرات سطح سرمی هورمون های تستوسترون ، LH ، FSH

۴-۴-۱-تغییرات سطح سرمی هورمون LH

آنالیز سطح سرمی هورمون LH نشانگر این مساله بود که تغییرات معناداری در سطح این هورمون در بین گروههای مختلف وجود ندارد (تصویر ۴-۹- سمت راست).

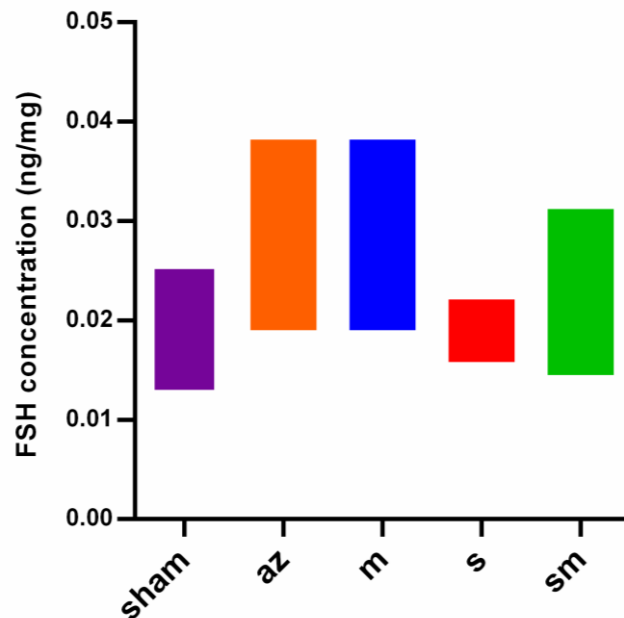
۴-۴-۲- تغییرات سطح سرمی هورمون تستوسترون

مطابق تصویر ۴-۹ (تصویر سمت چپ)، افزایش سطح تستوسترون سرمی در حیوانات مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی دریافت کننده ملاتونین، سکروتوم و تجویز تومان سکروتوم-ملاتونین مشاهده شد هرچند که افزایش معنادار تنها در گروه دریافت کننده سکروتوم اتفاق افتاد ($P=0.0491$).



تصویر ۴-۹- تاثیر تجویز ملاتونین، سکروتوم و سکروتوم-ملاتونین بر روی سطوح سرمی هورمون Testosterone (تصویر سمت چپ) و LH (تصویر سمت راست) در حیوانات مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی. نتایج به صورت $Mean \pm SD$ ارائه شده است. Sham: شام، AZ: آزواسپرمی، M: ملاتونین، S: سکروتوم، SM: سکروتوم-ملاتونین

۴-۳-۴- تغییرات سطح سرمی هورمون FSH



تصویر ۴-۱۰- آنالیز سطح سرمی هورمون FSH

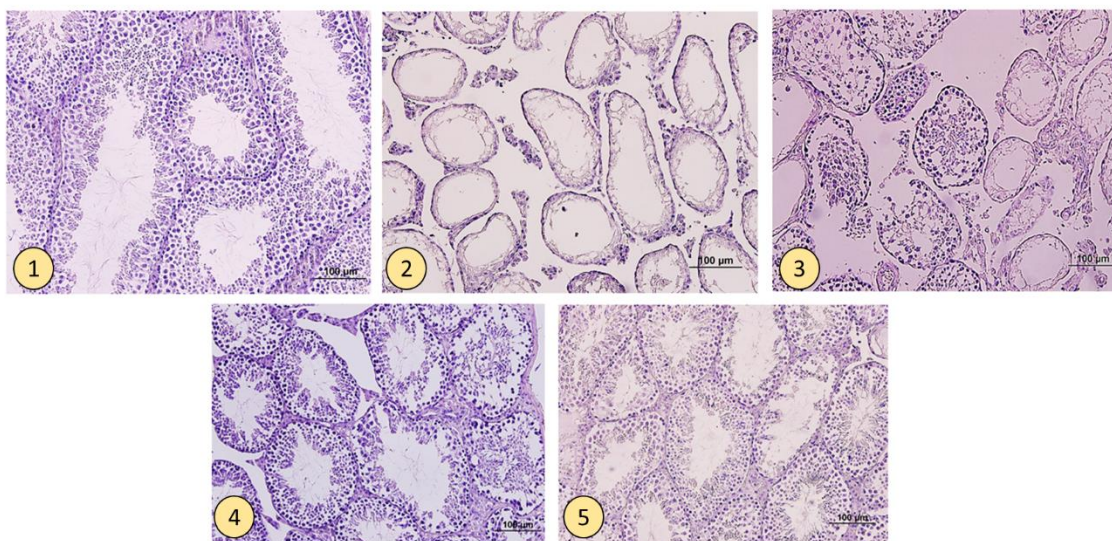
باتوجه به تصویر ۴-۱۰، آنالیز سطح سرمی هورمون FSH نشانگر این مساله بود که تغییرات معناداری در سطح این هورمون در بین گروههای مختلف درمانی وجود ندارد.

۴-۵- تغییرات هیستوپاتولوژی

با توجه به تصویر ۴-۱۱، در گروه شم ساختار بافتی تقریباً سالم بود و لوله های منی ساز با بافت بینابینی متراکم محصور شده بودند. روند اسپرماتوژنز به صورت فعال مشاهده شد و انواع رده های سلولی در اپیتلیوم زایا به همراه سلول های سرتولی در لوله های سمنیفر حضور داشتند. در گروه آزواسپرمی کاهش ضخامت اپیتلیوم زایا مشهود بود و فضای واکتوله وسیعی مشاهده می شد و در لوله های سمنیفر روی غشا پایه تعداد محدودی سلول اسپرماتوگونی حضور داشت و در بیشتر سلول ها روند اسپرماتوژنز و یا نکروز مشاهده شد و اکثر سلول های باقی مانده، سلول های سرتولی بودند. غشا پایه لوله ها به صورت نامنظم بود که نماید وقوع آتروفی در لوله ها بود. همچنین توقف روند اسپرماتوژنز در تمامی لوله ها مشاهده شد. به طور کلی در سه گروه درمانی روند کاهش آسیب بافتی مشهود بود. با این حال در گروه دریافت کننده ملاتونین در بسیاری از لوله ها تغییرات دژنراتیو و واکوئلیشن مشاهده شد

در گروه دریافت کننده سکر توم در تعداد قابل توجهی از لوله های سمینفر، انواع رده های سلولی وجود داشت. فضا های واکوئله تا حد زیادی از بین رفته بود و ضخامت اپیتلیوم زایشی افزایش پیدا کرده بود و هنوز تعداد اسپرماتوزوآ در داخل لومن، نسبت به گروه شم کمتر بود.

در گروه دریافت کننده تومان سکر توم- ملاتونین، تغییرات پاتولوژیک مشهودی یافت نشد و به طور خلاصه روند اسپرماتوژنز طبیعی در اکثر لوله ها مشهود بود. همچنین بافت بینابینی در سلول های لیدینگ دست نخورده باقی مانده بودند. هرچند در تعدادی از لوله ها تغییرات دژنراتیو ملایم مشاهده می شد.

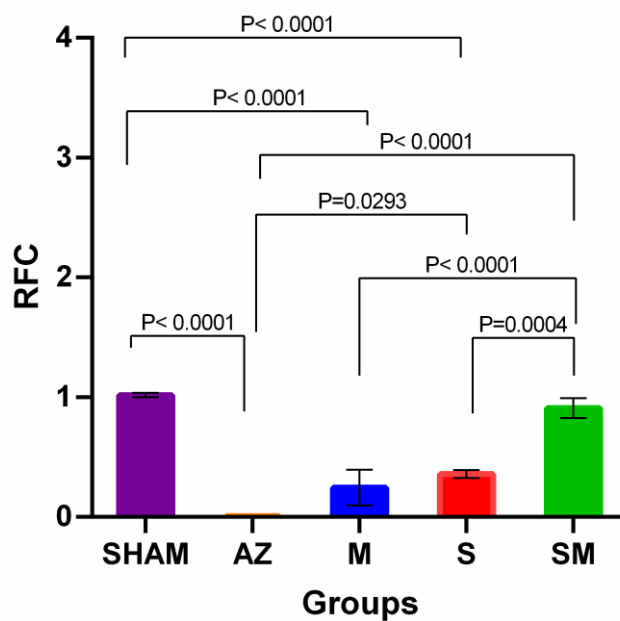


تصویر ۴-۱۱- ارزیابی هستیوپاتولوژی بافت بیضه. تصویر شماره ۱ (بالا سمت چپ): نمای طبیعی از بافت بیضه در گروه Sham. تصویر شماره ۲: آسیب دژنراتیو بافت بیضه متعاقب تزریق بوسولفان در گروه AZ. تصویر شماره ۳: گروه دریافت کننده ملاتونین. تصویر شماره ۴: گروه دریافت کننده سکر توم. تصویر شماره ۵: گروه دریافت کننده تومان سکر توم- ملاتونین

