Journal of Cell and Tissue 13(3), Autumn (2022) 235-247

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Effect of duloxetine as antidepressant on TM4 Sertoli cells: Evaluation of Bax and Cx43 gene expression

Makvandian M[a], Azarnia M[b]* , Amini E[b] , Zeinali H[c], Niknejad A[d]

[a] M.Sc., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

[b] Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, azarnia@khu.ac.ir

[c] Ph.D., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

[d] Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Makvandian M, Azarnia M , Amini E , Zeinali H, Niknejad A. Effect of duloxetine as antidepressant on TM4 Sertoli cells: Evaluation of Bax and Cx43 gene expression. Journal of Cell and Tissue. 2022;13(3):235-247.

https://10.52547/JCT/13.3. 235

KEYWORDS

Depression, Duloxetine, Sertoli cell, Apoptosis, Gap junctions

ABSTRACT

Aim: One of main challenges in worldwide is increasing rate of depression and sexual dysfunction associated with antidepressant drug consumption. Regarding the role of Sertoli cells in spermatogenesis, this study investigated the effect of duloxetine on viability, apoptosis and expression of Bax and Cx43 (Connexin 43) expression in Sertoli cells.

Material and Methods: TM4 Sertoli cells were cultured in DMEM/F12 medium containing 2.5% FBS, 5% horse serum and 1% penicillin-streptomycin. Cells were treated with different doses of duloxetine (3.75, 7.5, 15, 30, 60 µg/ml) for 24 to 72 hours. MTT assay was performed to evaluate cell viability. The rate of apoptosis was measured by flow cytometry and RT-qPCR was performed to evaluate of Bax (proapoptotic gene) and Cx43 (essential for spermatogenesis) genes.

Results: Duloxetine reduced cell survival in a dose and time-dependent manner. On the basis of MTT data, IC50 was calculated as 15 µg/ml duloxetine ($p \leq 0.05$). TM4 cell apoptosis increased compared to the control group at a dose of 15 µg/ml duloxetine ($p \leq 0.01$). RT-qPCR results showed increased expression of Cx43 ($p \leq 0.05$) and Bax ($p \leq 0.01$) genes under the influence of duloxetine.

* Corresponding author. Tel.: +98-21-86072709; Fax: +98-21-86072709
E-mail address: azarnia@khu.ac.ir

DOI: https://10.52547/JCT/13.3.235

Received: Jul 6, 2022; Received in revised form: Oct 16, 2022; Accepted: Oct 19, 2022

Original Article

© Author

Conclusion: Considering the flow cytometry data and the increased expression of Bax, duloxetine may induce apoptosis in Sertoli cells and may be a negative and destructive factor for spermatogenesis process. On the other hand, by increasing the expression level of Cx43 gene, duloxetine increases the molecular communication via gap junctions between Sertoli cells and transmits apoptosis-promoting signals to spermatogenic cells which can influence spermatogenesis quantification.

سلول و بافت، دوره ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۲۳۵ تا ۲۴۷

سلول و بافت

اثر داروی ضدافسردگی دولوکستین بر سلول‌های سرتولی TM4: بررسی بیان ژن‌های Bax و *Cx43*

مژده مکوندیان[۱]، مهناز آذرنیا[۲]*، الهه امینی[۲]، حدیث زینلی[۳] ، آزاده نیک نژاد[۴]

[۱] کارشناس ارشد تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[۲] گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران ، azarnia@khu.ac.ir

[۳] دکتری تخصصی تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[۴] گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

