

اثر حفاظت انجمادی ملاتونین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد، افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز

عظیم هدایت‌پور^{۱*}، ریحانه ابن‌یمین^۲، مریم خانه‌زاد^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش میزان ناباروری و نقش کلیدی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) در شروع اسپرماتوژنز و حفظ باروری، تلاش برای به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از تکنیک‌های نگهداری طولانی مدت SSCs یکی از مباحث حائز اهمیت در تحقیقات پایه و بالینی محسوب می‌شود. بنابراین این مطالعه به منظور بررسی اثر ملاتونین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش طی فرایند انجماد و ذوب طراحی شد.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از نوزادان موش نر ۳-۵ روزه نژاد BALB/C بعد از هضم آنزیمی جداسازی شده و با نشانگر ID4 توسط تکنیک فلوسایتمتری تایید ماهیت شدند. بعد از کشت، سلول‌ها در دو گروه کنترل (محیط پایه انجمادی) و گروه ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در محیط انجمادی پایه به مدت یک ماه فریز شدند. پس از فرایند انجماد-ذوب، میزان بیان پروتئین آپوپتوزی Caspase-3 و بیان پروتئین تکثیری Gfra1 در سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ $P \leq$ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها: پس از فرایند انجماد-ذوب، ملاتونین سبب کاهش معنادار بیان پروتئین آپوپتوزی Caspase-3 شد. همچنین افزایش بیان پروتئین Gfra1 در حضور ملاتونین به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ملاتونین، به عنوان یک عامل محافظ انجماد از طریق کاهش آپوپتوز و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌تواند برای انجماد و نگهداری طولانی مدت سلول‌ها و درمان ناباروری در کلینیک گزینه مناسبی باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های پیش‌ساز اسپرماتوگونی؛ ملاتونین؛ عامل محافظ انجماد

ارجاع: هدایت‌پور عظیم، ابن‌یمین ریحانه، خانه‌زاد مریم. اثر حفاظت انجمادی ملاتونین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد، افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۳۸): ۱۴۸۸ – ۱۴۹۶.

مقدمه

ناباروری، اختلالی است که طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی با عدم ایجاد بارداری پس از ۱۲ ماه رابطه‌ی جنسی منظم و محافظت نشده مشخص می‌شود. تخمین زده می‌شود که ۲۰ درصد از زوجها در سن باروری در سراسر جهان از ناباروری رنج می‌برند که از این درصد، مردان در ۵۰ درصد موارد نقش دارند (۱، ۲). با وجود اینکه اینکده در بیش از ۵۰ درصد موارد علت ناباروری مردان ناشناخته است اما می‌توان به واریکوسل، آژواسپرمی (انسدادی و غیرانسدادی)، الیگواسپرمی، داروها (شیمی‌درمانی)، پرتودرمانی، تروما و عوامل عفونی به عنوان عوامل شایع اشاره کرد (۳). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اسپرماتوژنز

را در طول زندگی مرد حفظ می‌کند. تقریباً ۷۰ تا ۹۰ درصد از ناباروری مردان به دلیل نقص در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) می‌باشد (۴). از جمله عوامل مؤثر در ایجاد نقص در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌توان به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به دنبال سرطان اشاره کرد. متأسفانه، درست مانند سلول‌های بدخیم که به سرعت تقسیم می‌شوند و هدف اصلی درمان هستند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حال تکثیر در بیضه در اثر قرار گرفتن در معرض عوامل شیمی‌درمانی و پرتودرمانی آسیب می‌بینند. گزارشات متعدد نشان می‌دهد با وجود شیوع سرطان، پیشرفت روش‌های درمانی منجر به افزایش ۷۱ درصد در میزان بهبودی این بیماران شده است که از هر ۵۳۰ فرد ۲۰

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- دانشجوی ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی تولید مثل، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مریم خانه‌زاد؛ استادیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی تولید مثل، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: m.khanehzad@med.mui.ac.ir

آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد پایه، به عنوان خنثی‌کننده‌های گونه‌های واکنشی اکسیژن، می‌تواند تا حدی یا به طور کامل از اثرات مخرب ناشی از گونه‌های واکنشی اکسیژن مثل آسیب DNA، پراکسیداسیون لیپیدی، آپوپتوز و کاهش زنده‌مانی سلول جلوگیری کند (۱۲).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که افزودن مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی مانند ملاتونین (۱۳)، پتوکسی‌فیلین (۱۴)، لیکوپن (۱۵)، آلفا توکوفرول و اسید اسکوربیک (۱۶) به محافظ انجماد می‌تواند از استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن اضافی جلوگیری کند. اما با وجود مطالعات گسترده و استفاده از فاکتورهای مختلف و افزودن آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان به محیط فریز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، معرفی یک فاکتور مطلوب که بتواند عوارض ناشی از فرایند فریز را در سلول‌ها به حداقل برساند، هنوز مورد بحث و توجه محققین می‌باشد.

ملاتونین، هورمونی که در بدن بوسیله‌ی غده پینه‌آل و تعدادی دیگر از ارگان‌ها ساخته می‌شود، به طور کلی طبق مقالات موجود در این زمینه ملاتونین دارای ویژگی‌های بسیاری از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی در انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی می‌باشد. سم‌زدایی در برداشت رادیکال آزاد به دلیل توانایی ملاتونین برای تنظیم افزایشی آنزیم‌های سم‌زدا نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیس موتاز و گلوکوتایون پراکسیداز انجام می‌شود. اثرات مثبت ملاتونین به عنوان آنتی‌اکسیدان مربوط به توانایی آن در اشغال ظرفیت آزاد رادیکال‌های اکسیژن فعال از جمله هیدروکسیل، آنیون سوپر اکساید، اکسید نیتریک و اسید هیپوکلریک، و مهار برخی از آنزیم‌ها پرواکسیدانی به عنوان مثال، نیتریک اکساید است (۱۷).