۴-۶-نتایج مولکولی

۴-۶-۱- بیان ژن VASA

بر اساس نتایج مولکولی (تصویر ۴-۱۲)، تزریق بوسولفان سبب کاهش معنادار در سطح بیان ژن VASA در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0.0001$)، اما پس از تجویز سکرتموم ($P = 0.0293$) و سکرتموم-ملاتونین ($P < 0.0001$) شاهد افزایش معنادار در سطح بیان این ژن نسبت به گروه آزواسپرمی بودیم. همچنین افزایش بیان این ژن، در حیواناتی که سکرتموم-ملاتونین دریافت کرده بودند نسبت به گروه دریافت کننده ملاتونین به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0.0001$).

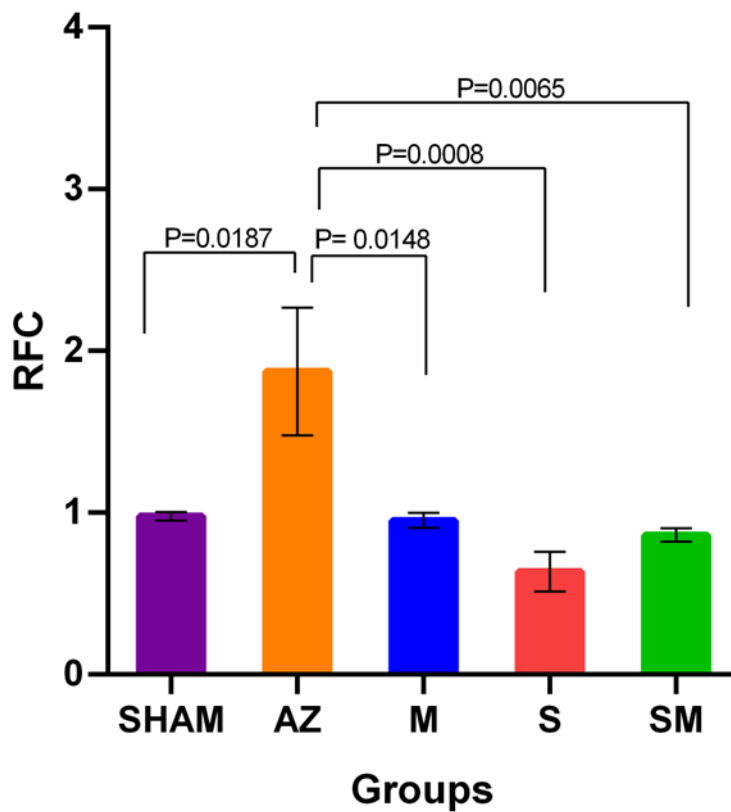


تصویر ۴-۱۲- مقایسه بیان ژن VASA در گروه ها.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

۴-۶-۲- بیان ژن Bax

بر اساس نتایج مولکولی (تصویر ۴-۱۳)، بیان ژن Bax در گروه آزواسپرمی سبب افزایش معنادار نسبت به گروه شاهد شد ($P=0.0187$). البته شایان ذکر است پس از تجویز ملاتونین، سکر توم و سکر توم-ملاتونین شاهد کاهش معنادار در سطح بیان این ژن نسبت به گروه آزواسپرمی بودیم (به ترتیب: $P=0.0148$ ، $P=0.0008$ و $P=0.0065$).

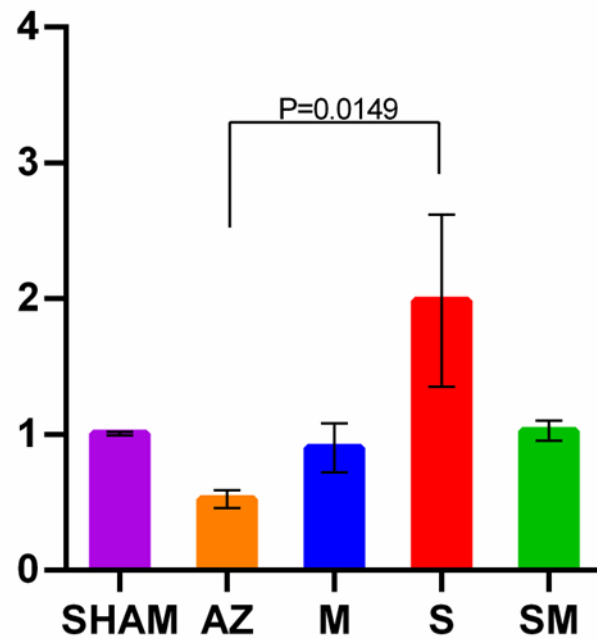


تصویر ۴-۱۳- مقایسه بیان ژن Bax در گروه ها.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

۴-۶-۳- بیان ژن DAZL

بر اساس نتایج مولکولی (تصویر ۴-۱۳)، در گروه های دریافت کننده سکر توم سطح بیان ژن DAZL نسبت به گروه آواسپرمی به طور معناداری بالاتر بود ($P=0.0149$).

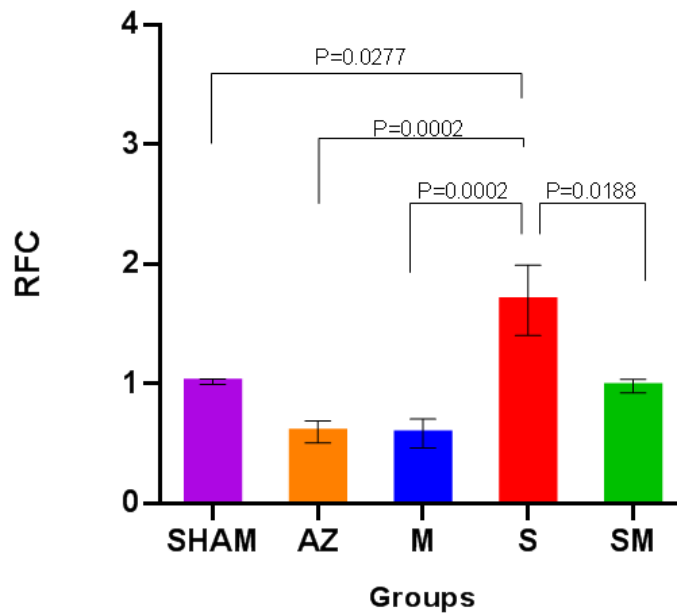


تصویر ۴-۱۳- مقایسه بیان ژن DAZL در گروه ها.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

۴-۶-۴ بیان ژن Sycp3

بر اساس نتایج مولکولی (تصویر ۴-۱۴)، بیان ژن Sycp3 در گروه دریافت کننده سکرتوم به طور معناداری نسبت به گروه های شاهد ($P=0.0277$)، آزواسپرمی ($P=0.0002$)، ملاتونین ($P=0.0002$) و سکرتوم-ملاتونین ($P=0.0188$) افزایش یافت.

