Original Article

Cytotoxic and antioxidant effect of chrysin on neonate mouse spermatogenic stem cells

Pordel M[1], Baharara J[2*], Amini E[3]

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

Received March 1, 2016; Accepted November 21, 2016

Abstract:

Background: So far, many plants have been used for the treatment of infertility. Several studies have revealed that chrysin (as an active metabolite) improves animals' reproduction. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of chrysin on Balb/C mice spermatogenic stem cells.

Materials and Methods: In this in vitro experimental study Balb/C neonate spermatogonia stem cells cultured in DMEM-F12 medium were treated with various concentrations of chrysin (2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml) for 6 and 12 days. Then the cytotoxicity was assessed using MTT, Akredin orange/Propodium Idid, DAPI and antioxidant concentration DCF-DA tests.

Results: Chrysin showed no remarkable cytoxicity in concentrations less than 5 µg/ml. While, after 6 days the viability of cells treated with chrysin 10, 20 and 40 µg/ml was decreased to 30, 45 and 56 % (P<0.05 and P<0.001, respectiely); after 12 days the viability of cells was decreased to 44, 56 and 65 % (P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectiely). DCF-DA results revealed a 80 % antioxidant capacity of chrysin in 5 and 2.5µg/ml concentrations.

Conclusion: Lower concentrations of chrysin has protective effect on Balb/C mice spermatogenic through improving cell viability, decreasing cells apoptosis and inhibiting free radicals.

Keyword: Chrysin, Antioxidant, Cytotoxicity, Infertility, Spermatogenic stem cells

* **Corresponding Author.**
Email: Baharara@yahoo.com
Tel: 0098 915 114 5434
Fax: 0098 513 843 7092

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2017; Vol. 21, No 2, Pages 126-133

Please cite this article as: Pordel M, Baharara J, Amini E. Cytotoxic and antioxidant effect of chrysin on neonate mouse spermatogenic stem cells. ***Feyz*** 2017; 21(2): 126-33.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

بررسی اثر سمیت سلولی و آنتی‌اکسیدانی کرایزین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جداشده از نوزاد موش کوچک آزمایشگاهی

مهران پردل [۱]، جواد بهارارا [۲*]، الهه امینی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: تاکنون گیاهان زیادی در درمان ناباروری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که کرایزین به‌عنوان یک متابولیت فعال موجود در شهد برخی گیاهان عملکرد تولید مثلی حیوانات را بهبود می‌بخشد. بنابراین، هدف این پژوهش بررسی اثر کرایزین بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش کوچک آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش سوری در محیط DMEM/F12 کشت شده با غلظت‌های مختلف کرایزین (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌مدت ۶ و ۱۲ روز تیمار شدند. سپس، سمیت توسط آزمون‌های MTT، اکردین اورنج/ پروپودیوم ایداید، DAPI و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توسط آزمون DCF-DA مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: کرایزین در غلظت‌های زیر ۵ میکروگرم سمیت معنی‌داری بر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز اعمال نکرد ($P>0/05$). در مقابل زیستایی این سلول‌ها تحت تاثیر دوزهای ۱۰، ۲۰ و۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین در روز ۶ پس از کشت به میزان ۳۰، ۴۵ و ۵۶ درصد ($P<0/05$* و $P<0/001$***) و در روز ۱۲ به میزان ۴۴، ۵۶ و ۶۵ درصد کاهش معنی‌دار یافت ($P<0/05$، $P<0/01$ و $P<0/001$). نتایج آزمون DCF-DA نشان داد که کرایزین در غلظت‌های ۵، ۲/۵ میکروگرم دارای ۸۰ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی است.

نتیجه‌گیری: کرایزین در غلظت‌های پایین می‌تواند اثر حفاظتی روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش سوری داشته باشد که از طریق افزایش زیستایی سلول‌ها، کاهش آپوپتوز سلول‌ها و مهار رادیکال‌های آزاد اثر خود را ایفا می‌کند.