امروزه با توجه به افزایش میزان ناباروری و نقش کلیدی SSCs در شروع اسپرماتوژنز و هم‌چنین توسعه و پیشرفت تکنیک‌های نگهداری طولانی‌مدت این سلول‌ها، تلاش برای به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از انجماد یکی از مباحث حائز اهمیت در تحقیقات پایه و بالینی محسوب می‌شود. مطالعات متعدد در زمینه حفظ و نگهداری طولانی مدت SSCs و استفاده از فاکتورهای مختلف و افزودن آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان به محیط فریز، انجام شده است اما تاکنون فاکتور مطلوبی که بتواند با وجود کاهش آپوپتوز سبب افزایش تکثیر سلول‌های منجمد شده بشود معرفی نشده است و این موضوع هنوز مورد بحث و توجه محققین می‌باشد. از انجایی که ملاتونین به عنوان یک هورمون اندوژن در بدن نقش آنتی‌آپوپتوزی مؤثری در سایر سلول‌های بنیادی داشته است لذا در این مطالعه برآن شدیم که اثر ملاتونین را به عنوان یک عامل محافظ انجماد بر تکثیر و آپوپتوز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش پس از فرایند انجماد و ذوب مورد بررسی قرار دهیم.

تا ۳۹ ساله، ۱ مورد فردی است که در دوران کودکی به سرطان مبتلا بوده است. در واقع موفقیت در درمان پسر بچه‌هایی که قبل از بلوغ جنسی مبتلا به سرطان هستند و تحت دوز بالایی از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی قرار می‌گیرند، در سال‌های اخیر به طور شگفت‌انگیزی افزایش یافته است. اما حصول این موفقیت در درمان ممکن است بیماران را به طور موقت یا دائم نابارور کند که از نظر بالینی و تحقیقاتی بسیار مورد توجه می‌باشند. با توجه به این که میزان زنده‌مانی و بقا به دنبال درمان سرطان افزایش یافته‌است ما نیازمند روش‌هایی برای حفظ باروری مردان و به ویژه کودکان مبتلا به سرطان که توانایی تولید اسپرم را ندارند (در سنین قبل از بلوغ) می‌باشیم (۵، ۶).

اسپرماتوژنز در پستانداران، یک فرایند بسیار مولد و هماهنگ است که با هدف انتقال صحیح اطلاعات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی به نسل بعد بلافاصله بعد از بلوغ در لوله‌های اسپرم‌ساز شروع شده و در تمام طول زندگی فرد ادامه دارد. اساس و شالوده این فرایند SSCs هستند که در یک ریز محیط ویژه به نام آشیانه سلول بنیادی روی غشا پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار دارند. SSCs سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که علاوه بر توان خودنوزایی و تمایز به سلول‌های دختر، در ایجاد نسل بعد و انتقال اطلاعات ژنتیکی به آن نقش بسیار مؤثری دارند و از این جهت در بین سایر سلول‌های بنیادی بدن منحصر به فرد تلقی می‌شوند (۷).

با توجه به عوارض جانبی شیمی‌درمانی یکی از رایج‌ترین روش‌های موجود برای حفظ باروری، فرایند انجماد است. امکان حفظ باروری در مردان بالغ مبتلا به سرطان با استفاده از انجماد اسپرم قبل از شروع درمان وجود دارد (۸). با این حال، پسران قبل از بلوغ هیچ اسپرمی برای فرایند انجماد ندارند لذا به نظر می‌رسد استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بافت بیضه قبل از درمان، کشت و انجماد و نگهداری طولانی‌مدت آنها و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از بهبودی، می‌تواند روش مناسبی برای حفظ و بازیابی باروری در آینده این بیماران باشد (۹). انجماد شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی است که هدف آن حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول‌ها و بافت‌ها در دمای پایین می‌باشد. انجماد با طیف وسیعی از آسیب‌ها، از جمله تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی و خارج سلولی، تغییرات بیوشیمیایی غشای پلاسمایی سلول، اختلال در عملکرد سلول، افزایش میزان گونه‌های واکنشی اکسیژن، قطعه قطعه شدن DNA، پراکسیداسیون لیپیدی، آپوپتوز، کاهش تحرک و زنده‌مانی سلول همراه است که کارایی سلول‌ها و بافت‌های زنده را پس از فرایند انجماد-ذوب کاهش می‌دهد. برای کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد، محققان مواد شیمیایی محافظ انجماد به سلول‌ها اضافه می‌کنند (۱۰، ۱۱). اگرچه محافظ انجمادها برای کاهش برخی آسیب‌های ناشی از انجماد توانمند هستند، اما قادر به پاکسازی ROS و کاهش آپوپتوز سلول‌ها نیستند. بنابراین افزودن

روش‌ها

فرایند هضم آنزیمی

در این مطالعه‌ی تجربی، نوزادان موش نر (۳-۵) روزه BALB/C به تعداد ۱۵ عدد از مراکز پرورشی حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رویان تهران خریداری شد و طبق پروتکل استاندارد حمل حیوانات به آزمایشگاه منتقل و سپس به روش استاندارد در محفظه‌ی حاوی گاز دی‌اکسیدکربن قربانی شدند. جداسازی سلول‌ها سه بار انجام شد و برای هر بار جداسازی از بافت بیضه ۵ نوزاد موش (۳-۵ روزه) استفاده گردید. بیضه‌ها پس استخراج از اسکروتوم، در دیش حاوی PBS بر روی یخ به زیر هود منتقل و سپس سلول‌های آن جهت کشت جداسازی شدند (۱۸). فرایند هضم آنزیمی جهت جداسازی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی بر اساس پروتکل شینوهارا و همکاران با تغییرات انجام شد. بطور خلاصه، نمونه‌ها بعد از برداشت کپسول بیضه به محلول هضم آنزیمی شامل ۵ میلی‌لیتر محیط DMEM همراه با کلاژناز IV ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، هیالورونیداز ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و DnaseI ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منتقل شدند. مخلوط سلول و آنزیم در داخل انکوباتور ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با CO₂ ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و هر ۵ دقیقه یک‌بار پیپتاژ شدند. بعد از ۱۵ دقیقه سلول‌ها دو بار با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و بعد از اتمام مرحله اول هضم آنزیمی، پلت سلولی حاصل، مجدداً با استفاده از آنزیم‌های قبلی و به روش مشابه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و در نهایت به همان روش سانتریفوژ شدند. پلت سلولی در مقداری محیط کشت پیپتاژ و از فیلترهای نایلونی ۷۰ میکرونی عبور داده شدند (۱۹).