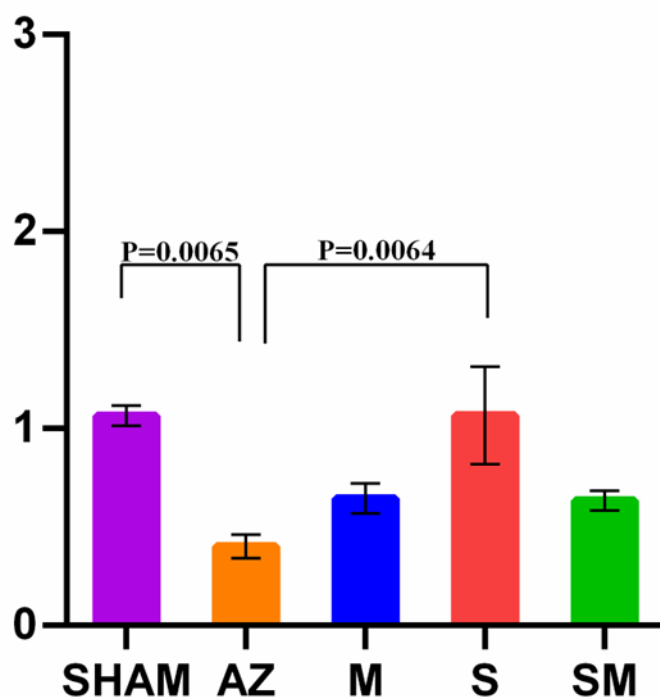


تصویر ۴-۱۴- مقایسه بیان ژن Sycp3 در گروه ها.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

۴-۶-۵- بیان ژن Stra8

بر اساس نتایج مولکولی (تصویر ۴-۱۵)، بیان ژن Stra8 در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه شاهد دچار کاهش معنادار شده بود ($P=0.0065$). همچنین پس مداخله سکرتموم افزایش معناداری در سطح بیان این ژن نسبت به گروه آزواسپرمی مشاهده شد ($P=0.0064$).



تصویر ۴-۱۵- مقایسه بیان ژن Stra8 در گروه ها.

نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده است.

نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱- بحث

۵-۲- نتیجه گیری

۵-۳- پیشنهادات

۵-۱- بحث

در مطالعه حاضر، ارزیابی هیستوپاتولوژیک و بیان ژن متعاقب تجویز سکروتوم مشتق از سلول های بنیادی خون قاعدگی به همراه ملاتونین در مدل های حیوانی مبتلا به آرواسپرمی غیر انسدادی صورت پذیرفت. تا کنون مطالعات معدودی در زمینه اثرگذاری سکروتوم مشتق از سلول های بنیادی بر ناباروری آقایان صورت گرفته است. پژوهش حاضر تنها مطالعه در خصوص اثرگذاری سکروتوم مشتق از MenSC به همراه ملاتونین آگزوزن در مدل های مبتلا آرواسپرمی غیر انسدادی است.

در این مطالعه، تاثیر مثبت استفاده از ملاتونین، سکروتوم مشتق از سلول های بنیادی خون قاعدگی و استفاده همزمان سکروتوم-ملاتونین در مدل های مبتلا به آرواسپرمی غیر انسدادی، نشان داده شد. نتایج به دست آمده حاکی از بهبود درصد تغییرات وزنی، ایندکس وزن بیضه، پارامترهای اسپرم، تغییرات سطح سرمی هورمون تستوسترون، بهبود آسیب های وارده به بافت بیضه و همچنین تغییرات بیان ژنی متعاقب القای آرواسپرمی می باشد.

Awad و همکاران (۲۰۰۶)، دریافتند در مردان مبتلا به آرواسپرمی غیر انسدادی، سطح هورمون ملاتونین کمتر از میزان طبیعی است. همچنین در این افراد تحرک اسپرم دچار کاهش شده بود (۱۴۰) نتایج مطالعه ما نیز حاکی از کاهش معنا دار تحرک اسپرم ها متعاقب القای آرواسپرمی نسبت به گروه شاهد بود. همچنین بعلت برهم خوردن تعادل آنتی اکسیدان-اکسیدانی متعاقب ایجاد آسیب بافتی، کاهش سطح آنتی اکسیدانی هورمون ملاتونین دور از انتظار نیست.

در مطالعه ای، Lu و همکاران (۲۰۱۸)، پنجاه و چهار مرد نابارور با اولیگواسپرمی خفیف مبتلا به واریکوسل را مورد ارزیابی قرار دادند. پس از درمان واریکوسل، افراد به دو گروه دریافت کننده ملاتونین (۴۰۰ میلی گرم) و دریافت کننده دارونما تقسیم شدند. در ماه های ۳ و ۶ پس از درمان، پارامترهای مایع منی (غلظت اسپرم، تحرک و زنده مانی) در بیماران تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با گروه دارونما، به طور معنا دارای افزایش یافته بود (۱۴۱). یافته های ما نیز، حاکی از افزایش پارامتر های اسپرم بود. هر چند که تاثیر معنا دار مداخله ملاتونین تنها در درصد زنده مانی اسپرم ها و تحرک اسپرم ها در گروه های دریافت کننده ملاتونین و دریافت کننده توامان سکروتوم-ملاتونین نسبت به گروه آرواسپرمی قابل مشاهده بود. اما معنی داری در غلظت اسپرم تنها در گروه دریافت کننده همزمان سکروتوم-ملاتونین نسبت به گروه آرواسپرمی مشاهده شد.

S. Shokri و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود اثرات تجویز ملاتونین در مدل های مبتلا به ناتوانی جنسی متعاقب صرع را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد استفاده از هورمون ملاتونین موجب افزایش تحرک اسپرم ها در برخی از گروه های تحت درمان می شود. اگرچه در این مطالعه ملاتونین تاثیری بر غلظت و زنده مانی اسپرم نداشت (۱۴۲). اگرچه در مطالعه ما درصد زنده مانی اسپرم ها متعاقب دریافت

ملاتونین افزایش معناداری نسبت به گروه آزواسپرمی داشت، اما سایر یافته های این مطالعه نیز مشابه نتایج به دست آمده در پژوهش ما بود.

Casao و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه ای که بر روی قوچ انجام شد، با وجود مشاهده تاثیر ملاتونین بر افزایش میزان باروری از طریق جلوگیری از آپاتوز اسپرم ها، نتوانستند اثر بخشی استفاده از ملاتونین را بر پارامتر های اسپرم تأیید کنند (۱۴۳) که نتیجه ای مغایر با نتایج مطالعه ما دارد.

در مطالعه Mónica B Frungieri و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شده است که ملاتونین با اتصال به گیرنده های خاص به طور مستقیم ترشح تستوسترون را تنظیم می کند (۱۴۴) هرچند که در مطالعه ما، ملاتونین نتوانست سبب افزایش معنی دار در ترشح تستوسترون نسبت به گروه آزواسپرمی گردد.

Saumen K Maitra و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه ای به بررسی اثرات تجویز ملاتونین بر روند اسپرماتوژنز در رت های نژاد ویستار پرداختند. طبق یافته های این مطالعه، تفاوت معنی داری در میانگین وزن بدن و بیضه ها بین گروه های مختلف درمانی دریافت کننده اتانول-سالین و با ملاتونین مشاهده نشد (۱۴۵). یافته های این مطالعه در مغایرت با نتایج پژوهش ما بود.

این درحالیست که M. Koksai و همکاران (۲۰۱۲) ، در مطالعه ای به بررسی اثرات ملاتونین بر بافت بیضه رت های نژاد ویستار پرداختند. در این مطالعه مشاهده شده، متعاقب القای مدل ایسکمی در بافت بیضه، با دریافت 10 mg/kg ملاتونین به صورت IP، آسیب های دژنراتیو بافت بیضه بهبود می یابند. تجویز ملاتونین موجب بلوغ و افزایش سلول های زایا و اسپرماتید های بالغ در بافت بیضه شد. همچنین تجویز ملاتونین سبب افزایش میزان اسپرم های نرمال نسبت به گروه ایسکمی گشت (۱۴۶). مقایسه نتایج صورت گرفته در این پژوهش با مطالعات ما می تواند گواه از اثر بخشی ملاتونین بر پارامتر های اسپرم و هیستوپاتولوژی بیضه باشد. Fereshte Torabi و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ای به بررسی اثرات ملاتونین بر بافت بیضه و پارامتر های اسپرم در مدل رت های ویستار درمان شده با سیکلوفسفامید پرداختند. نتیجه آنکه، تجویز ملاتونین سبب بهبود آسیب های دژنراتیو در بافت بیضه و بهبود پارامتر های اسپرم در رت های درمان شده با سیکلوفسفامید شد. همچنین دریافت ملاتونین سبب جلوگیری از کاهش وزن بدنی و وزن اندام های تولید مثلی شد (۱۴۷). نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعه ما هم خوانی دارد.

Mehri Mirhoseini و همکاران (۲۰۱۹) اثرات تجویز ملاتونین را بر آسیب بیضه متعاقب تروما در رت مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش مشخص شد دریافت ملاتونین می تواند سبب بهبود آسیب های بافتی در بیضه متعاقب تروما گردد. تجویز ملاتونین همچنین توانست موجب افزایش ضخامت اپیدیدم و سبب بهبود آسیب های تروماتیک و موجب بازیابی روند اسپرماتوژنز شود (۱۴۸). نتایج این مطالعه نیز همسو با نتایج حاصل از مطالعه ما بود.