واژگان کلیدی: کرایزین، آنتی‌اکسیدان، سمیت سلولی، ناباروری، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۶، صفحات ۱۳۳-۱۲۶

مقدمه

باروری در تداوم و ثبات زندگی زوجین نقش مهمی دارد و به‌طور کلی در تمام دنیا ۱۵ درصد افراد نابارورند [۱]. ناباروری یکی از معضلات مهم سلامتی به‌شمار رفته که به‌دلیل وارد شدن آسیب به سیستم تولید مثلی و اختلال در عملکرد گنادها به‌وجود می‌آید. تقریبا ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به عوامل مردانه است [۲]. عوامل متعددی هم‌چون میدان‌های مغناطیسی، پرتوهای یونیزان و استعمال دخانیات و برخی داروها منجر به افزایش ناباروری در مردان می‌شوند. از طرفی به‌دلیل موثر بودن برخی داروهای گیاهی در افزایش میزان باروری در مردان، تحقیقات گسترده‌ای برای کشف مواد فعال زیستی که بتوانند بر مشکل ناباروری مردان غلبه کنند، صورت گرفته است [۳].

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

[۲] استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد

[۳] استادیار، گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۵۱۱۴۵۴۳۴ **دورنویس:** ۰۵۱۳ ۸۴۳۷۰۹۲

پست الکترونیک: baharara@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۹/۱

از جنبه دیگر، در بیمارانی که مبتلا به سرطان و سایر بیماری‌های سیستم تناسلی هستند، اسپرم آسیب دیده افزایش یافته که منجر به ناباروری می‌شود [۴]. ازاین‌رو، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌تواند نقش مهمی در درمان ناباروری ایفا کند [۵]. دانشمندان برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تمایز نیافته بسیار تلاش کرده و برای شناسایی آن‌ها از مارکرهای خاصی استفاده کرده‌اند [۶]. مطالعات نشان داده‌اند عدم تعادل و ازدیاد تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) فاکتور مهمی است که در ناباروری نقش داشته و باعث اختلال در عملکرد اسپرم می‌شود. در مردان نابارور وجود مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد در مایع منی ممکن است یکی از دلایل ناباروری در این افراد به‌حساب آید [۹-۷]. از منابع اصلی تولید ROS در مایع منی می‌توان به سلول‌های تولید کننده کلوسیت‌های سمینال و اسپرم غیرطبیعی در انسان اشاره کرد [۱۰]. لذا، عوامل محافظتی در برابر ROS مانند آنتی-اکسیدان‌ها می‌توانند معرف‌های درمانی مفیدی برای ناباروری مردان باشند [۱۱]. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان حذف کننده رادیکال-های آزاد، اسپرم را در برابر آسیب القا شده توسط ROS محافظت می‌کنند [۱۲]. انجام مطالعات روی عوامل آنتی‌اکسیدانی جدید به-منظور جلوگیری از آسیب‌های سوخت‌وساز سلول اسپرم ممکن است باعث افزایش تحرک، مورفولوژی طبیعی و افزایش ظرفیت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

لقاح یابی در اسپرم شود [۱۳]. فلاونوئیدها گروه بزرگی از رنگ-دانه‌های گیاهی هستند که از نظر ساختاری، گروه متفاوتی از ترکیبات پلی‌فنولی بوده و فعالیت‌های زیستی متعددی مانند ضد حساسیت، ضد ویروس، ضد التهاب و ضد سرطانی دارند [۱۴]. کرایزین (۵ و ۷ –دی‌هیدروکسی فلاون) یک فلاونوئید طبیعی است و در سطح بالا در عسل، موم و شهد بعضی از گیاهان وجود دارد. این ترکیب از نظر ساختاری دارای ساختار مشترک فلاون‌ها به‌علاوه هیدوکسیل‌های اضافی در موقعیت‌های ۵ و ۷ حلقه A است [۱۴]. کرایزین دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است [۱۵]. بااین‌حال، مکانیسم اثر این ترکیب به‌طور دقیق شناخته شده نیست. تصور بر این است که اثرات سودمند کرایزین شاید به‌دلیل توانایی در حذف رادیکال‌های آزاد باشد [۱۵]. در سال‌های اخیر برخی از مطالعات نشان داده‌اند که کرایزین به‌عنوان یک مهار کننده قوی آنزیم آروماتاز است که باعث تبدیل هورمون تستوسترون به استرادیول می‌شود. به‌علاوه تحقیقات نشان داده‌اند مصرف کرایزین به‌طور چشم‌گیری عملکرد تولید مثلی حیوانات را بهبود می‌بخشد [۱۶]. هدف از انجام این پژوهش بررسی سمیت و اثر آنتی-اکسیدانی کرایزین روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش کوچک آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش تجربی حاضر به‌منظور بررسی اثر کرایزین یک ترکیب فعال بیولوژیکی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش نر ۳ تا ۱۰ روزه نژاد Balb/C صورت گرفته است. بدین منظور تعداد ۳۰ بیضه از موش‌های نابالغ به‌روش مکانیکی تهیه شد و بعد از شستشو و جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (شرکت ایده‌زیست، ایران) همراه با SFM (محیط عاری از سرم) (شرکت ایده‌زیست، ایران) به همراه غلظت‌های مختلف کرایزین کشت داده شدند. برای تهیه غلظت‌ها از بالاترین غلظت شروع کرده و مقدار آن‌ها از طریق فرمول $N_1V_1=N_2V_2$ به-دست آمده و در شش گروه به‌صورت تصادفی (گروه کنترل بدون دریافت کرایزین، و گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به‌ترتیب با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کرایزین که با PBS (بافر نمکی فسفات) حل شده بودند) تقسیم شدند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