جداسازی SSCs

جهت جداسازی SSCs از سلول‌های سوماتیک از جمله سرتولی و میوید، از روش کشت افتراقی استفاده شد. در این روش سوسپانسیون حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂ در پتری دیش‌های پوشیده از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لکترین انکوبه شد. (برای این منظور لکترین در غلظت ذکر شده در PBS حل شده و داخل پتری دیش مورد نظر ریخته و به مدت یک ساعت قبل از استفاده انکوبه شد). بعد از گذشت یک ساعت سلول‌های سوماتیک به کف دیش چسبیده و مایع شناور رویی حاوی SSCs بود (۲۰).

تأیید ماهیت و تعیین SSCs با تکنیک فلوسایتومتری

جهت تأیید ماهیت و تعیین خلوص SSCs فلوسایتومتری با نشانگر ID4 استفاده شد. برای این کار، تعداد مناسب سلول (۱۰۶-۱۰۵ در هر میلی‌لیتر) شمارش و در لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ و تخلیه مایع رویی ۱۰۰ میکرومتر

محلول PBS/FBS ۵ درصد به پلت سلولی اضافه شد. سپس ۱۰ میکرومتر آنتی‌بادی اولیه (mouse monoclonal anti- ID4 antibody ab104854, Abcam, Cambridge, MA, USA) با غلظت ۱:۱۰۰ به سلول‌ها اضافه و به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این زمان، سانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد و بعد از خارج کردن مایع رویی، سلول‌ها توسط PBS دو بار شسته شدند. بعد از شستشو با PBS، جهت نفوذپذیری سلول‌ها برای آنتی‌بادی از تریتون ۰/۲×۱۰۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. مجدداً به سلول‌ها PBS/FBS ۵ درصد و ۱۰ میکرولیتر ثانویه (anti-mouse secondary antibody conjugated with FITC ab97022, Abcam, Cambridge, MA, USA) با غلظت ۱:۲۰۰ اضافه گردید. بعد از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ درجه انجام شد و بعد از خارج کردن مایع رویی، سلول‌ها توسط PBS دو بار شسته شدند. در نهایت جهت فیکس کردن به سلول‌ها ۱۰۰ میکرولیتر پارافمالدئید ۴ درصد اضافه شد. سلول‌ها تا زمانی که خلوص آن‌ها توسط دستگاه خوانده‌شوند در یخچال و دور از نور نگهداری شدند. سلول‌ها در گروه کنترل هیچ آنتی‌بادی دریافت نکردند.

کشت SSCs

سوسپانسیون سلولی که طبق پروتکل بعد از یک ساعت از روی دیش‌های پوشیده شده با لکترین برداشته شد به صورت غالب حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بودند. این سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سلول‌ها بعد از شمارش به مقدار ۲×۱۰^۵ cell/cm² در دیش‌های مورد نظر کاشته و به پلت سلولی حاصل محیط کشت مناسب حاوی محیط DMEM، FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، LIF ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، GDNF ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. در نهایت دیش‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵ درصد منتقل شدند. محیط کشت سلول‌ها یک روز در میان تعویض شد. سلول‌ها تا رسیدن به تراکم مناسب در شرایط یکسان و استاندارد کشت داده شدند.

انجماد

بعد از کشت سلول‌ها و تراکم مناسب سلولی، ابتدا سلول‌ها ترپسینه و به تعداد مساوی (۱۰۶-۱۰۵ در هر میلی‌لیتر) و با حجم نیم میلی‌لیتر محیط کشت به کرایو ویال‌های مربوطه (Cryovial, Nunc, Denmark) منتقل شدند. سپس ملائونین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به ویال‌های گروه تیمار اضافه شد. بعد از گذشت چند دقیقه نیم میلی‌لیتر محلول پایه انجماد (حاوی ۹۰۰ میکرولیتر FBS ۱۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO) به تمام ویال‌ها افزوده و به طور کامل مخلوط شد. کرایوویال‌ها به روش

secondary antibody conjugated with FITC ab97022, Abcam, Cambridge, MA, USA) با غلظت ۱:۲۰۰ در دمای اتاق به مدت یک ساعت در محیط تاریک به سلول‌ها در هر دو گروه اضافه گردید. پس از تخلیه آنتی‌بادی و ۳ بار شستشو، هسته‌ها با DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole) یک ماکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. بعد از اتمام کار سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت معکوس جهت بیان پروتئین مورد نظر بررسی شدند.

۱- پس از افزودن آنتی‌بادی ثانویه کلیه مراحل فوق در تاریکی و به دور از نور انجام شد.

۲- تمامی مراحل تخلیه و شستشو به آرامی انجام شد.