Malek Soleimani Mehranjani و همکاران (۲۰۲۲) تاثیر ملاتونین بر تغییرات بافت بیضه و پارامترهای اسپرم را در موش های سوری پس از درمان با دگزامتازون، مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، قادر به کاهش آسیب های وارده به بافت بیضه، روند اسپرماتوژنز،

تولید روزانه و پارامترهای اسپرم است (۱۴۹). نتایج مطالعات ما نیز نزدیک به نتایج به دست آمده از این مطالعه بود.

Gunapala Shetty و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه ای که به بررسی اثر پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال در رزوس های پرتودرمانی شده پرداخته شده بود، دریافتند تجویز سلول های مذکور موجب بازیابی روند اسپرماتوژنز، افزایش حجم بیضه، حجم انزال، تعداد اسپرم ها و همچنین موجب افزایش سطح سرمی تستوسترون می شود. نتیجه بافت شناسی همچنین نشان از بازیابی طبقات سلولی در لوله های منی سازی را داشت که دچار سندرم فقط سلول سرتولی^۱ شده بودند (۸۷). از مقایسه یافته های به دست آمده در این مطالعه با مطالعه حال حاضر، قرابت نتایج مشهود بود.

همین محققان در مطالعه ای مشابهی که در سال ۲۰۲۰ انجام شد، اثرات درمانی تجویز SSC در بازیابی روند اسپرماتوژنز در رزوس های پرتودرمانی شده را هرچند اندک اما تأیید کردند. در این مطالعه عنوان شد، پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال می توانند در بازیابی فرآیند اسپرمزایی پس از دست دادن تعداد کثیری از سلول های زایا، از جمله SSCs ها، در مدل های حیوانی پرتودرمانی شده، اثرگذار باشند (۸۸). در نتیجه مقایسه یافته های این محققان با نتایج مطالعه ما نیز قابل توجه است.

با استناد به یافته های Hiroko Morimoto و همکاران (۲۰۲۱)، القای آزواسپرمی متعاقب تزریق بوسولفان، سبب کاهش وزن و حجم بیضه، توقف روند اسپرماتوژنز و کاهش محسوس تعداد اسپرم اپیدیدیمی نسبت به گروه شاهد می گردد. همچنین پس از پیوند SSC ها در مدل های مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی، روند بهبودی لوله های منی ساز در بافت بیضه مشهود بود (۹۲). نتایج پژوهش های ما همچنین، مشابه یافته های این تحقیق بود.

ازیابی های هیستوپاتولوژی در مطالعه Forouzan Rahmani و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد، پس از تجویز iPSCs ها در مدل های مبتلا به آزواسپرمی (متعاقب تجویز بوسولفان - 40 mg/kg)، سبب بازسازی روند اسپرماتوژنز در لوله های منی ساز می شود (۹۸). یافته های هیستوپاتولوژی بافت بیضه در پژوهش ما نیز، نتایج مشابهی با این مطالعه را نشان داد.

Amin Tamadon و همکاران (۲۰۱۵) روند بازسازی بافت بیضه و اسپرم زایی در بیضه مدل های مبتلا به آزواسپرمی را دنبال کردند. در ابتدا، به دنبال تزریق بوسولفان، بافت بیضه دچار تخریب گسترده شد. بجز سلول های سرتولی، بیشتر طبقات سلولی از بین رفتند، به طوری که فرآیند اسپرماتوژنز را تحت تأثیر قرار داد. پس از پیوند BM-MSC، ارزیابی های هیستومورفولوژیکی بیضه ها نشان داد تا حد زیادی بهبودی حاصل شده است. همچنین در این مطالعه گزارش شد روند اسپرم زایی نیز بهبود یافته است به گونه ای که اسپرماتوژنز در اکثر لوله های اسپرم ساز مشاهده شد. این در حالی بود که در گروه القای آزواسپرمی هیچ گونه فعالیت اسپرم زایی در لوله های منی ساز مشاهده نمی شد (۱۰۴). نتایج این مطالعه با مطالعه انجام شده توسط تیم پژوهشی ما، قرابت داشت.

¹ Sertoli Cell Only Syndrome

Mehrdokht Hajihoseini و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثرات پیوند سلول های بنیادی مغز استخوان در خوکچه های هندی آزواسپرمی شده، دریافتند متعاقب آسیب شدید بافتی ایجاد شده با بوسولفان، روند اسپرماتوژنز با اختلال شدید مواجه می گردد. ارزیابی های هسیتوپاتولوژیک نیز گواه بر آسیب شدید دژنراتیو در این گروه داشت. پیوند BM-MSC، توانستند تا حد زیادی آسیب های وارده ناشی از تزریق بوسولفان را بهبود بخشد (۱۰۵). یافته های مطالعه ما نیز نتایج مشابهی را نشان داد.

یافته های مطالعه Cihangir Cakici و همکاران (۲۰۱۳)، مشاهده کردند القای آزواسپرمی توسط بوسولفان سبب کاهش حجم و وزن بیضه می گردد. نتایج نشان داد پیوند سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی، در رت های آزواسپرمی شده، می تواند تا ۵۰ درصد موجب افزایش حجم بیضه گردد. از ارزیابی های هسیتوپاتولوژی می توان دریافت پس از تزریق بوسولفان، در لوله های منی ساز روند اسپرماتوژنز به صورت کامل یا ناقص متوقف شده است. همچنین در بیشتر لوله ها طبقات سلولی از بین رفته بودند و تنها سلول های سرتولی باقی مانده بودند. در برخی از لوله ها نیز سلول های اسپرماتوگونی هرچند اندک اما یافت می شد. اما پس از درمان با ADSC، بازسازی طبقات سلولی و بازایی روند اسپرماتوژنز هرچند با سرعت اندک اما مشاهده شد. پس از جفت گیری رت های نر درمان شده با رت های ماده سالم، بارداری اتفاق افتاد و رت های سالم متولد شدند (۱۱۹). ارزیابی نتایج پژوهش تیم تحقیقاتی ما نیز، یافته های مطالعه بالا را تأیید می کنند.

Chunfeng Qian و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند مسمومیت ناشی از بوسولفان تراپی در موش سبب توقف روند اسپرماتوژنز و بروز اختلالات دژنراتیو در بافت بیضه می گردد. در ادامه، این تیم به ارزیابی اثرات بازساختی hAMSC بر بازایی روند اسپرماتوژنز پرداختند. ارزیابی نتایج حاصل با بررسی فنوتیپ لوله های اسپرم ساز و سطح تستوسترون سرمی به دست آمد. در گروه شاهد، فرآیند اسپرم زایی به طور کامل مشاهده شد، در حالی که این روند در گروه آزواسپرمی با اختلال شدید مواجه شد به طوری که اکثر اسپرماتوگونی ها و تقریباً تمام اسپرماتوسیت های اولیه، اسپرماتوسیت های ثانویه، اسپرماتیدهای گرد و اسپرم های سالم از لوله های اسپرم ساز ناپدید شدند. همچنین چهار هفته پس از بوسولفان تراپی، واکوئالسیون شدیدی در غشای پایه لوله های منی ساز، کاهش ضخامت غشاء پایه لوله های منی و افزایش وسعت لومن این لوله ها مشاهده شد. در گروه دریافت کننده hAMSC، پس از چهار هفته از پیوند این سلول ها، ترمیم بافتی و مراحل مختلف فرآیند اسپرم زایی اتفاق افتاد. لومن لوله های منی ساز مجدداً شروع به کوچک تر شدن کردند. در مقایسه با گروه آزواسپرمی، بهبودی جزئی در سطح بیان تستوسترون، یک هفته پس از سلول درمانی حاصل شد. اگرچه در هفته چهارم پس از پیوند hAMSC سطح این هورمون به طور معنا داری افزایش یافت.

تجویز hAMSC، سبب بهبودی وزن و اندازه بیضه و پارامترهای مایع منی، نسبت به گروه آزواسپرمی شد. در مقایسه با گروه کنترل، وزن، طول و عرض بیضه در گروه دریافت کننده بوسولفان تقریباً ۵۰ درصد کاهش یافت. از طرفی پارامتر های مذکور در گروه دریافت کننده سلول پس از چهار هفته از پیوند، بهبود یافت.