واژگان کلیدی

افسردگی، دولوکستین، سلول سرتولی، آپوپتوز، اتصالات شکافدار

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۷

چکیده

هدف: از چالش‌های عمده بشریت افزایش افسردگی و اختلال عملکرد جنسی ناشی از داروهای ضدافسردگی است. با توجه به نقش سلول‌های سرتولی در اسپرماتوژنز، پژوهش حاضر، اثر داروی دولوکستین را بر زنده‌مانی، آپوپتوزیس و بیان ژن‌های Bax و Cx43 (Connexin 43) در سلول‌های سرتولی بررسی کرده است. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های TM4 در محیط DMEM/F12 حاوی ٪۲/۵ FBS، ٪۵ سرم اسب و ٪۱ پنی سیلین-استرپتومایسین کشت شدند. دولوکستین با دوزهای ۳۰،۶۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت روی سلول‌ها اثر داده شد. آزمون MTT جهت ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها، فلوسایتومتری جهت ارزیابی آپوپتوزیس و RT-qPCR جهت بررسی بیان ژن Bax (عامل پیش‌برندهٔ آپوپتوزیس) و Cx43 (ضروری برای اسپرماتوژنز) انجام شد. **نتایج:** دولوکستین در یک الگوی وابسته به دوز و زمان، بقای سلولی را کاهش داد. بر اساس داده‌های MTT دوز IC50 ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت محاسبه گردید ($p\leq0.05$). آپوپتوزیس سلول‌های TM4 نسبت به گروه کنترل در دوز میانه مهاری ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر دولوکستین، افزایش یافت ($p\leq0.01$). RT-qPCR حاکی از افزایش بیان ژن‌های Cx43 ($p\leq0.05$) و Bax ($p\leq0.01$) تحت تاثیر دولوکستین بود. **نتیجه‌گیری:** با توجه به داده‌های فلوسایتومتری و افزایش بیان ژن Bax، دولوکستین با القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرتولی می‌تواند عاملی منفی و مخرب در پیشبرد اسپرماتوژنز در نظر گرفته شود. از سوی دیگر، دولوکستین با افزایش سطح بیان ژن Cx43، نقل و انتقالات مولکولی توسط اتصالات شکافدار را بین سلول‌های سرتولی افزایش داده و می‌تواند باعث انتقال سیگنال‌های پیش برنده آپوپتوزیس به سلول‌های دودومان اسپرماتوژنیک و در نتیجه کاهش کیفیت اسپرماتوژنز شود.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱-۸۶۰۷۲۷۰۹، فکس:۰۲۱ ۸۶۰۷۲۷۰۹

آدرس پست الکترونیک: azarnia@khu.ac.ir

۱- مقدمه

عواملی مانند افسردگی و اضطراب با کاهش میزان باروری در ارتباط هستند، همچنین افسردگی یکی از شایع‌ترین اختلالات روانپزشکی در سراسر جهان است و تقریبا ۲۰ درصد از مردم در طول زندگی خود این بیماری را تجربه می‌کنند (۱). شیوع افسردگی در جمعیت‌های مختلف ایرانی از ۶۹/۵ تـا ۷۳ درصـد متغیـر است و احتمال بروز این اختلال در سنین بزرگسالی افزایش می‌یابد. از طرف دیگر مصرف داروهای روان‌پزشکی با اثر بر هیپوتالاموس، هیپوفیز و گنادها می‌توانند بر عملکرد جنسی تاثیرگذار باشند (۲). در رابطه با استفاده داروهای ضدافسردگی و اثر بر باروری مردان، مطالعات اندکی انجام شده است. در خصوص مکانیسم عمل داروهای ضد افسردگی نشان داده شده است این داروها با تغییر عدم تعادل شیمیایی نوروترانسمیترها در مغز به کاهش علایم افسردگی کمک می‌کنند. این داروها بازجذب نوروترانسمیترها از طریق گیرنده‌های انتخابی را مهار کرده و در نتیجه موجب افزایش غلظت نوروترانسمیترهای خاص در اطراف اعصاب در مغز می‌شوند (۳). داروهای ضد افسردگی فعلی به چهار گروه اصلی طبقه بندی شده‌اند: داروهای ضد افسردگی سه حلقه‌ای، مهارکننده‌های انتخابی بازگشت سروتونین یا SSRIها (Selective serotonin Reuptake Inhibitors)، مهارکننده‌های بازگشت مجدد سروتونین-نوراپی نفرین SNRIها (Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors) و مهارکننده‌های مونوآمین اکسیداز. SSRI ها به‌صورت اختصاصی با مسدود کردن کانال نورون سروتونرژیک، مانع بازجذب نوروترانسمیتر سروتونین توسط همان نورون تولید کننده می‌شوند. در نتیجه میزان سروتونین در فضای سیناپسی جهت انتقال به نورون پس سیناپسی افزایش می‌یابد. SNRIs نیز عملکردی مانند SSRIs دارند، اما به‌طور همزمان مانع بازجذب هر دو نوروترانسمیتر سروتونین و نوراپی‌نفرین می‌شوند (۴،۵).