بررسی بیان پروتئین Caspase-3 با تکنیک وسترن بلات

جهت ارزیابی تاثیر ملاتونین بر آپوپتوز SSCs یک هفته بعد از فرآیند ذوب میزان بیان پروتئین Caspase-3 با تکنیک وسترن بلات سنجیده شد. در این روش پس از استخراج تمام پروتئین‌های سلولی، آنها را با محلول لودینگ بافر که حاوی سدیم دودسیل سولفات است باردار نموده و با ایجاد جریان الکتریسته در ژل، جداسازی آنها از یکدیگر بر اساس اندازه انجام شد. شناسایی پروتئین هدف با کمک آنتی‌بادی ویژه‌ای که بر علیه آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌های خاصی از آن پروتئین ساخته شده است، انجام گرفت. تکنیک وسترن بلات از دو مرحله الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌امید (PAGE) و لکه‌گذاری (Blotting) تشکیل شده است. از تکنیک الکتروفورز برای جداسازی مخلوطی از پروتئین‌ها، بررسی زیرواحدهای تشکیل‌دهنده، تأیید هوموژن بودن یک نمونه پروتئینی و برای خالص‌سازی پروتئین‌ها برای کاربردهای دیگر استفاده شد. PAGE-SDS در حقیقت یک الکتروفورز یک بعدی است که در آن از بستر پلی‌آکریل‌امید و بیس آکریل‌امید به عنوان پایه ژل استفاده شد. در این پروسه با استفاده از SDS همه‌ی پروتئین‌ها بار منفی گرفته و به این ترتیب حرکت آنها بر روی ژل بر اساس وزن مولکولی آنها صورت گرفت. در الکتروفورز ژل آکریل‌امید (PAGE) در اثر میدان الکتریکی تولید شده پروتئین‌ها از میان منافذ موجود در ماتریکس ژل حرکت کردند. سرعت حرکت پروتئین‌ها توسط منافذ ژل و همچنین سایز، بار و شکل پروتئین تعیین شد. در مرحله بلاتینگ پروتئین‌های الکتروفورز شده از ژل به کاغذ نیتروسلولز یا PVDF منتقل شده و سپس با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی مورد شناسایی قرار گرفتند.

داده‌های مربوط به وسترن بلات و ایمونوسیتوشیمی توسط نرم‌افزار Image J کمی‌سازی و در نهایت تمام داده‌های مطالعه توسط نرم‌افزار PRISM و آزمون T-test (مقایسه دو گروه) تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

انجماد آهسته برای مدت ۴ ساعت در دمای یخچال سپس به مدت ۲۴ ساعت به فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل و بعد از ۲۴ ساعت، به مدت یک ماه در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند (۲۱).

کرایوپریال‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و محیط پایه انجماد (نیم میلی‌لیتر) حاوی ۹۰۰ میکرولیتر FBS ۱۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO

۲- گروه ملاتونین: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و محیط پایه انجماد (نیم میلی‌لیتر) به علاوه ملاتونین ۱۰۰ میکرومولار.

ذوب

کرایوپریال‌ها بعد از خروج از نیتروژن مایع به مدت ۲ دقیقه به حمام آب ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از انتقال محتویات هر کرایوپریال به یک فالتون، مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول (۴/۵ میلی‌لیتر محیط DMEM و ۰/۵ میلی‌لیتر FBS) به سلول‌ها اضافه شد. سپس تعلیق سلولی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. پلیت سلولی حاصل در ته لوله‌های فالتون همراه با محیط DMEM پیپتاز شده و جهت فرایندهای بعدی در ظروف کشت مربوطه قرار گرفتند.

بررسی بیان پروتئین تکثیری (GFRa1) با تکنیک

ایمونوسیتوشیمی

در این مطالعه، یک هفته بعد از کشت سلول‌های ذوب شده جهت بررسی تاثیر ملاتونین بر فرآیند تکثیر SSCs، بیان پروتئین GFRa1 توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰). برای این منظور پتری دیش‌های مورد نظر برداشته و بعد از خارج کردن محیط کشت آنها به آرامی، دو بار با PBS شسته شدند. سپس جهت فیکس کردن سلول‌ها، پارافمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. بعد از دو بار شستشو با PBS، جهت نفوذپذیری سلول‌ها برای آنتی‌بادی از تریتون 0.2×100 درصد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد (تریتون غشای سلولی را به آنتی‌بادی‌ها نفوذپذیر می‌کند). بعد از شستشوی مجدد در مرحله بعد سرم بز ۱۰ درصد به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به سلول‌ها اضافه شد. سپس سرم خالی ولی شستشو انجام نشد. پروتئین‌های سرم بزی باعث می‌شود که محل‌های غیراختصاصی آنتی‌ژنی پوشیده شده و از واکنش غیر اختصاصی جلوگیری شود. در این زمان تنها سلول‌های گروه ملاتونین به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اولیه (Anti- GFRa1, polyclonal PA5-26976 Invitrogen) رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ در PBS به مدت یک شب (overnight) در دمای یخچال انکوبه شدند (استفاده از پارافیلیم و مرطوب نگه داشتن شرایط از خشک شدن آنتی‌بادی جلوگیری می‌کند). پس از ۳-۵ بار شستشو با PBS-Tween ۰/۱ درصد یا PBS، آنتی‌بادی ثانویه (Anti-mouse

این مقاله با کد اخلاق (IR.TUMS.MEDICINE.REC.1397.304) دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید شد.

انجام شد. نتایج حاصل خلوص ۹۱/۵ درصد برای نشانگر ID4 را نشان داد (شکل ۱).