بدین‌منظور، موش نر ۱۰ روزه بیهوش شد. بافت بیضه موش جدا شده و داخل محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی-سیلین–استرپتومایسین) شستشو داده شد. سپس بافت تکه‌تکه شده، ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر کلاژناز اضافه به آن شده و ۱۵ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه بیوپسی بافت بیضه از داخل انکوباتور خارج شده، به آن تریپسین اضافه شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار گرفت. سپس، سوسپانسیون سلولی از انکوباتور خارج گردید و با سرعت RPM ۲۰۰۰ و به-مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد. سپس، به سوسپانسیون سلولی محیط DMEM-F12 ۱۰ درصد (شرکت ایده‌زیست، ایران) اضافه شد و درون پلیت پوشیده شده با ژلاتین ۰/۲ درصد کشت داده شد. پس از ۸ ساعت محیط رویی سلول‌ها خارج شده و به سلول‌ها محیط حاوی فاکتور رشد فیبروبلاستی به میزان ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و سرم ۱۰ درصد افزوده شد و تا روز ۴ (زمان شناسایی سلول‌های بنیادی) زیر میکروسکوپ بررسی شدند (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

آزمون آلکالین فسفاتاز جهت ردیابی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

چهار روز بعد از جداسازی و کشت، سلول‌ها در معرض فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. سپس، توسط محلول تریس (pH=۸/۹) شستشو شدند و به آن سوبسترای نفتل فسفات ۰/۰۱ و نمک ویوله ۰/۰۶ درصد اضافه شد. سپس، ۲ بار با آب شستشو شده و سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره۳) [۱۷].

آزمون MTT (دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیوم بروماید)

جهت بررسی سمیت کرایزین بر سلول‌های بنیادی اسپرم-ساز، سلول‌ها در محیط DMEM-F12 حاوی۱۰ در صد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین–استرپتومایسین (Gibco، آمریکا) درون انکوباتور ۳۷ درجه کشت شدند و سپس آزمون MTT (Applichem، آلمان) صورت گرفت. برای این منظور ۲×۱۰^{۴} سلول در خانه‌های پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و با غلظت‌های مختلف کرایزین (۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر حل شده در آب مقطر) به‌مدت ۶ و ۱۲ روز تیمار شدند. پس از این مدت سلول‌ها ۴ ساعت در معرض رنگ MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفته و DMSO جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت جذب در ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Epoch، آمریکا) خوانده شد [۱۸].