ناباروری یکی از مشکلات رایج برای زوجین است که عوامل محیطی همچون در معرض قرار گرفتن با ترکیبات شیمیایی و داروها نقش به‌سزایی در شکل‌گیری آن دارند (۶). در سیستم تولیدمثلی مردان، سلول‌های سرتولی نقش بسیار مهمی در فرآیند تعیین جنسیت مردان در زمان جنینی، فرایند اسپرماتوژنز و تولید اسپرم در هنگام بلوغ دارند. تعداد این سلول‌ها در بیضه با حجم بیضه، میزان تولید اسپرم و در نهایت میزان باروری ارتباط دارد (۷). بنابراین هرگونه اختلال در متابولیسم طبیعی سلول‌های سرتولی ممکن است باعث اختلال در عملکرد بیضه شود. از طرفی با توجه به استفاده رایج داروهای ضدافسردگی توسط جوانان به‌صورت دراز مدت، اثرات آن‌ها روی باروری و عملکرد جنسی نگران کننده است (۸). دولوکستین یک داروی ضدافسردگی مهارکننده بازجذب سروتونین است که که با مهار ترانسپورترها (حاملین جذب) سروتونین و نوراپی‌نفرین موجب مهار بازجذب این نوروترانسمیترها شده برای درمان دراز مدت بیماران مبتلا به افسردگی حاد و بی اختیاری ادرار مورد استفاده قرار می‌گیرد و متابولیسم این دارو از طریق آنزیم CYP450 کبد می‌باشد (۹). اما نکته قابل توجه این است که از نظر فارماکولوژی، مکانیسم عمل دقیق این دارو ناشناخته است.

مطالعات نشان داده است که از آن‌جا که در پستانداران تکثیر سلول‌های سرتولی در بیضه‌های بالغ در شرایط طبیعی مشاهده نمی‌شود تعداد کل سلول‌های سرتولی در بزرگسالی ناشی از دوران جنینی، نوزادی و عوامل محیطی است، به این معنی که تعداد آن‌ها در طول عمر فرد ثابت است و تقسیم میتوز رخ نمی‌دهد. پس هورمون‌ها، عوامل محیطی، مسیرهای سیگنالینگ و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در تکثیر سلول‌های سرتولی برای تمایز اسپرم و اسپرماتوژنز مهم هستند (۱۰). از طرفی این نکته حائز اهمیت است که وجود سلول‌های سرتولی برای تولید اسپرم ضروری است. این سلول‌ها با ترشح انواع فاکتورهای رشد در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقش دارند و از طریق مسیرهای مختلف سیگنال باعث حمایت، پشتیبانی، تغذیه و محافظت از سلول‌های دودمان اسپرماتوژنیک می‌شود (۱۱).

اتصالات بین سلول‌های سرتولی با سلول‌های سرتولی دیگر و سلول‌های زایا در پیشبرد عملکرد این سلول‌ها بسیار مهم هستند و اغلب هدف بسیاری از سموم می‌باشند. درواقع اغلب سموم و داروها با تاثیر مخرب بر سلول‌های سرتولی، عملکرد بیضه را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۲). این تعاملات سلول- سلول در تولید مولکول‌های متعددی مانند هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، پروتئازها، مهارکننده‌های پروتئاز و اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) توسط سرتولی و سلول‌های زایا نقش داشته و در صورت اختلال در هر یک از این موارد روند اسپرماتوژنز نیز مختل می‌شود (۱۳). از این رو اتصالات اتصالات شکاف دار و اتصالات محکم نه تنها محل اتصال بین این سلول‌ها هستند، بلکه در تنظیم میزان تکثیر و تمایز سلولی نیز نقش دارند. مطالعات نشان داده است از دست دادن ژن GJA1 در سلول‌های سرتولی با ایجاد اختلال در تنظیم پروتئین‌های اتصال دهنده و چسبنده مانند N-cadherin ، β-catenin ، Occludin و Zonadhesin-1 همراه است و نشان‌دهنده نقش مهم ژن GJA1 در تکامل سلول سرتولی است (۱۴،۱۵). از این رو باید در زمینه حفظ باروری در مردان تاثیر داروها بر سلول‌های سرتولی در نظر گرفته شود و مطالعات بیشتری در رابطه با اثر برخی داروها روی این سلول‌ها انجام شود.

تحقیقات نشان داده است افسردگی خود به تنهایی بر روی باروری تاثیر بسزایی دارد، از سوی دیگر، درمان اختلال افسردگی توسط داروها نیز اثرات مبهمی بر سیستم تولیدمثلی دارد. بنابراین می‌توان با پژوهش بر روی اثرات مصرف داروهای ضدافسردگی، اطلاعات بیشتری درباره عوارض این داروها کسب نمود تا در آینده با پیش آگهی در مورد مصرف داروها، از بروز اختلالات و مشکلات تولیدمثلی در مردان مبتلا به افسردگی که داروهای ضدافسردگی مصرف می‌کنند، جلوگیری شود (۱۶). تاکنون اثر داروهای ضدافسردگی گروه SNRA بر روی این رده از سلول‌ها بررسی نشده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر داروی ضد افسردگی دولوکستین بر میزان میزان بقا و آپوپتوزیس سلول‌های سرتولی و نیز بر سطح بیان ژن اتصال دهنده بین سلولی کانکسین ۴۳ در سلول‌های سرتولی است.