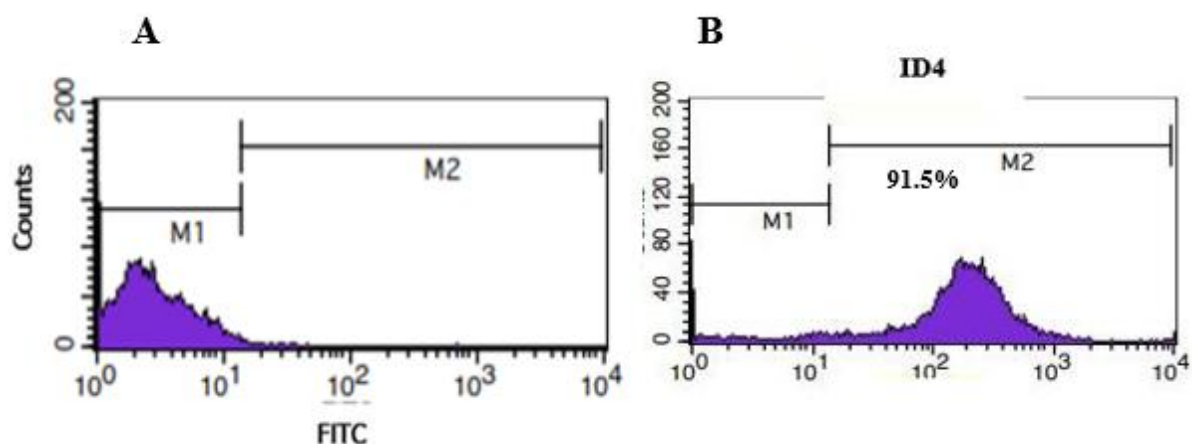
نتایج ایمونوسیتوشیمی

جهت بررسی تاثیر ملاتونین بر فرایند تکثیر سلول‌ها، یک هفته بعد از ذوب، بیان پروتئین Gfra1 توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که درصد بیان پروتئین Gfra1 در گروه کنترل ($4/14 \pm 40/67$) و در گروه ملاتونین ($74 \pm 1/85$) می‌باشد. این نتیجه بیان‌کننده‌ی این موضوع است که درصد بیان مارکر تکثیری در حضور ملاتونین به صورت معنی‌داری ($P \leq 0/0001$) نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است (شکل ۲).

یافته‌ها

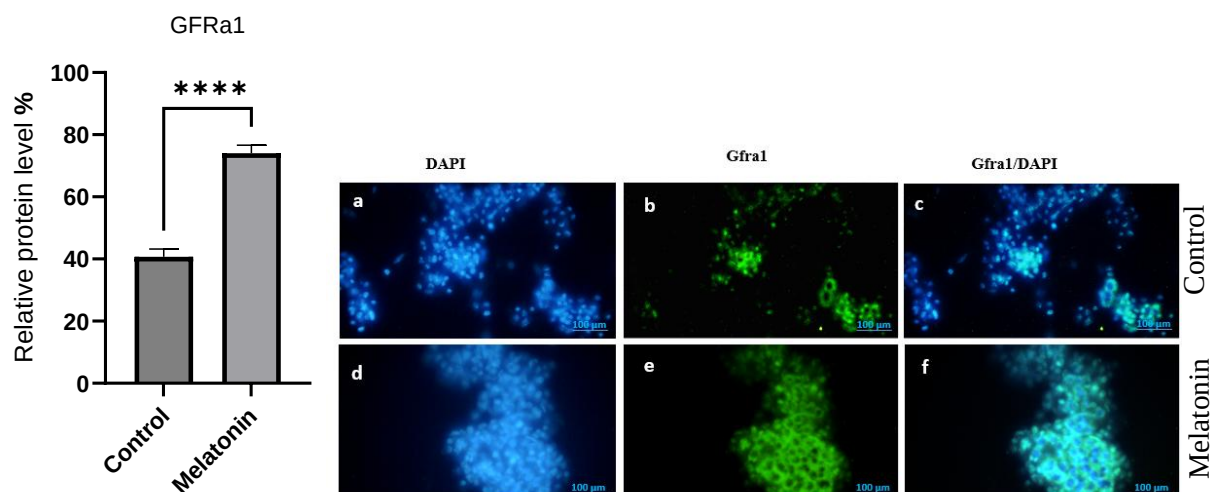
نتایج حاصل از فلوسایتومتری

بعد از هضم آنزیمی و جداسازی SSCs با روش کشت افتراقی جهت اندازه‌گیری درصد خلوص از فلوسایتومتری استفاده شد. فلوسایتومتری بر اساس نشانگر سطحی سلول اسپرماتوگونی ID4

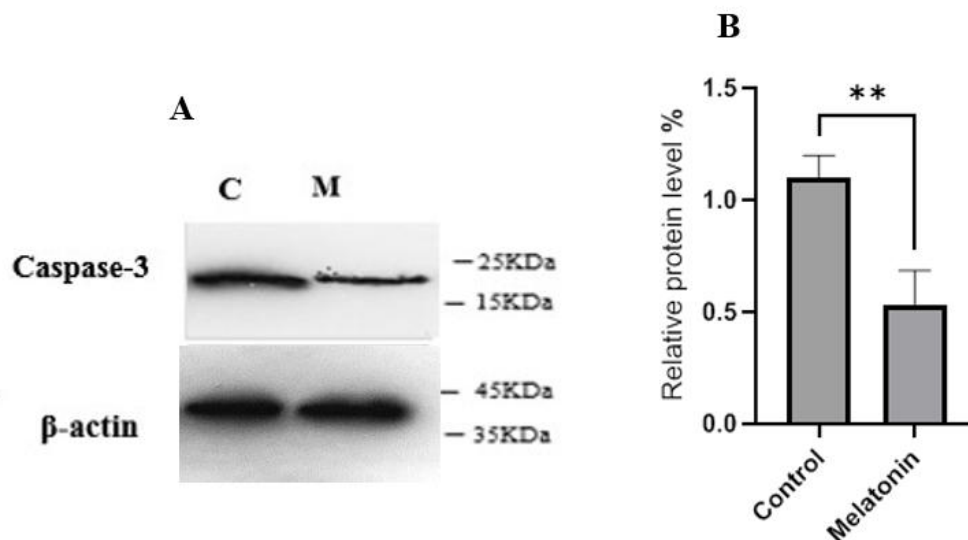


شکل ۱: فلوسایتومتری برای تعیین خلوص SSCs.