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

آزمون فلورسنت اکریدین اورنج/ پروپودیوم یداید و DAPI (۴ و ۶-دی‌آمیدینو ۲-فنیل ایندول)

رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/پروپودیوم یداید برای تشخیص سلول‌های زنده از مرده و رنگ‌آمیزی DAPI به‌منظور بررسی مورفولوژی هسته به‌کار می‌رود. برای این منظور، ۶ روز پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف کرایزین، برای رنگ آمیزی اکریدین اورنج به سلول‌های گروه کنترل (فاقد تیمار) و تیمار ۱۰ میکرولیتر اکریدین اورنج و ۱۰ میکرولیتر پروپودیوم یداید اضافه شد. برای رنگ آمیزی DAPI نیز روی سلول‌های گروه کنترل و تیمار متانول جهت تثبیت افزوده شده و سپس در معرض رنگ با دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفته و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کرایزین بر سلول‌های بنیادی اسپرم-ساز

سلول‌ها به تعداد ۲×۱۰^{۴} در پلیت ۹۶ خانه کشت و بعد از گذشت ۲۴ ساعت توسط غلظت‌های مختلف کرایزین (۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. بعد از ۶ روز محیط رویی سلول‌ها برداشته شده و سلول‌ها در معرض ۵۰ میکرو-لیتر H_2O_2 در ۳۷ درجه برای ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس به سلول‌های کف پلیت DCFH-DA (دی‌کلرودی‌هیدروفلورسئین دی‌استات) ۵ میکرومولار اضافه شد. دور پلیت فویل آلومینیومی پیچیده شده و شدت فلورسنس DCF توسط فلوریمتر مورد بررسی قرارگرفت.

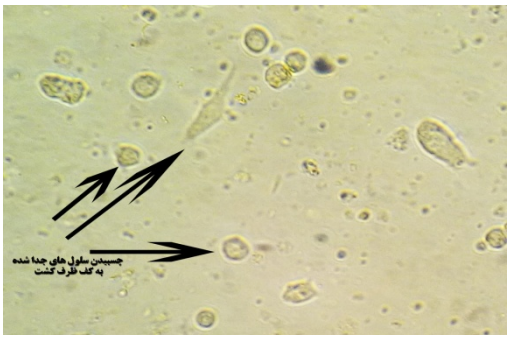
آنالیز آماری

آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS، آزمون ANOVA یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن برای بررسی مقایسه میانگین گروه‌های مختلف کنترل و تیماری در تست‌هایی مثل MTT و DCFDA استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده و سطح $P<۰/۰۵$ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

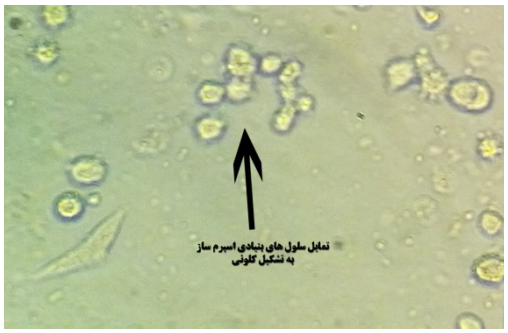
نتایج

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

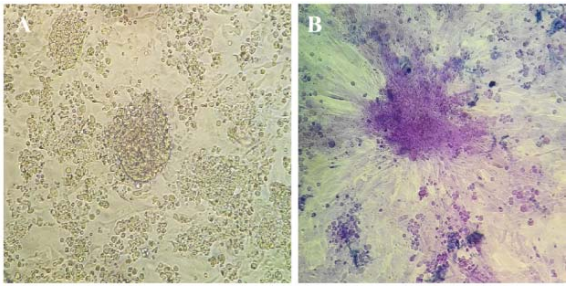
آزمون فعالیت آلکالین فسفاتازی نشان داد که پس از گذشت ۴ روز سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک کلونی‌هایی را ایجاد نمودند که به رنگ آبی مایل به بنفش از سایر سلول‌های قابل تشخیص بودند که از بارزترین مارکرهای شناسایی سلول بنیادی به‌شمار می‌روند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش سوری ۱۰ روزه ۱ روز پس از کشت



شکل شماره ۲- مورفولوژی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش نر ۱۰ روزه ۲ روز پس از کشت