۲- مواد و روش‌ها

کشت سلولی: در این پژوهش کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. این تحقیق با کد اخلاق IR-KHU-REC-1400-036 مصوب کمیته اخلاق دانشگاه خوارزمی می‌باشد. در ابتدا سلول‌های سرتولی رده‌ی TM4 بیضه‌ی موش سوری نر نژاد Balb/c با سن حدود ۱۱ تا ۱۳ روز از انستیتو پاستور (تهران - ایران) به‌صورت کشت اولیه در یک فلاسک T25 تهیه گردید و در محیط کشت کامل DMEM/F12 (ایده زیست نوترکیب –تهران) حاوی ۵ درصد سرم اسب، ۲/۵ درصد سرم جنین گاو)FBS(و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز Co_2 کشت داده شد.

تست MTT و بررسی سمیت سلولی: به‌منظور بررسی میزان سمیت داروی دولوکستین، پس از شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومتر (نئوبار)، 10^3 سلول جهت تیمار ۷۲-۲۴ ساعت در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها تحت تیمار داروی دولوکستین با دوزهای انتخابی ۳۰،۶۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر قرار گرفتند. این تست جهت بررسی و اندازه‌گیری میزان بقای سلول‌ها پس از تیمار با داروی مورد نظر و تعیین غلظتی از دارو که باعث مرگ نیمی از سلول‌ها می‌شود (IC50) انجام شد. برای انجام تست ابتدا میزان ۵ میلی‌گرم MTT درون ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI فاقد فنول‌رد حل شده، ۲۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک خالی شد و ۵۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد. در نهایت پلیت درون دستگاه الایزا ریدر قرار گرفت و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با طول موج مبنای ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی آپوپتوزیس: برای انجام این تست، ۱۰^۵ سلول در پلیت ۶ خانه کشت داده شد و پس از ۲ روز با غلظت ۱۵ میکروگرم/میلی لیتر داروی دولوکستین تیمار شدند. پس از ۲ روز که سلول‌ها به کف ظرف کشت چسبیدند، محیط کشت رویی خارج شده و دولوکستین با دوز ۱۵ میکروگرم / میلی‌لیتر بر روی یکی از چاهک‌ها به‌عنوان گروه تحت تیمار اثر داده شد، یک گروه هم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد تریپسینه شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور/دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ، و پس از آن به‌ترتیب ۱۰ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم یداید و ۵ میکرولیتر انکسین ۵ اضافه شد، و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه گردید. در انتها آنالیز مرگ سلولی آپوپتوتیک در سلول‌ها به روش فلوسایتومتری انجام شد.

تکنیک RT-qPCR

استخراج RNA: پس از انتقال سلول‌های سرتولی به دو فلاسک T25 یکی از فلاسک‌ها تحت تیمار با دوز ۱۵ میکروگرم / میلی‌لیتر از داروی دولوکستین (دوزی که در تست MTT به‌عنوان IC50 سلول‌ها در نظر گرفته شد) قرار گرفت و فلاسک دیگر به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. به‌هر فلاسک ۱ میلی‌لیتر محلول ترایزول اضافه شد و سلول‌ها توسط Scarper از کف فلاسک جدا شده و با متلاشی شدن سلول‌ها، RNA خارج شد. پس از آن ۲۵۰ لاندا محلول کلروفرم به‌منظور جداسازی فازها اضافه شد. پس از سانتریفیوژ، اضافه کردن ایزوپروپانول سرد و شستشوی رسوب با اتانول ۷۵ درصد بسته به اندازه رسوب به مقدار ۲۰ تا ۵۰ لاندا آب DEPC اضافه شد و بر روی هات بلاک قرار داده شد تا رسوب حل شود. سپس غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ و نرم افزار GENE 5 ارزیابی و تفسیر شد.

سنتز cDNA/از RNA: برای شروع واکنش نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA از کیت SMOBIO (Taiwan-RP1300) استفاده شد. در ابتدا ۱۰۰۰ نانوگرم از نمونه‌های RNA استخراج شده در یک میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتری ریخته شد و با استفاده از آب DEPC موجود در کیت به حجم ۵ میکرولیتر رسانده شد. ۰/۵ میکرولیتر پرایمر اولیگو dT و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Random Hexamer و dNTP جهت سنتز به نمونه‌ها اضافه شد. پس از آن، ۵ میکرولیتر Master mix سنتز cDNA شامل آب DEPC، بافر، RTase و RNase به مخلوط هر دو نمونه اضافه شد و مخلوط به‌ترتیب به‌مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا آنزیم به‌راحتی فعالیت کند.