A: Control; B: ID4 positive
M2: Marker -positive cells; M1: Marker -negative cells



شکل ۲: ایمونوسیتوشیمی SSCs با استفاده از آنتی‌بادی Gfra1 (رنگ سبز نشان‌دهنده‌ی وجود Gfra1 در سیتوپلاسم سلول‌ها و رنگ آبی هسته‌ها) را نشان می‌دهد. گروه کنترل (a,b,c) و گروه ملاتونین (d,e,f). نمودار داده‌های مربوط به ایمونوسیتوشیمی Gfra1 در گروه‌های مورد مطالعه. درصد بیان Gfra1 در سلول‌های منجمدشده با ملاتونین بیشتر از گروه کنترل است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند. ****: $P \leq 0/0001$.



شکل ۳: میزان بیان پروتئین Caspase-3 گروه‌های مورد مطالعه. A: تصویر باندهای مربوط به بیان Caspase-3. B: نمودار نتایج حاصل از کمی‌سازی باندهای وسترن بعد از نرمالایز کردن با β -actin و گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار شان داده شده‌اند. $P \leq 0.01$. **

نتایج وسترن بلات

جهت بررسی تأثیر ملاتونین بر فرایند آپوپتوز سلول‌ها، یک هفته بعد از ذوب، میزان بیان Caspase-3 از طریق تکنیک وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در گروه کنترل درصد بیان پروتئین Caspase-3 (0.02 ± 0.01) و در گروه ملاتونین (0.02 ± 0.01) می‌باشد. به عبارت دیگر ملاتونین با کاهش معنی‌دار ($P \leq 0.01$) پروتئین Caspase-3 سبب کاهش فرایند آپوپتوز در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از انجماد-ذوب می‌شود (شکل ۳).

بحث

با توجه به اهمیت و گستردگی کاربرد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به خصوص در درمان ناباروری مردانی که قبل از بلوغ تحت درمان‌های شیمی‌درمانی و رادیوتراپی قرار گرفته و اسپرم بالغی جهت ذخیره نداشته‌اند، تکثیر SSCs در محیط کشت، انجماد و پیوند آنها به عنوان تکنیک‌های مناسب برای نگهداری طولانی‌مدت SSC و بازیابی باروری مورد توجه محققین بسیاری می‌باشد (۲۲، ۲۳).

نتایج مطالعات فراوانی که در این زمینه انجام شده است، نشان می‌دهد که فرایند انجماد و ذوب، سبب تغییرات بیوشیمیایی غشای پلاسمایی سلول، اختلال در عملکرد سلول و افزایش میزان گونه‌های واکنشی اکسیژن، قطعه قطعه شدن DNA، کاهش تحرک و زنده‌مانی سلول و در نهایت کاهش تولدایی باروری آن می‌گردد، لذا برای به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از انجماد افزودن فاکتورهای

محافظتی به محیط انجمادی بسیار ضروری و حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین ما در این مطالعه به منظور کاهش اثرات زیان‌بار انجماد از ملاتونین به عنوان عامل محافظت انجمادی استفاده کردیم. در مطالعه‌ی حاضر، جهت به دست آوردن جمعیت بیشتری از SSCs موش‌های نوزاد ۳-۶ روزه مورد استفاده قرار گرفتند و درصد خلوص بالایی به دست آمد. اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه نیز از موش‌های نوزاد استفاده کرده و درصد خلوص بالایی را گزارش کردند (۲۴، ۲۵). به نظر می‌رسد خلوص بالا با توجه به زمان شروع فرایند اسپرم‌زایی و عدم حضور رده‌های مختلف اسپرماتوسیت و اسپرماتید در موش‌های ۳-۶ روزه می‌تواند قابل توجیه باشد. علاوه بر این جداسازی SSCs در بافت بیضه بالغ به دلیل تنوع سلولی فراوان نیاز به تکنیک‌ها و زمان بیشتری دارد که احتمالاً منجر به کاهش قابلیت حیات سلول‌ها و یا بروز آلودگی در آنها می‌شود. بعد از هضم آنزیمی و جداسازی SSCs، نشانگر سطحی ID4 برای تأیید و شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توسط تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۹۱/۵ درصد از سلول‌های جدا شده ID4 را بیان کردند.

این در حالیکه که آنتی‌ژن‌هایی مثل $\alpha 6$ و $\beta 1$ اینتگرین و ID4 و Thy-1 نیز به عنوان نشانگر اسپرماتوگونی‌ها جهت خلوص‌سازی SSCs توسط سایر محققین گزارش شده است (۱۴، ۲۶). با توجه به مطالعات گسترده در زمینه تعیین پروفایل مولکولی رده‌های مختلف سلولی در بافت بیضه و عدم وجود نشانگر اختصاصی که منجر به

تکثیر و افزایش سلول‌های تمایزنیافته نقش مهمی را در تنظیم خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ایفا می‌کند. در مطالعه‌ی ما نیز تأثیر ملاتونین بر تکثیر SSCs با نشانگر Gfra1 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ملاتونین سبب افزایش بیان پروتئین Gfra1 در سلول‌ها بعد از فرایند انجماد-ذوب می‌شود.

مطالعه Aliakbari و همکاران نیز تأثیر ملاتونین را بر تکثیر این سلول‌ها تأیید کرده‌اند (۳۳). به طور کلی می‌توان گفت که ملاتونین به عنوان یک ماده‌ی محافظت‌کننده نفوذپذیر، احتمالاً از طریق تشکیل غلاف در اطراف سلول‌ها و جلوگیری از کاهش آب درون سلولی در بهبود زنده‌مانی سلول‌ها ایفای نقش می‌کنند و از این طریق باعث افزایش توان تکثیر سلولی می‌شوند. از محدودیت‌های این پروژه می‌توان به بررسی تعداد اندک پروتئین در زمینه‌ی تکثیر و آپوپتوز اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس داده‌های به دست آمده از این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که ملاتونین با تأثیر آنتی‌آپوپتوزی و همچنین تأثیر بر افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از فرایند انجماد-ذوب احتمالاً می‌تواند برای انجماد و نگهداری طولانی مدت سلول‌ها و درمان ناباروری در کلینیک گزینه‌ی مناسبی باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت مالی سپاسگزاریم. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دکتری علوم تشریحی به شماره‌ی ۱۴۲ می‌باشد. از شرکت‌کنندگان و افرادی که به نحوی در این مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاریم.