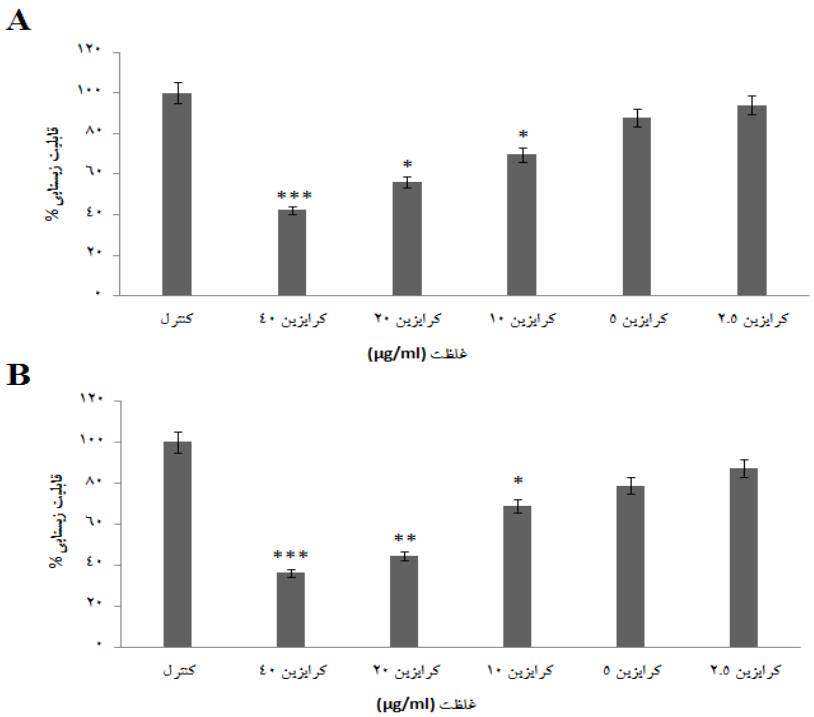


شکل شماره ۳- A: حضور کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ۴ روز پس از کشت؛ B: ظهور رنگ آبی که بیانگر فعالیت بالای آلکالین فسفاتازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موشی است.

آزمون سمیت سلولی

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که کرایزین در غلظت‌های زیر ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روزهای ۶ و ۱۲ پس از کشت سمیت معنی‌داری روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز اعمال نکرد ($P>۰/۰۵$). این در حالی است که زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت تاثیر دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین در روز ۶ پس از کشت به میزان ۳۰/۳۳±۰/۰۲، ۴۳/۸۹±۰/۰۳ و ۵۷/۷۹±۰/۰۴ درصد و در روز ۱۲ به‌میزان ۳۱/۰۹±۰/۸، ۵۵/۶۳±۰/۰۲ و ۶۳/۸۷±۰/۰۸ درصد کاهش یافت. (نمودار شماره ۱).

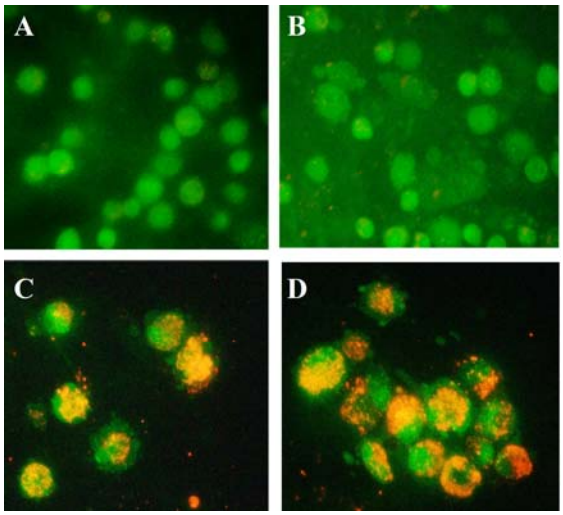
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]



نمودار شماره ۱- اثر کرایزین بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ۶ (A) و ۱۲ روز (B) پس از تیمار توسط سنجش MTT. نتایج نشان داد که دوزهای کمتر از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین کاهش معنی‌داری بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ندارد ($P>0/05$ *، $P>0/01$ **) و $P>0/001$*** معنی‌داری بین گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد).