مراحل qPCR: طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های Bax، Cx43 و B-actin توسط نرم افزار Gene Runner انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده ژن‌های *Bax*، *Cx43* و *B-actin*

Gene	Forward Primer Sequence 5'-3'	Reverse Primer Sequence 3'-5'	T_m (℃)
Bax	CAGGACGCATCCACCAAGAAG	TGCCACACGGAAGAAGACCTC	F: 61.28 R: 62.31
Cx43	CACTCTCACCTATGTCTCCTCCTG	GCTGGCTTGCTTGTTGTAATTGC	R: 61.47 F: 61.95
B-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	F: 59.96 R: 59.44

تکثیر ژن‌ها برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش PCR انجام گرفت. این واکنش طبق برنامه حرارتی و زمانی داده شده به دستگاه با مدل ABI Step One Plus و مخلوطی از مسترمیکس، پرایمرها و آب استریل تکنیک Ampliqon Sybr Green انجام شد (جدول۲). منحنی ذوب نیز به‌وسیله اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در زمان‌های مختلف توسط دستگاه ترموسایکلر رسم شد.

جدول۲: سیکل دمایی دستگاه ترموسایکلر

Step 1	95 ℃	15 min
Step 2	95 ℃	15 Sec
Step 3	60 ℃ (*B-actin,Cx43*) 64 ℃ (*Bax*)	1 min 1 min

با استفاده از روش‌های کمی سازی بیان ژن، امکان محاسبه کمی اختلاف بیان یک ژن در نمونه‌های مختلف فراهم شد.

برای این کار از روش Ct مقایسه‌ای (ΔΔCt) که رایج‌ترین روش آنالیز نتایج است استفاده شد و در نهایت مقدار دیتای خروجی (Fold Chain) از طریق رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$FC=2^{-\Delta\Delta C}$

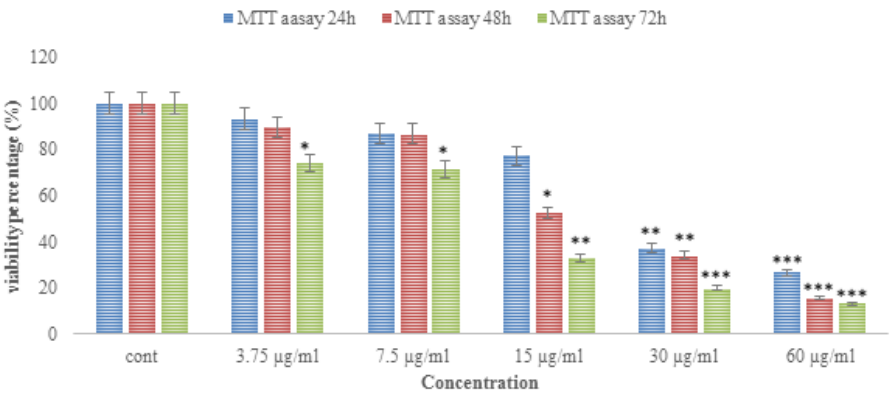
۳-آنالیز آماری

بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار ANOVA یکطرفه توسط نرم افزار SPSS v.20 انجام شد و سپس در ادامه از آزمون تعقیبی توکی جهت بررسی دقیق معنی‌داری استفاده شد. مقادیر به‌صورت دقیق بیان شده و سطح معنی‌داری $p< 0.05$ در نظر گرفته شد.

٤- نتایج

تست MTT و بررسی سمیت سلولی

نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که دولوکستین در یک الگوی وابسته به دوز و زمان میزان بقای سلول‌های سرتولی را کاهش می‌دهد، به این معنی که هرچه غلظت دارو و زمان در معرض دارو بودن افزایش یابد، میزان مرگ سلولی نیز افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است در غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر دولوکستین میزان زنده‌مانی سلول ها به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است ($p\leq0.01$; $p\leq0.001$). دوز ۱۵ میکروگرم/میلی‌لیتر در بازه زمانی ۴۸ ساعت به‌عنوان دوز منتخب برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد، زیرا موجب توقف ۵۰ درصد رشد سلول‌ها نسبت به کنترل (IC50) شده بود. نتایج نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میان داده‌های گروه‌های تیماری با غلظت بالای دارو (۳۰ و ۶۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر دولوکستین) نسبت به گروه کنترل بود در حالی‌که در دوزهای زیر ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر (۳/۷۵و ۷/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر دولوکستین) در ۴۸ ساعت که زمان انتخابی جهت بررسی آپوپتوزیس و ارزیابی بیان ژن بود تغییر معنی‌داری نسبت به کنترل مشاهده نشد $p\geq0.05$ (شکل ۱).