خلوص ۱۰۰ درصدی سلولی بشود، به نظر می‌رسد انتخاب هر یک از نشانگرهای شناسایی شده در SSCs، می‌تواند قابل توجیه باشد. از طرف دیگر نیز به دلیل استفاده از موش‌های نوزاد درصد خلوص به دست آمده در این مطالعه قابل قبول به نظر می‌رسد. علاوه بر این مطالعات متعدد نشان داده‌اند که نشانگر ID4 تنها در رده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود (۲۷، ۲۸). البته که بررسی نشانگرهای بیشتر و حتی با استفاده از تکنیک‌های کاملتر مثل ایمونوسیتوشیمی در زمینه‌ی خالص‌سازی بسیار کمک‌کننده می‌باشد.

نتایج این مطالعه جهت بررسی تأثیر آنتی‌آپوپتوزی ملاتونین در محیط انجمادی نشان داد که میزان بیان پروتئین Caspase-3 با کاهش معنی‌داری همراه بود. Deng و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که ملاتونین با افزایش بیان ژن Bcl2 و کاهش بیان ژن Bax در سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند، آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۲۹).

همچنین در مطالعه‌ی دیگر گزارش شده که درمان ملاتونین به طور قابل توجهی سبب افزایش بیان Bcl-2 و کاهش بیان ژن Bax در جنین گاو کشت داده شده می‌شود (۳۰). علاوه بر این برخی مطالعات دیگر نشان دادند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین E، کاتالاز و α توکوفرول، و کوثرستین به محیط انجماد از طریق افزایش بیان Bcl2 و کاهش بیان Bax در کاهش میزان آپوپتوز سلول‌های اسپرماتوگونی موش مؤثر است (۳۱-۳۳). با توجه به بررسی Caspase-3 می‌توان اشاره کرد که ملاتونین می‌تواند از هر دو مسیر، آپوپتوز را مهار کند. البته که بررسی سایر پروتئین‌های مکمل در مسیرها بسیار ارزشمند و کلیدی می‌باشد.

نتایج مطالعات انجام شده در زمینه‌ی خودنوزایی و تکثیر نشان داد که نشانگر Gfra1 به عنوان یک عامل برای پیشرفت مرحله‌ی

References

1. vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem 2018; 62: 2-10.
2. Ojo OA, Nwafor-Ezeh PI, Rotimi DE, Iyobhebhe M, Ogunlakin AD, Ojo AB. Apoptosis, inflammation, and oxidative stress in infertility: A mini review. Toxicol Rep 2023.
3. Asadi A, Ghahremani R, Abdolmaleki A, Rajaei F. Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review. Int J Reprod Biomed 2021; 19(6): 493-504.
4. Gül M, Dong L, Wang D, Diri MA, Andersen CY. Surrogate testes: Allogeneic spermatogonial stem cell transplantation within an encapsulation device may restore male fertility. Med Hypotheses 2020; 139: 109634.
5. Serrano JB, Meißner A, van Pelt AM, Mulder CL. Fathering a child after childhood cancer treatments. Tijdschr Urol 2022; 12(2-3): 65-70.
6. Mulder RL, Font-Gonzalez A, Green DM, Loeffen EA, Hudson MM, Loonen J, et al. Fertility preservation for male patients with childhood, adolescent, and young adult cancer: recommendations from the PanCareLIFE Consortium and the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. Lancet Oncol 2021; 22(2): e57-e67.
7. Kubota H, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2018; 99(1): 52-74.
8. Sadeghi Z, Ishaqi S, Dashi GR. The effect of folic acid and nicotinic acid on malondialdehyde levels of semen in oligospermia men after cryopreservation [in Persian]. J Isfahan Med Sch 2021; 38(603): 921-8.
9. Adetunji PF, Kyle E, Adetunji P F, Kyle E. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. Stem Cell Res 2018; 29: 207-14.
10. Yong KW, Laouar L, Elliott JA, Jomha NM. Review of non-permeating cryoprotectants as supplements for