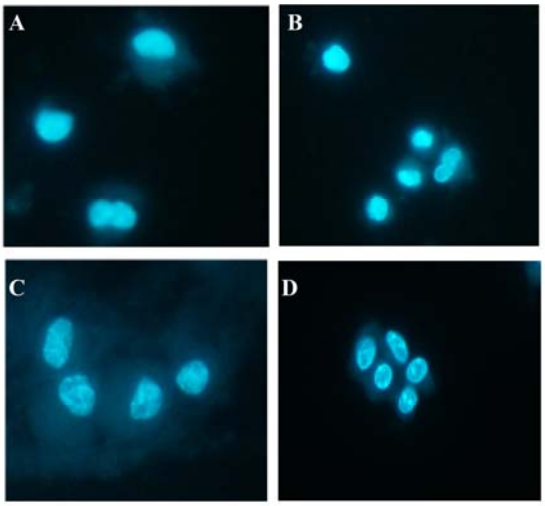
رنگ آمیزی فلورسنت

نتایج حاصل از رنگ آمیزی افتراقی اکریدین اورنج/ پروپودیوم یداید نشان داد که در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین، اغلب سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش به رنگ سبز در-آمدند که نشان دهنده زنده بودن سلول‌ها و موید عدم سمیت غلظت‌های زیر ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنیک موش است (میزان زیستایی ۹۶/۱۵ درصد)، این درحالی‌است‌که کرایزین در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نفوذ کرده و موجب کاهش زیستایی این سلول‌ها (به‌ترتیب ۵۸/۹۷ و ۳۹/۷۴ درصد) شده است (شکل شماره ۴). رنگ‌آمیزی DAPI نیز نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در غلظت‌های غیرسمی کرایزین (زیر ۵ میکرو-گرم بر میلی‌لیتر) تاثیری روی مورفولوژی هسته نداشته که بیان‌گر اثر حفاظتی کرایزین در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش است (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۴ – رنگ آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم یداید نشان-دهنده عدم نفوذ رنگ پروپودیوم یداید به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش ۶ روز پس از تیمار با غلظت ۵ کرایزین و زیستایی سلول‌ها است. درحالی‌که در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ کرایزین زیستایی سلول‌ها کاهش یافته است. A، گروه کنترل؛ B، تاثیر غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین، نشان‌دهنده عدم نفوذ رنگ پروپودیوم یداید به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز؛ C و D، تاثیر غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین، نشان‌دهنده نفوذ رنگ پروپودیوم یداید به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و کاهش زیستایی سلول‌ها.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]



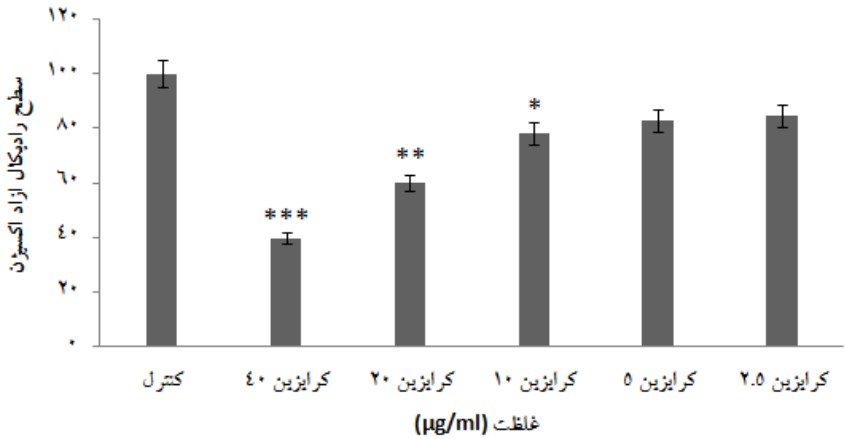
شکل شماره ۵ – رنگ آمیزی DAPI نشان‌دهنده عدم تغییر در هسته سلول‌های بنیادی اسپرم ساز موشی ۶ روز پس از تیمار با غلظت ۵ کرایزین و زیستایی سلول‌ها است در حالی که در غلظت ۲۰ و ۴۰ کرایزین مورفولوژی هسته تغییر یافته است. A، گروه کنترل؛ B، تاثیر غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین، نشان‌دهنده عدم تغییر در هسته سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش؛ C و D، تاثیر غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کرایزین، مورفولوژی هسته تغییر یافته و هسته تکه‌تکه شده است.