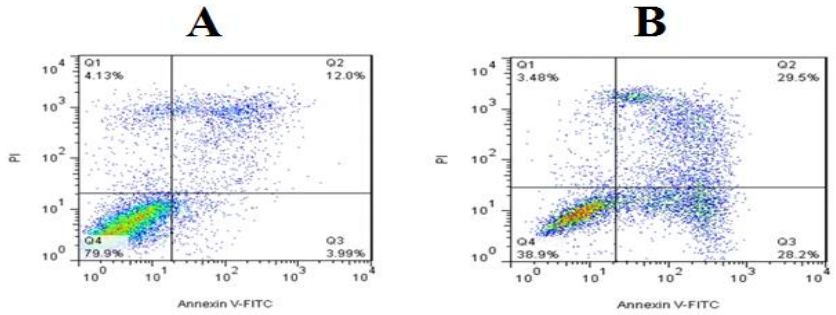
شکل ۱: مقایسه میزان زنده‌مانی سلول‌های سرتولی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف دولوکستین نسبت به نمونه کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

میزان زنده مانی سلول‌ها در غلظت‌های ۳/۷۵، ۷/۵ و ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد اما در غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر میزان زنده مانی بطور معنا داری کاهش یافته است. میزان زنده مانی سلول‌ها در غلظت ۳/۷۵ و ۷/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت با نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد اما در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری میان میزان زنده مانی سلول‌ها با کنترل دیده شد. میزان زنده مانی سلول‌ها در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه در زمان ۷۲ ساعت با کنترل تفاوت معنی‌داری دارد (*$p<0.05$: **, $p<0.01$: *** $p<0.001$).

بررسی آپوپتوزیس

در این پژوهش برای بررسی نوع مرگ القا شده توسط داروی دولوکستین، از کیت AnnexinV/ PI استفاده شد.

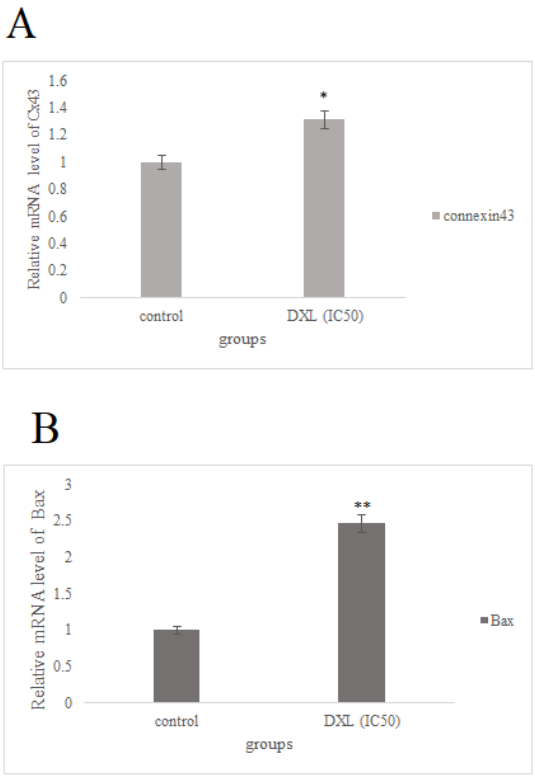
نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که مرگ سلولی القا شده توسط داروی دولوکستین در گروه IC50 (دوز ۱۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر) در بازه ۴۸ ساعت تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. در گروه کنترل پس از ۴۸ ساعت ۷۹/۹ درصد سلول‌ها زنده بودند در حالی‌که ۱۵/۹۹ درصد دچار آپوپتوزیس و ۴/۱۳ درصد دچار نکروزیس شده بودند. در حالی‌که در گروه IC50 ۳۸/۹ درصد سلول‌ها پس از تیمار ۴۸ ساعته زنده بودند و ۵۷/۷ درصد دچار آپوپتوزیس و ۳/۴۸ درصد تحت نکروزیس قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲: آنالیز مرگ سلولی توسط کیت انکسین/پروپیدیوم یدید به روش فلوسایتومتری. A: میزان آپوپتوزیس و نکروزیس در نمونه کنترل پس از ۴۸ ساعت B: میزان آپوپتوزیس و نکروزیس در نمونه تحت تیمار با دوز ۱۵ میکروگرم / میلی‌لیتر دولوکستین پس از ۴۸ ساعت. در هر کدام از تصاویر، آن دسته از سلول‌هایی که در قسمت پایین سمت چپ قرار دارند، سلول‌های زنده و سالم را نشان می‌دهند. قسمت بالا سمت چپ نشانگر سلول‌های نکروزیس شده، قسمت بالا سمت راست نشانگر سلول‌های مرحله Late Apoptosis و قسمت پایین سمت راست نشانگر سلول‌های مرحله Early Apoptosis می‌باشد.