- vitrification of mammalian tissues. *Cryobiology* 2020; 96: 1-11.
11. Liu X, Pan Y, Liu F, He Y, Zhu Q, Liu Z, et al. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of nanomaterials* 2021; 2021: 1-14.
 12. Liu X, Xu Y, Liu F, Pan Y, Miao L, Zhu Q, et al. The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. *Frontiers in Chemistry* 2021; 9: 648684.
 13. Lançoni R, Celeghini ECC, Alves MBR, Lemes KM, Gonella-Diaza AM, Oliveira LZ, de Arruda RP. Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 2018; 69: 78-83.
 14. Malekzadeh M, Takzaree N, Toolee H, Kazemzadeh S, Khanmohammadi N, Solhjoo S, et al. Cryoprotective effect of pentoxifylline on spermatogonial stem cell during transplantation into azoospermic torsion mouse model. *Reprod Sci* 2022; 29(2): 526-39.
 15. Tvrdá E, Mackovich A, Greifova H, Hashim F, Lukac N. Antioxidant effects of lycopene on bovine sperm survival and oxidative profile following cryopreservation. *Vet Med* 2017; 62(8): 429-36.
 16. Figueroa E, Farias J, Lee-Estevez M, Valdebenito I, Risopatrón J, Magnotti C, et al. Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 2018; 493: 1-8.
 17. Kazemzadeh S, Mohammadpour S, Madadi S, Babakhani A, Shabani M, Khanehzad M. Melatonin in cryopreservation media improves transplantation efficiency of frozen-thawed spermatogonial stem cells into testes of azoospermic mice. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13(1): 346.
 18. Azizollahi S, Aflatoonian R, Sadighi Gilani MA, Behnam B, Tajik N, Asghari-Jafarabadi M, et al. Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stem cells transplantation in testicular torsion-detorsion mice. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(6): 771-81.
 19. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-6.
 20. Khanehzad M, Nourashrafeddin SM, Abolhassani F, Kazemzadeh S, Madadi S, Shiri E, et al. MicroRNA-30a-5p promotes differentiation in neonatal mouse spermatogonial stem cells (SSCs). *Reprod Biol Endocrinol* 2021; 19(1): 85.
 21. Khanlari P, Khanehzad M, Khosravizadeh Z, Sobhani A, Barakzai S, Kazemzadeh S, et al. Effect of miR-30a-5p on apoptosis, colonization, and oxidative stress variables in frozen-thawed neonatal mice spermatogonial stem cells. *Biopreserv Biobank* 2021; 19(4): 258-68.
 22. Xie Y, Chen H, Luo D, Yang X, Yao J, Zhang C, et al. Inhibiting necroptosis of spermatogonial stem cell as a novel strategy for male fertility preservation. *Stem Cells Dev* 2020; 29(8): 475-87.
 23. Boroujeni MB, Peidayesh F, Pirnia A, Boroujeni NB, Ahmadi SAY, Gholami M. Effect of selenium on freezing-thawing damage of mice spermatogonial stem cell: a model to preserve fertility in childhood cancers. *Stem Cell Investig* 2019; 6: 36.
 24. Toolee H, Rastegar T, Solhjoo S, Mortezaee K, Mohammadipour M, Kashani IR, Akbari M. Roles for Kisspeptin in proliferation and differentiation of spermatogonial cells isolated from mice offspring when the cells are cocultured with somatic cells. *J Cell Biochem* 2019; 120(4): 5042-54.
 25. Kazemzadeh S, Rastegar T, Zangi BM, Malekzadeh M, Khanehzad M, Khanlari P, et al. Effect of a freezing medium containing melatonin on markers of pre-meiotic and post-meiotic spermatogonial stem cells (SSCs) after transplantation in an azoospermia mouse model due to testicular torsion. *Reprod Sci* 2021; 28(5): 1508-22.
 26. Solhjoo S, Akbari M, Toolee H, Mortezaee K, Mohammadipour M, Nematollahi-Mahani SN, et al. Roles for osteocalcin in proliferation and differentiation of spermatogonial cells cocultured with somatic cells. *J Cell Biochem* 2019; 120(4): 4924-34.
 27. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 2004; 36(6): 653-9.
 28. Sharma M, Srivastava A, Fairfield HE, Bergstrom D, Flynn WF, Braun RE. Identification of EOMES-expressing spermatogonial stem cells and their regulation by PLZF. *Elife* 2019; 8: e43352.
 29. Deng SL, Chen SR, Wang ZP, Zhang Y, Tang JX, Li J, et al. Melatonin promotes development of haploid germ cells from early developing spermatogenic cells of Suffolk sheep under in vitro condition. *J Pineal Res* 2016; 60(4): 435-47.
 30. Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, et al. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *J Pineal Res* 2014; 56(3): 333-42.
 31. Amidi F, Rashidi Z, Khosravizadeh Z, Khodamoradi K, Talebi A, Navid S, et al. Antioxidant effects of quercetin in freeze-thawing process of mouse spermatogonial stem cells. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2019; 8(1): 7-12.
 32. Aliakbari F, Heidari M, Hossini MA, Hosseini J. Increasing of post-freezing quality of Spermatogonial Stem Cells after pretreatment by vitamin E. *Men's Health Journal* 2019; 3(1): e1.
 33. Aliakbari F, Sedighi Gilani MA, Yazdekhashti H, Koruji M, Asgari HR, Baazm M, et al. Effects of antioxidants, catalase and α -tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017; 45(1): 63-8.

The Cryopreservation Effect of Melatonin on Neonatal Mouse Spermatogonial Stem Cells, Increasing Proliferation and Decreasing Apoptosis

Azim Hedayapour¹, Reihaneh Ebneyamin², Maryam Khanehzad³

Original Article

Abstract

Background: Considering the increasing infertility rate and the key role of spermatogonia stem cells (SSCs) in initiating spermatogenesis and maintaining fertility, trying to minimize the damage caused by long-term storage techniques of SSCs is considered as one of the important topics in basic research and clinic. Therefore, this study was designed to investigate the effect of melatonin on neonatal mouse spermatogonial stem cells following freezing and thawing.

Methods: Spermatogonial stem cells were isolated from neonatal mouse 3-5 days old BALB / C after enzymatic digestion and identified with IDA marker by flow cytometry. After culture, the cells were frozen in two groups: 1) control (basal cryopreservation) and 2) 100 μ M melatonin in basal cryopreservation for one month. After freezing-thawing process, the expression level of the apoptotic protein Caspase-3 and the expression of the proliferative protein Gfra1 in the cells were evaluated. The significance level was considered to be $P \leq 0.05$.

Findings: After freezing-thawing process, melatonin significantly reduced the expression of the apoptotic protein Caspase-3. Also, a significant increase in the expression of Gfra1 protein was reported in the presence of melatonin compared to the control group.

Conclusion: The results of this study indicate that melatonin as a cryoprotectant by reducing apoptosis and increasing proliferation of spermatogonial stem cells can be a suitable option for cryopreservation and long-term storage of cells and infertility treatment in the clinic.

Keywords: Spermatogonial Progenitor Cells; Melatonin; Cryoprotective Agent

Citation: Hedayapour A, Ebneyamin R, Khanehzad M. **The Cryopreservation Effect of Melatonin on Neonatal Mouse Spermatogonial Stem Cells, Increasing Proliferation and Decreasing Apoptosis.** J Isfahan Med Sch 2026; 43(838): 1488- 96.

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- MSc Student, Department of Anatomical Sciences and Reproductive Biology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Reproductive Biology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Maryam Khanehzad, Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Reproductive Biology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: m.khanehzad@med.mui.ac.ir