پارامترهای اسپرم، توسط نرم افزار CASA ارزیابی شد. در مقایسه با گروه کنترل، کاهش بیش از پنج برابری در تعداد کل اسپرم در گروه دریافت کننده بوسولفان مشاهده شد، در حالی که در ۴ هفته پس از تزریق

hAMSC بهبودی در تعداد اسپرم ها حاصل گشت. تحرک اسپرم ها در گروه دریافت کننده بوسولفان نسبت به گروه شاهد، کاهش معناداری داشت، اما در گروه BSF/hAMSC در مقایسه با گروه دریافت کننده بوسولفان افزایش یافت (۱۲۰). نتایج این مطالعه با یافته های پژوهش ما مطابقت داشت.

Negar Karimaghai و همکاران (۲۰۱۸) پیوند AT-MSCs (اهدا شده توسط دو خانم) در بیضه همستر های مبتلا به آزواسپرمی را مورد ارزیابی قرار دادند. پیوند سلول های بنیادی، سی و پنج روز پس از القای آزواسپرمی توسط بوسولفان و در مجرای آوران^۱ بیضه راست صورت گرفت.

پس از ۳۵ روز، بیضه ها و اپیدیدیم در همه گروه ها برای ارزیابی بافت شناسی برداشته شد. تجزیه و تحلیل هیستومورفومتریک بیضه ها و اپیدیدیم در گروه تحت درمان با AT-MSCs نشان داد که بافت اپیتلیال در اکثر لوله های اسپرم ساز ترمیم شده است و اسپرم، در لوله های اپیدیدیمی همانند بیضه های سالم یافت شد. در لوله های اسپرم ساز و اپیدیدیمی در گروه آزواسپرمی (تحت تاثیر بوسولفان) آسیب های دژنراتیو مشهود بود و روند اسپرماتوژنز به طور کامل متوقف شده بود (۱۱۷). از ارزیابی های هیستوپاتولوژی بافت بیضه در پژوهش ما نیز می توان دریافت نتایج این مطالعه و مطالعه ما در تشابه است.

Anna Monakova و همکاران (۲۰۲۲)، اثرات سکرئوم سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی را بر سلول های لیدیک رت های نژاد ویستار، مورد ارزیابی قرار دادند. سلول های بنیادی از هشت اهدا کننده سالم ۱۸ تا ۵۳ سال جمع آوری شد. یافته های این مطالعه نشان داد، در شرایط آزمایشگاهی، مداخله سکرئوم می تواند با تاثیر بر سلول های لیدیک موجب افزایش سطح تستوسترون گردد (۱۲۸). یافته های مطالعه ما نیز نشان داد، مداخله سکرئوم، سبب افزایش معنی دار در سطح سرمی تستوسترون در حیوانات مبتلا به آزواسپرمی می گردد ($P=0.0491$).

در مطالعه Forouzan Rahmani و همکاران (۲۰۱۹)، مشخص شد بیان ژن Vasa بعد از پیوند iPSC در موش های آزواسپرمی شده نسبت به گروه آزواسپرمی، به طور معنی داری افزایش پیدا می کند (۹۸). نتایج این مطالعه با یافته های ما همخوانی دارد.

Hossein Azizi و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند بیان دو ژن DAZL و VASA پس از پیوند SSC به لوله های اسپرم ساز موش های آزواسپرمی شده با بوسولفان، کاهش می یابد (۹۰). در مطالعه حاضر، ما شاهد افزایش سطح بیان ژن VASA در گروه های سکرئوم ($P=0.0293$) و سکرئوم-ملائونین ($P<0.0001$) و همچنین افزایش سطح بیان ژن DAZL در گروه دریافت کننده سکرئوم ($P=0.0149$) نسبت به گروه آزواسپرمی بودیم. بنابراین می توان دریافت نتایج مطالعه حاضر و مطالعه Hossein Azizi با یکدیگر همخوانی ندارند.

همچنین در مطالعه Chunfeng Qian و همکاران (۲۰۲۰) مشخص شد پس از پیوند hAMSCs در مدل موش های آزواسپرمی شده، بیان ژن ها DAZL، Scp3، Stra8 و Bax افزایش می یابند (۱۲۰). به استثنا نتایج به دست آمده از بیان ژن Bax، سایر نتایج مولکولی در این مطالعه با پژوهش ما هم خوانی دارد.

Somia H. Abd Allah و همکاران (۲۰۱۷) پس از پیوند hASCs به موش های مدل آزواسپرمی غیر انسدادی دریافتند بیان ژن های SCP3 و Vasa در گروه های تحت درمان دچار افزایش معنا داری نسبت به

¹ Efferent duct

گروه آرواسپرمی شدند. این در حالی بود که مقایسه بیان ژن های مذکور در گروه تحت درمان نسبت به گروه شاهد، معنی داری خاصی را نشان نداد (۱۲۲). یافته ها مطالعه یاد شده، نتایج پژوهش ما را تأیید می کرد. Cuncan Deng و همکاران (۲۰۱۹)، در مطالعه ایی که اثر بخشی USC و USC-exos در موش های C57BL/6 مدل آرواسپرمی غیر انسدادی را مورد ارزیابی قرار دادند، دریافتند پس از تزریق بوسولفان بیان ژن های مربوط به اسپرماتوژنز (DAZL و SYCP3) نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. در حالی که تجویز توامان USCs و USC-exos باعث افزایش بیان این ژن ها و همچنین بازیابی روند اسپرماتوژنز درون زا در این موش ها گشت (۱۵۰). نتایج این مطالعه، به طور کامل با مطالعه ما همخوانی دارد.

S Panahi و همکاران (۲۰۲۰)، اثر بخشی سکر توم سلول های سرتولی در موش های مدل آرواسپرمی غیر انسدادی را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد بیان ژن Stra8 در گروه دریافت کننده بوسولفان نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی دار می یابد. در حالی که بیان این ژن ها در گروه تحت درمان با سکر توم در مقایسه با گروه بوسولفان مجدداً دچار افزایش معنا دار می گردد. هر چند که همچنان بیان این ژن ها در گروه دریافت کننده سکر توم نسبت به گروه شاهد، کم است (۱۵۱). نتایج این مطالعه با یافته های پژوهش ما، مشابهت دارد.

Yi-ting Cai و همکاران (۲۰۲۱) دریافتند پس از تجویز سکر توم های BMSC در موش های نژاد Balb/c مدل آرواسپرمی غیر انسدادی، بیان ژن های Vasa، Dazl، Stra8 و Scp3 پس از دریافت بوسولفان در گروه آرواسپرمی، دچار کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد می گردد. در حالی که این محققان شاهد افزایش معنی دار در بیان ژن های مذکور در گروه دریافت کننده سکر توم نسبت به گروه آرواسپرمی بودند (۱۲۹). نتایج حاصل از این مطالعه کاملاً مشابه با یافته های پژوهش ما بود.

۵-۲- نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه و آنچه که در خصوص تاثیر سکر توم مشتق از سلول های بنیادی خون قاعدگی جهت درمان اختلال آرواسپرمی بحث شد، استنباط می شود ترشحات پاراکراین MenSCs می تواند بعنوان جایگزینی مناسب در درمان موارد آرواسپرمی جهت بازیابی روند اسپرماتوژنز و بازسازی نیچ های سلولی در بافت بیضه مورد استفاده قرار گیرد.