بررسی بیان ژن با روش RT-qPCR

نتایج ارزیابی بیان ژن نشان داد که میزان بیان هر دو ژن Bax و Cx43 تحت تیمار با غلظت ۱۵ میلی‌گرم / میلی لیتر دولوکستین در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌دار افزایش یافته است که به‌ترتیب این افزایش در ژن پروآپوپتوتیک Bax با $p\leq0.01$ و درمورد ژن Cx43 با $p\leq0.05$ معنی‌دار بود (شکل ۳).



شکل ۳: بررسی بیان ژن به روش RT-qPCR. A: میزان بیان ژن *Cx43* در سلول‌های TM4 تحت تیمار با غلظت میانه مهاری ۱۵ میلی‌گرم / میلی لیتر دولوکستین. B: میزان بیان ژن *Bax* در سلول‌های TM4 تحت تیمار با غلظت میانه مهاری ۱۵ میلی‌گرم / میلی لیتر دولوکستین.

۵- بحث

دنیای مدرن و تغییر سبک زندگی افراد باعث افزایش میزان افسردگی و اثرات حاصل از آن شده است. از طرفی توجه و اقدام جهت درمان این اختلال نسبت به گذشته پیشرفت چشمگیری داشته است. این اختلال چند عاملی شیوع بسیار بالایی دارد و یکی از راه‌های درمان آن مصرف قرص‌های ضدافسردگی به‌مدت طولانی (حداقل یک تا سه ماه) است تا اثر درمانی دارو مشخص شود، بنابراین عوارض حاصل از مصرف طولانی مدت داروهای ضدافسردگی ممکن است اثرات منفی بر روند تولیدمثل گذاشته که غیرقابل اجتناب است (۱۷) در نتیجه خطر ناباروری، یکی از عوارض مهم مصرف طولانی مدت برخی داروهای ضدافسردگی است که از طریق اعمال اثرات منفی بر سیستم تولیدمثلی و سلول‌های جنسی ایجاد می‌شود (۱۸). طبق تحقیقات Gao و همکاران (۱۹) در مورد تاثیر مواد شیمیایی بر سلول‌های سرتولی نشان داده شده است، از آن‌جایی که زنده ماندن سلول سرتولی برای ایجاد و حفظ اسپرماتوژنز و باروری ضروری است، این ترکیبات از طریق القای استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در سلول‌های سرتولی قادر به اعمال آسیب سلولی هستند که هم راستا با تحقیق حاضر بیانگر اهمیت سلول‌های

محافظ سرتولی در حفظ تمامیت بافت بیضه است. در پژوهش حاضر نشان داده شد داروی دولوکستین هم راستا با پژوهش فوق به‌عنوان یک داروی شیمیایی در یک الگوی وابسته به دوز و زمان بر کاهش میزان بقای سلول‌های سرتولی تاثیرگذار است. در خصوص اثرات دلوکستین بر باروری مردان مغایر با یافته های حاصل از این پژوهش، Punjani و همکاران (۲۰) دلوکستین را بر روی پارامترهای منی، قطعه قطعه شدن DNA و هورمون‌های سرم مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند دلوکستین و احتمالا سایر بازدارندگان بازجذب سروتونین نوراپی نفرین به‌عنوان داروهای ایمن بدون اعمال آسیب چشمگیر در باروری مردان می‌تواند در درمان ضدافسردگی مورد استفاده قرار گیرد. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد داروی دلوکستین در غلظت میانه مهاری قادر به راه اندازی مسیر سیگنالینگ آپوپتوزیس بوده و با توجه به نقش این سلول‌ها در پیشبرد فرایند سنتز اسپرم از این طریق قادر است بر فرایند اسپرماتوژنز نیز تاثیر منفی بگذارد.

پروتئین‌های خانواده Bcl-2 از جمله مهم‌ترین پروتئین‌های درگیر در فرایند آپوپتوزیس هستند که به دو گروه پروآپوپتوزی و آنتی آپوپتوزی طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئین غشایی Bcl-2 که اکثرا در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد، با حفظ نفوذپذیری کم، باعث سرکوب آپوپتوزیس می‌شود. از طرفی برخی دیگر از اعضای این خانواده محرک آپوپتوزیس هستند که از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به Bad، Bax، Bak، Bim و Bid اشاره کرد. (۲۱-۲۳). بر اساس تحقیقات القای آپوپتوزیس در سلول‌های سیستم تولید مثل یکی از مکانیسم های بالقوه القای ناباروری به شمار می رود (۲۴).