پتانسیل آنتی اکسیدانی کرایزین

کاهش شدت فلورسنس DCF نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کرایزین بوده و نشان می‌دهد که کرایزین در غلظت‌های مختلف از طریق کاهش ROS داخل سلولی در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز اثر حفاظتی خود را بر این سلول‌ها را اعمال می‌کند (نمودار شماره ۲).

بحث

تا به امروز تحقیقات نشان داده‌اند که عوامل محیطی و ژنتیکی در ناباروری مردان موثر هستند که با آسیب رساندن به دودمان سلول‌های زاینده می‌توانند بر باروری مردان اثر مضری داشته باشند [۱۹]. در این رابطه به‌کارگیری ترکیباتی که بتوانند ضمن تقویت فرد بر سلول‌های زاینده جنس نر اثر مثبتی داشته باشند، می‌تواند آیتم مهمی در حفظ باروری فرد به‌شمار رود [۲۰]. اکسیژن به‌عنوان فعال کننده این سیگنال‌های درون سلولی شناخته شده است، لذا ازآنجایی‌که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز حساسیت بالایی به اکسیژن فعال دارند و بیشتر در معرض آپوپتوز هستند، به‌کارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که بتواند باعث مهار آپوپتوز سلولی شود، در این زمینه جهت حفظ زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موثر به‌نظر می‌رسد [۲۱]. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف کرایزین، به‌عنوان یک ماده بیولوژیک، بر زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی فعالیت میتوکندریایی آیتم مهمی است که جهت بررسی میزان زیستایی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش از دو بازه زمانی ۶ و ۱۲ روز به‌منظور بررسی زیستایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کرایزین استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف کرایزین ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ظرف ۶ و ۱۲ روز اثر سمیت معنی‌داری روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ندارد.



نمودار شماره ۲– ارزیابی سطح ROS درون سلولی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کرایزین نشان‌دهنده ظرفیت آنتی اکسیدانی این ترکیب فعال طبیعی است ($P<0.05$*، $P<0.01$** و $P<0.001$*** معنی‌داری بین گروه‌های تیماری نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

از طرف دیگر، رنگ آمیزی اکریدین اورنج/پروپودیوم یداید و DAPI نشان داد که تحت تیمار با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ کرایزین سلول‌ها به رنگ سبز درآمده و دارای هسته دست نخورده بودند که نشان‌گر عدم سمیت این غلظت‌ها روی سلول‌های بنیادی اسپرم می‌باشد. رنگ‌های مذکور در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ کرایزین به سلول‌های بنیادی نفوذ کرده که رنگ قرمز و تغییر مورفولوژی هسته‌ها بیان‌گر این مطلب است و در بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کرایزین روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بعد از شش روز تیمار سلول‌ها با غلظت‌های (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰) میکروگرم بر میلی-لیتر نشان داد که کرایزین در غلظت‌های ۵ و ۲/۵ میکروگرم دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ روی ۱۶ سر موش صحرایی دارای رژیم روزانه کرایزین (۵۰ میلی‌گرم به کیلوگرم) به‌مدت ۶۰ روز صورت گرفت، نتایج نشان داد کرایزین به‌عنوان یک مهارکننده قوی آنزیم آروماتاز است که باعث تبدیل هورمون تستوسترون به استرادیول می‌شود، به علاوه تحقیقات نشان داده که مصرف کرایزین به‌طور قابل توجهی عملکرد تولید مثلی حیوانات را بهبود می‌بخشد [۲۲]. بیان شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش ROS نقش مهمی در اختلال عملکرد اسپرم بیماران ناباروری دارد. بنابراین، بدن باید بتوان به طریقی میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کاهش داده تا مانع آسیب به اسپرم‌ها و کاهش باروری شود [۲۳]. گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن توسط آنتی‌اکسیدان‌ها غیرفعال می‌شود، لذا آنتی-اکسیدان‌ها آسیب اکسیداتیو را کاهش داده و میزان باروری اسپرم را افزایش می‌دهند [۲۴]. ROS جزو محصولات میانجی فسفریل سازی اکسایشی است و با سطوح کافی از دیسمیوتاز فرااکسایشی (SOD)، گلوتاسیون پروکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT) از بین می‌رود؛ کرایزین می‌تواند با افزایش SOD، GPx، و CAT باعث از بین رفتن ROS شود [۲۵]. یافته‌های این پژوهشگران با نتایج پژوهش حاضر مبنی بر اثر آنتی‌اکسیدانی کرایزین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که کرایزین می‌تواند در غلظت‌های زیر ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با دارا بودن سمیت سلولی پایین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا مکمل مناسبی برای حفظ بقاء سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش سوری در تحقیقات ناباروری باشد.