۵-۳- پیشنهادات

- ۱- همکشتی ملاتونین در محیط کشت سلول های بنیادی
- ۲- تجویز توامان سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، سکر توم سلول های مذکور و ملاتونین
- ۳- بهره گیری از ترکیب سکر توم سلول های بنیادی با منشا گوناگون

منابع و مأخذ

1. Balabanyan V, Efimenko A, Sidhom K, Panchendrabose K, Mann U, Patel P. An update on male infertility and intratesticular testosterone-insight into novel serum biomarkers. *International journal of impotence research*. 2022;34(7):673-8.
2. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human reproduction update*. 2017;23(6):660-80.
3. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. *Lancet*. 2021;397(10271):319-33.
4. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ (Clinical research ed)*. 1992;305(6854):609-13.
5. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human reproduction update*. 2017;23(6):646-59.
6. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *International journal of general medicine*. 2020;13:29-41.
7. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):15-26.
8. Berookhim BM, Schlegel PN. Azoospermia due to spermatogenic failure. *The Urologic clinics of North America*. 2014;41(1):97-113.
9. Hamano KI, Sugimoto R, Takahashi H, Tsujii H. Spermatogenesis in immature mammals. *Reproductive medicine and biology*. 2007;6(3):139-49.
10. Skurikhin EG, Pakhomova AV, Pershina OV, Krupin VA, Ermakova NN, Pan ES, et al. Role of Sertoli and Leydig Cells in the Regulation of Spermatogonial Stem Cell and Development of Reproductive Disorders in Male C57Bl/6 Mice with Type 1 Diabetes Mellitus. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;164(2):127-31.
11. Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;30:2-13.
12. Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, Stankiewicz MT, Jordan V, Showell MG. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019(3).
13. Gharagozloo P, Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, Kocer A, Calle A, et al. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016;31(2):252-62.
14. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Human reproduction update*. 2008;14(3):243-58.
15. Bozhedomov VA, Gromenko DS, Ushakova IV, Toroptseva MV, Galimov Sh N, Alekandrova LA, et al. [Oxidative stress of spermatozoa in pathogenesis of male infertility]. *Urologiia (Moscow, Russia : 1999)*. 2009(2):51-6.
16. Brzezinski A, Rai S, Purohit A, Pandi-Perumal SR. Melatonin, Clock Genes, and Mammalian Reproduction: What Is the Link? *International journal of molecular sciences*. 2021;22(24).

17. Wurtman RJ, Axelrod J, Chu EW. Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. *Science* (New York, NY). 1963;141(3577):277-8.
18. Srinivasan V. Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Indian journal of experimental biology*. 2002;40(6):668-79.
19. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science*. 2000;7(6):444-58.
20. Wang F, Liu C, Zhang S-s, Liu W-s, Hua J-l. Transplantation of Goat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (gMSCs) Help Restore Spermatogenesis in Endogenous Germ Cells-Depleted Mouse Models. *Journal of Integrative Agriculture*. 2013;12(3):483-94.
21. Mehrzadi S, Safa M, Kamrava SK, Darabi R, Hayat P, Motevalian M. Protective mechanisms of melatonin against hydrogen-peroxide-induced toxicity in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2017;95(7):773-86.
22. Talpur HS, Chandio IB, Brohi RD, Worku T, Rehman Z, Bhattarai D, et al. Research progress on the role of melatonin and its receptors in animal reproduction: A comprehensive review. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2018;53(4):831-49.
23. Zhang P, Zheng Y, Lv Y, Li F, Su L, Qin Y, et al. Melatonin protects the mouse testis against heat-induced damage. *Molecular human reproduction*. 2020;26(2):65-79.
24. Chakraborty C, Agoramoorthy G. Stem cells in the light of evolution. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(6):813-9.
25. Nava MM, Raimondi MT, Pietrabissa R. Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:797410.
26. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):68.
27. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2013;85(1):3-10.
28. Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem cells international*. 2015;2015:734731.
29. Mahla RS. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International journal of cell biology*. 2016;2016:6940283.
30. Menasché P, Vanneaux V, Hagège A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *European heart journal*. 2015;36(30):2011-7.
31. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385(9967):509-16.
32. Ilic D, Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem cells*. 2017;35(1):17-25.

33. Rocha V, Gluckman E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2006;12(1 Suppl 1):34-41.
34. Alessandrini M, Preynat-Seauve O, De Bruin K, Pepper MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 2019;109(8b):70-7.
35. Saha S, Roy P, Corbitt C, Kakar SS. Application of Stem Cell Therapy for Infertility. *Cells*. 2021;10(7).
36. Semi K, Takashima Y. Pluripotent stem cells for the study of early human embryology. 2021;63(2):104-15.
37. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(3):71.
38. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restorative neurology and neuroscience*. 2010;28(4):589-603.
39. Phillips MI, Tang YL. Genetic modification of stem cells for transplantation. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(2):160-72.
40. Ye L, Swingen C, Zhang J. Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Current cardiology reviews*. 2013;9(1):63-72.
41. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy*. 2003;5(1):32-45.
42. Schultz MB, Sinclair DA. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development (Cambridge, England)*. 2016;143(1):3-14.
43. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University medical journal*. 2018;18(3):e264-e77.
44. Kulus M, Sibiak R. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human and Animal Perinatal Tissues-Origins, Characteristics, Signaling Pathways, and Clinical Trials. 2021;10(12).
45. Matsuzaka Y, Yashiro R. Therapeutic Strategy of Mesenchymal-Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles as Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(12).
46. He Y, Han Y, Ye Y. Therapeutic Potential of Menstrual Blood-Derived Stem Cell Transplantation for Intrauterine Adhesions. *Frontiers in surgery*. 2022;9:847213.
47. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1.
48. Chen L, Zhang C, Chen L, Wang X, Xiang B, Wu X, et al. Human Menstrual Blood-Derived Stem Cells Ameliorate Liver Fibrosis in Mice by Targeting Hepatic Stellate Cells via Paracrine Mediators. *Stem cells translational medicine*. 2017;6(1):272-84.
49. Cordeiro MR, Carvalhos CA, Figueiredo-Dias M. The Emerging Role of Menstrual-Blood-Derived Stem Cells in Endometriosis. *Biomedicines*. 2022;11(1).

50. Khoury M, Alcaayaga-Miranda F, Illanes SE, Figueroa FE. The promising potential of menstrual stem cells for antenatal diagnosis and cell therapy. *Frontiers in immunology*. 2014;5:205.
51. Lv H, Hu Y, Cui Z, Jia H. Human menstrual blood: a renewable and sustainable source of stem cells for regenerative medicine. 2018;9(1):325.
52. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
53. Lin J, Xiang D, Zhang JL, Allickson J, Xiang C. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2011;12(5):372-80.
54. Liu T, Huang Y, Zhang J, Qin W, Chi H, Chen J, et al. Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. *Stem cells and development*. 2014;23(13):1548-57.
55. Lai D, Guo Y, Zhang Q, Chen Y, Xiang C. Differentiation of human menstrual blood-derived endometrial mesenchymal stem cells into oocyte-like cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2016;48(11):998-1005.
56. Chen L, Qu J, Cheng T, Chen X, Xiang C. Menstrual blood-derived stem cells: toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. 2019;10(1):406.
57. Mirzadegan E, Golshahi H, Kazemnejad S. Current evidence on immunological and regenerative effects of menstrual blood stem cells seeded on scaffold consisting of amniotic membrane and silk fibroin in chronic wound. *International Immunopharmacology*. 2020;85:106595.
58. Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *Journal of translational medicine*. 2015;13:155.
59. Eremichev RY, Makarevich OA, Alexandrushkina NA, Kulebyakin KY, Dyikanov DT, Makarevich PI. Menstrual-Blood Serum Displays an Antifibrotic Effect on Human Endometrial Mesenchymal Stromal Cells. *Cell and Tissue Biology*. 2018;12(4):281-8.
60. Dong L-H, Jiang Y-Y, Liu Y-J, Cui S, Xia C-C, Qu C, et al. The anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells on irradiated lungs via stimulating endogenous secretion of HGF and PGE2. *Scientific reports*. 2015;5(1):8713.
61. Chen L, Xiang B, Wang X, Xiang C. Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):9.
62. Gwam C, Mohammed N, Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review. *Annals of translational medicine*. 2021;9(1):70.
63. Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(20):3871-82.
64. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PloS one*. 2009;4(3):e4722.

65. Múzes G, Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. 2022;11(15).
66. Kou M, Huang L, Yang J, Chiang Z, Chen S, Liu J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? *Cell Death & Disease*. 2022;13(7):580.
67. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem cells*. 2017;35(4):851-8.
68. Nikfarjam S, Rezaie J, Zolbanin NM, Jafari R. Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. 2020;18(1):449.
69. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25(9):2363-70.
70. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(3):670-81.
71. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood*. 2011;118(2):330-8.
72. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*. 2009;15(1):42-9.
73. Kim DS, Jang IK, Lee MW, Ko YJ, Lee DH, Lee JW, et al. Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *EBioMedicine*. 2018;28:261-73.
74. Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC, Cervio E, Calvillo L, Copes F, et al. Conditioned medium from human amniotic mesenchymal stromal cells limits infarct size and enhances angiogenesis. *Stem cells translational medicine*. 2015;4(5):448-58.
75. Shrestha C, Zhao L, Chen K, He H, Mo Z. Enhanced healing of diabetic wounds by subcutaneous administration of human umbilical cord derived stem cells and their conditioned media. *International journal of endocrinology*. 2013;2013:592454.
76. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2010;4(3):214-22.
77. Lai RC, Tan SS, Yeo RW, Choo AB, Reiner AT, Su Y, et al. MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *Journal of extracellular vesicles*. 2016;5:29828.
78. S ELA, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(5):347-57.

79. Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, Hao Q, Monsel A, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2014;32(1):116-25.
80. Wang L-T, Ting C-H, Yen M-L, Liu K-J, Sytwu H-K, Wu KK, et al. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *Journal of Biomedical Science*. 2016;23(1):76.
81. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. 2020;77(14):2771-94.
82. Evans EPP, Scholten JTM, Mzyk A, Reyes-San-Martin C, Llumbet AE, Hamoh T, et al. Male subfertility and oxidative stress. *Redox biology*. 2021;46:102071.
83. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2014;28(6):684-703.
84. Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. 2020;77(1):93-113.
85. Yong W, Ma H, Na M, Gao T, Zhang Y, Hao L, et al. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2021;144:112001.
86. Shetty G, Mitchell JM, Lam TNA, Phan TT, Zhang J, Tailor RC, et al. Postpubertal spermatogonial stem cell transplantation restores functional sperm production in rhesus monkeys irradiated before and after puberty. 2021;9(5):1603-16.
87. Shetty G, Mitchell JM, Meyer JM, Wu Z, Lam TNA, Phan TT, et al. Restoration of functional sperm production in irradiated pubertal rhesus monkeys by spermatogonial stem cell transplantation. *Andrology*. 2020;8(5):1428-41.
88. Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell stem cell*. 2012;11(5):715-26.
89. Azizi H, Niazi Tabar A, Skutella T. Successful transplantation of spermatogonial stem cells into the seminiferous tubules of busulfan-treated mice. *Reproductive health*. 2021;18(1):189.
90. Kubota H, Avarbock MR, Schmidt JA, Brinster RL. Spermatogonial Stem Cells Derived from Infertile Wv/Wv Mice Self-Renew In Vitro and Generate Progeny Following Transplantation1. *Biology of Reproduction*. 2009;81(2):293-301.
91. Morimoto H, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Matoba S, Ogura A, Shinohara T. Spermatogonial stem cell transplantation into nonablated mouse recipient testes. *Stem Cell Reports*. 2021;16(7):1832-44.
92. Dong L, Gul M. Xeno-Free Propagation of Spermatogonial Stem Cells from Infant Boys. 2019;20(21).

93. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M, Naghdi M, Koruji M. Embryonic stem cell derived germ cells induce spermatogenesis after transplantation into the testes of an adult mouse azoospermia model. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2017;131(18):2381-95.
94. Silva C, Wood JR, Salvador L, Zhang Z, Kostetskii I, Williams CJ, et al. Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone. *Molecular reproduction and development*. 2009;76(1):11-21.
95. Shah SM, Singla SK, Palta P, Manik RS, Chauhan MS. Retinoic acid induces differentiation of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cells into germ cells. *Gene*. 2017;626:358-66.
96. Shah SM, Saini N, Singh MK, Manik R, Singla SK, Palta P, et al. Testicular cell-conditioned medium supports embryonic stem cell differentiation toward germ lineage and to spermatocyte- and oocyte-like cells. *Theriogenology*. 2016;86(3):715-29.
97. Rahmani F, Movahedin M, Mazaheri Z, Soleimani M. Transplantation of mouse iPSCs into testis of azoospermic mouse model: in vivo and in vitro study. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2019;47(1):1585-94.
98. Botman O, Wyns C. Induced pluripotent stem cell potential in medicine, specifically focused on reproductive medicine. *Frontiers in surgery*. 2014;1:5.
99. Ramathal C, Durruthy-Durruthy J, Sukhwani M, Arakaki JE, Turek PJ, Orwig KE, et al. Fate of iPSCs derived from azoospermic and fertile men following xenotransplantation to murine seminiferous tubules. *Cell reports*. 2014;7(4):1284-97.
100. Zhu Y, Hu H-L, Li P, Yang S, Zhang W, Ding H, et al. Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study. *Asian journal of andrology*. 2012;14(4):574.
101. Akerman JP, Hayon S, Coward RM. Sperm Extraction in Obstructive Azoospermia: What's Next? *The Urologic clinics of North America*. 2020;47(2):147-55.
102. Malekmohamadi N, Abdanipour A, Ghorbanlou M, Shokri S, Shirazi R, Dimitriadis E, et al. Differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells into male germ-like cells in co-culture with testicular cells. *Endocrine regulations*. 2019;53(2):93-9.
103. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Jahromi AR, Panahi M, Zare S, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamster. *International journal of stem cells*. 2015;8(2):134-45.
104. Hajihoseini M, Vahdati A, Ebrahim Hosseini S, Mehrabani D, Tamadon A. Induction of spermatogenesis after stem cell therapy of azoospermic guinea pigs. *Veterinarski arhiv*. 2017;87(3):333-50.
105. Rahmanifar F, Tamadon A, Mehrabani D, Zare S, Abasi S, Keshavarz S, et al. Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoospermic seminiferous tubules by allotransplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016;19(6):653-61.
106. Vahdati A, Fathi A, Hajihoseini M, Aliborzi G, Hosseini E. The Regenerative Effect of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Spermatogenesis of Infertile Hamster. *World journal of plastic surgery*. 2017;6(1):18-25.

- 107.Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(6):131.
- 108.Sabbaghi MA, Bahrami AR, Feizzade B, Kalantar SM, Matin MM, Kalantari M, et al. Trial evaluation of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation in revival of spermatogenesis in testicular torsion. *Middle East Fertility Society Journal*. 2012;17(4):243-9.
- 109.Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Batavani R, Eslaminejad MB, Sayahpour F. Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Testes of Infertile Male Rats and New Germ Cell Formation. *International journal of stem cells*. 2016;9(2):250-63.
- 110.Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad MB, Sedighi-Gilani M. Derivation of male germ cells from ram bone marrow mesenchymal stem cells by three different methods and evaluation of their fate after transplantation into the testis. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2016;52(1):49-61.
- 111.Anand S, Bhartiya D, Sriraman K, Mallick A. Underlying Mechanisms that Restore Spermatogenesis on Transplanting Healthy Niche Cells in Busulphan Treated Mouse Testis. *Stem cell reviews and reports*. 2016;12(6):682-97.
- 112.Zhang D, Liu X, Peng J, He D, Lin T, Zhu J, et al. Potential spermatogenesis recovery with bone marrow mesenchymal stem cells in an azoospermic rat model. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(8):13151-65.
- 113.Ganjibakhsh M, Mehraein F. The therapeutic potential of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of busulfan-induced azoospermic mice. 2022;39(1):153-63.
- 114.Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of human reproductive sciences*. 2015;8(2):103-10.
- 115.Meligy FY, Abo Elgheed AT, Alghareeb SM. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on Cisplatin induced testicular damage in adult male albino rat. *Ultrastructural pathology*. 2019;43(1):28-55.
- 116.Karimaghahi N, Tamadon A, Rahmanifar F, Mehrabani D, Raayat Jahromi A, Zare S, et al. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2018;21(7):660-7.
- 117.Hsiao CH, Ji AT, Chang CC, Cheng CJ, Lee LM, Ho JH. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem cell research & therapy*. 2015;6(1):113.
- 118.Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *BioMed research international*. 2013;2013:529589.
- 119.Qian C, Meng Q, Lu J, Zhang L, Li H, Huang B. Human amnion mesenchymal stem cells restore spermatogenesis in mice with busulfan-induced testis toxicity by inhibiting apoptosis and oxidative stress. 2020;11(1):290.
- 120.Chen H, Tang QL, Wu XY, Xie LC, Lin LM, Ho GY, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Molecular medicine reports*. 2015;12(1):819-28.

121. Abd Allah SH, Pasha HF, Abdelrahman AA, Mazen NF. Molecular effect of human umbilical cord blood CD34-positive and CD34-negative stem cells and their conjugate in azoospermic mice. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017;428(1-2):179-91.
122. Yang RF, Liu TH, Zhao K, Xiong CL. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian J Androl*. 2014;16(5):698-704.
123. Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2012;126(22):2601-11.
124. Zafardoust S, Kazemnejad S, Darzi M, Fathi-Kazerooni M, Rastegari H, Mohammadzadeh A. Improvement of Pregnancy Rate and Live Birth Rate in Poor Ovarian Responders by Intraovarian Administration of Autologous Menstrual Blood Derived- Mesenchymal Stromal Cells: Phase I/II Clinical Trial. *Stem cell reviews and reports*. 2020;16(4):755-63.
125. Zhang S, Huang B, Su P, Chang Q, Li P, Song A, et al. Concentrated exosomes from menstrual blood-derived stromal cells improves ovarian activity in a rat model of premature ovarian insufficiency. 2021;12(1):178.
126. Park HS, Chugh RM, El Andaloussi A, Hobeika E, Esfandyari S, Elsharoud A, et al. Human BM-MSC secretome enhances human granulosa cell proliferation and steroidogenesis and restores ovarian function in primary ovarian insufficiency mouse model. *Scientific reports*. 2021;11(1):4525.
127. Monakova A, Sagaradze G, Basalova N. Novel Potency Assay for MSC Secretome-Based Treatment of Idiopathic Male Infertility Employed Leydig Cells and Revealed Vascular Endothelial Growth Factor as a Promising Potency Marker. 2022;23(16).
128. Cai YT, Xiong CL, Liu TS, Shen SL, Rao JP, Qiu F. Secretions released from mesenchymal stem cells improve spermatogenesis restoration of cytotoxic treatment with busulfan in azoospermia mice. *Andrologia*. 2021;53(8):e14144.
129. Sagaradze GD, Basalova NA, Kirpatovsky VI, Ohobotov DA, Grigorieva OA, Balabanyan VY, et al. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:1428-36.
130. Sagaradze G, Basalova N, Kirpatovsky V, Ohobotov D, Nimiritsky P, Grigorieva O, et al. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. 2019;10(1):342.
131. Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. 2021;12(1):229.
132. Abdollahifar MA, Azad N, Faraji Sani M, Raoofi A. Impaired spermatogenesis caused by busulfan is partially ameliorated by treatment with conditioned medium of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. 2022;97(2):107-17.

- 133.Ouyang X, Han X, Chen Z, Fang J, Huang X, Wei H. MSC-derived exosomes ameliorate erectile dysfunction by alleviation of corpus cavernosum smooth muscle apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):246.
- 134.Bader R, Ibrahim JN, Mourad A, Moussa M, Azoury J, Azoury J, et al. Improvement of Human Sperm Vacuolization and DNA Fragmentation Co-Cultured with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Secretome: In Vitro Effect. *International journal of stem cells*. 2019;12(3):388-99.
- 135.Zhang P, Zheng Y, Lv Y, Li F, Su L, Qin Y, et al. Melatonin protects the mouse testis against heat-induced damage. *Molecular Human Reproduction*. 2020;26(2):65-79.
- 136.Ahmad R, Haldar C. Effect of intra-testicular melatonin injection on testicular functions, local and general immunity of a tropical rodent *Funambulus pennanti*. *Endocrine*. 2010;37(3):479-88.
- 137.Mohammadghasemi F, Jahromi SK. Melatonin ameliorates testicular damages induced by nicotine in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2018;21(6):639-44.
- 138.Mirhoseini M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Mohammadi Asl J. Melatonin and testicular damage in busulfan treated mice. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2014;16(2):e14463.
- 139.Awad H, Halawa F, Mostafa T, Atta H. Melatonin hormone profile in infertile males. *International journal of andrology*. 2006;29(3):409-13.
- 140.Lu XL, Liu JJ, Li JT, Yang QA, Zhang JM. Melatonin therapy adds extra benefit to varicelectomy in terms of sperm parameters, hormonal profile and total antioxidant capacity: A placebo-controlled, double-blind trial. 2018;50(6):e13033.
- 141.Shokri S, Kazemi M, Firouzjaei M, Hemadi M, Moayeri A, Ganjkhani M, et al. Melatonin protects testes against lithium-pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in rats: a time course study. *Andrologia*. 2015;47(3):343-53.
- 142.Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia JA, Forcada F, et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of pineal research*. 2010;48(1):39-46.
- 143.Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology*. 2005;146(3):1541-52.
- 144.Maitra SK, Ray AK. Role of light in the mediation of acute effects of a single afternoon melatonin injection on steroidogenic activity of testis in the rat. *Journal of biosciences*. 2000;25(3):253-6.
- 145.Koksai M, Oğuz E, Baba F, Eren MA, Ciftci H, Demir M, et al. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2012;16(5).

- 146.Torabi F, Malekzadeh Shafaroudi M, Rezaei N. Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. *International journal of reproductive biomedicine*. 2017;15(7):403-12.
- 147.Mirhoseini M, Rezanejad Gatabi Z, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Talebpour Amiri F, Kelidari HR, et al. Protective effects of melatonin solid lipid nanoparticles on testis histology after testicular trauma in rats. *Research in pharmaceutical sciences*. 2019;14(3):201-8.
- 148.Soleimani Mehranjani M, Azizi M, Sadeghzadeh F. The effect of melatonin on testis histological changes and spermatogenesis indexes in mice following treatment with dexamethasone. *Drug and chemical toxicology*. 2022;45(3):1140-9.
- 149.Deng C, Xie Y, Zhang C, Ouyang B, Chen H, Lv L, et al. Urine-Derived Stem Cells Facilitate Endogenous Spermatogenesis Restoration of Busulfan-Induced Nonobstructive Azoospermic Mice by Paracrine Exosomes. *Stem cells and development*. 2019;28(19):1322-33.
- 150.Panahi S, Karamian A, Sajadi E, Aliaghaei A, Nazarian H, Abdi S, et al. Sertoli cell-conditioned medium restores spermatogenesis in azoospermic mouse testis. 2020;379(3):577-87.

Abstract

In the current century, infertility has caused problems in about ten to fifteen percent of couples all over the world, of which about thirty percent is related to male factors. The main challenge in the treatment of infertility in men is the lack of sperm in the semen, which is known as azoospermia and includes approximately 10 to 15% of the infertile male population. Despite some therapeutic interventions, there is currently no effective treatment for patients lacking mature sperm in the testes to have a biological child, ultimately leading them to use donor embryos. In this research, the effectiveness of using scrotum extracted from stem cells derived from menstrual blood along with exogenous melatonin was evaluated in the animal model of azoospermia, and after two months of treatment, the studied animals were subjected to histological and biochemical investigations in terms of effectiveness. and was placed molecularly. The evaluation of in vivo results showed that the percentage of weight changes in the melatonin and scrotum-melatonin receiving groups was positive. This is while weight loss was evident in animals with non-obstructive azoospermia. Also, melatonin and scrotum improved testis weight index in animals with non-obstructive azoospermia ($P=0.0000232$ and $P=0.00158$, respectively). Administering scrotum, melatonin, as well as combined scrotum-melatonin administration increased the concentration, motility and viability of sperms. It was also found that sperm morphology improved in all three treatment groups compared to the azoospermic group. From the hormonal evaluations of the blood serum level, it can be found that the serum testosterone level in animals with non-obstructive azoospermia receiving melatonin, scrotum and scrotum-melatonin administration was increased. The analysis of the serum level of LH hormone did not show significant changes in the level of this hormone among different treatment groups. Histopathology evaluations in all three treatment groups showed the improvement of tissue damage. The expression levels of DAZL, Bax, VASA, Stra8 and SYCP3 genes were also changed in all three treatment groups of Necit to Azoospermia group. It can be concluded that intervention of secretome along with exogenous melatonin increases the percentage of changes in body weight, testicle weight index, sperm parameters (morphology, motility, viability and concentration), serum level of testosterone hormone, reconstruction of tissue damage and also changes in gene expression level. It is related to the azoospermic group.

Keywords: Infertility, Azoospermia, Scrotum Extracted From Stem Cells Derived From Menstrual Blood, Busulfan, Melatonin



ISLAMIC AZAD UNIVERSITY

Shoushtar Branch

Faculty of Agriculture - Department of Veterinary

M.D. Degree on Veterinary Medicine

Subject:

**Histopathological Evaluation and Gene Expression of
Administration of Secretome Derived from Menstrual
Blood Stem Cells Along With Exogenous Melatonin in the
Model of Rats with non-Obstructive Azoospermia.**

Advisor:

H. Golshahi Ph.D.

S. Z. Peyghambar Zadeh Ph.D.

By:

Mohammad Mehdi Barfar

September 2023