تشکر و قدردانی

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

References:

[1] Venkatesh T, Suresh PS, Tsutsumi R. New insights into the genetic basis of infertility. ***Appl Clin Genet*** 2014; 7: 235-43.
[2] Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. ***Spermatogenesis*** 2012; 2(4): 253-63.
[3] 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): 715-726.
[4] Vasei N, Baharara J, Zafar Balanezhad S, Amini E. An investigation of the protective impact exerted by aqua extract of Persian Gulf sea cucumber (Holothuria arenicola Semper, 1868) against damages induced by electromagnetic field on male gonads of Balb/C mice. – *Nova Biol. **Reperta*** 2015; 2: 216-26.
[5] Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. ***Spermatogenesis*** 2011; 1(2): 116-20.
[6] Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stemcells: mouse and human comparisons. ***Birth Defects Res C Embryo Today*** 2009; 87(1): 27-43.
[7] Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. ***World J Mens Health*** 2014; 32(1): 1-17.
[8] Safarinejad MR. Infertility among couples in a population-based study in Iran: prevalence and associated risk factors. ***Int J Androl*** 2008; 31(3): 303-314.
[9] Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. ***BJU Int*** 2005; 95(4): 503-7.
[10] Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Kumar R, et al. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation iidiopathic oligoasthenozoospermic men. ***Indian J Biochem Biophys*** 2009; 46(2): 172-7.
[11] Walczak–Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska–Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. ***Cent European J Urol*** 2013; 66(1): 60-67.
[12] Safarnavadeh T, Rastegarpanah M. Antioxidants and infertility treatment, the role of

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]

Satureja Khuzestanica: A mini-systematic review. ***Iran J Reprod Med*** 2011; 9(2): 61-70.
[13] Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. ***Nature*** 2007; 449(7160): 346-50.
[14] Amini Sarteshnizi N, Teimori H, Zahri S, Mobini Dehkordi M, et al. Effect of Chrysin on AGS human gastric cancer cell line. ***J Gorgan Uni Med Sci*** 2015; 16(4): 63-8. [in Persian]
[15] Ciftci O, Ozdemir I, Aydin M, Beytur A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. ***Andrologia*** 2012; 44(3): 181-6.
[16] Mehri S, Veis Karami H, Vahdati Hassani F, Hosseinzadeh H. Chrysin Reduced Acrylamide-Induced Neurotoxicity in Both in vitro and in vivo Assessments. ***Iran Biomed J*** 2014; 18(2): 101-6.
[17] Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. ***FASEB J*** 2009; 23(7): 2076-87.
[18] Amini E, Baharara J, Nikdel N, Salek Abdollahi F. Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects of Honey Bee Venom and Chrysin on Human Ovarian Cancer Cells. ***Asia Pacific J Med Toxicol*** 2015; 4(2): 68-73.
[19] Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuki M, Yamamoto M, Simons BD, et al. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. ***Cell Stem Cell*** 2014; 14(5): 658-72.
[20] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C. Antioxidant supplements and mortality. ***Curr Opin Clin Nutr Metab Care*** 2014; 17(1): 40-4.
[21] Gholami M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Mohammadi-asl J. Melatonin improves spermatogonial stem cells transplantation efficiency in azoospermic mice. ***Iran J Basic Med Sci*** 2014; 17(2): 93-9.
[22] Ciftci O, Ozdemir I, Aydin M, Beytur A, Beneficial effects of chrysin on thereproductive systemof adult male rats. ***Andrologia*** 2012; 44(3): 181-6.
[23] Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. ***J Urol*** 1997; 157(1): 140-3.
[24] Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. ***J Dairy Sci*** 1993; 76(9): 2812-23.
[25] Bekdeşer B, Durusoy N, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from herbal teas and evaluation of their in vitro hypochlorous acid scavenging activity. ***J Agric Food Chem*** 2014; 62(46): 11109–15.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-30]