یافته‌های کلیدی توسط Saleem و همکاران (۲۵) نشان می‌دهد که پس از درمان با داروی ضد افسردگی ولنافاکسین، یکپارچگی DNA اسپرماتوزوئیدها، دست نخورده باقی مانده است، اما با کاهش تعداد اسپرم‌ها باروری کاهش می‌یابد. Wang و همکاران (۲۶) گزارش کردند که دلوکستین به‌عنوان یک بازدارنده انتخابی بازجذب سروتونین و نوراپی نفرین قادر است اثرات نوروپاتی محیطی القا شده توسط اکسالی پلاتین به‌عنوان یک داروی شیمی درمانی بر پایه پلاتینیوم را مهار کند. آن‌ها اثبات کردند دولوکستین از طریق مهار بیان سطوح p53، کاسپاز ۳ و ۹ و سطح Bax/Bcl2 در نورون‌ها و در کل مسیرهای پیام رسانی مرتبط با p53 قادر به مهار اثرات اکسالی پلاتین هست. مطالعات نشان داده است دلوکستین در مدل موشی سرطان پانکراس نیز قادر به بهبود درد ناشی از سرطان است. اثبات شده است که دلوکستین این اثر را از طریق پیشبرد مسیر نورادرنرژیک نسبت به مسیر سروتونرژیک انجام می‌دهد در حالی که اثرات ضدتوموری خود را روی ادنوکارسینومای پانکراس بدون درگیری مسیر نورادرنرژیک وساطت می کند (۲۷). Lu و همکاران (۲۸) گزارش کردند دلوکستین آسیب عصب محیطی ناشی از داروی ضدسرطان پاکلی تاکسل را توسط مهار کلیواژ پلی ADP ریبوز پلیمراز و ژن سرکوبگر تومور p53 و تنظیم اعضای خانواده Bcl2 جهت سرکوب استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس مهار می کند. این نتایج دلوکستین را به‌عنوان یک کاندید دارویی جدید در نوروپاتی القا شده توسط پاکلی تاکسل معرفی می‌کند. تحقیق حاضر نیز نشان می‌دهد دولوکستین از طریق افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax موجب افزایش مرگ سلول‌های سرتولی شده و کاهش بقای سلول‌های سرتولی به‌همراه افزایش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های سرتولی به‌نوبه خود قادر است بر زنده‌مانی سلول‌های دودمان اسپرماتژنیک تاثیر داشته و از این طریق بر باروری مردان اثرگذار باشد.

اتصالات شکاف‌دار ایجاد شده توسط کانکسین‌ها در بیضه بزرگسالان برای ارتباط بین سلول‌های سرتولی و دودمان اسپرماتوژنیک طی فرایند اسپرماتوژنز ضروری است (۲۹،۳۰). کانکسین ۴۳ (Cx43) فراوان‌ترین و مهم‌ترین کانکسین در بافت بیضه است که نشان داده شده است کاهش یا عدم وجود بیان آن در سلول‌های سرتولی منجر به آزواسپرمی می‌شود، از طرفی افزایش بیش از حد بیان این ژن با استعداد ابتلا به سرطان بیضه در مردان نابارور همراه است (۳۱). مطالعات اخیر نشان داده است کانکسین ۴۳ به‌عنوان یک تنظیم کننده مهم در بلوغ و مورفولوژی سلول‌های سرتولی در بافت بیضه نقش دارد،

به‌طوری‌که آنالیز فراساختار هسته ای هسته سلول‌های سرتولی نشان داد در موش‌های ناک اوت کانکسین ۴۳ سلول‌های سرتولی به‌صورت نابالغ و در حال تکثیر قابل مشاهده هستند (۳۲). Hollenbach و همکاران (۳۳) نیز گزارش کردند کانکسین ۴۳ به‌عنوان یک پروتئین غالب دخیل در اتصالات شکاف‌دار بیضه در طی فرایند اسپرماتوژنز آسیب دیده دارای بیان تغییر یافته است. به علاوه این پروتئین نقش مهمی در تنظیم شکل گیری اتصالات در سدخونی بیضه‌ای دارد.

ژن GJA1 فراوان‌ترین ژن بیان کننده پروتئین Cx43 در اتصالات بین سلول‌های سرتولی است. بر اساس تحقیقات Sridharan و همکاران (۳۴) نقش CX43 در سلول‌های سرتولی بسیار مهم است و این پروتئین دارای اثرات کنترل‌کننده بر تکثیر در رده‌های سلولی است و می‌تواند تنظیم کننده اصلی تکثیر سلول‌های سرتولی باشد. آن‌ها نشان دادند غیرفعال شدن ژن بیان کننده این پروتئین (Gja1) در موش‌های نر منجر به عدم تولید اسپرم و در نهایت باعث ناباروری می‌شود. بنابراین، درک بهتر مکانیسم تنظیم رونویسی Cx43 در سلول‌های سرتولی می‌تواند به تعریف بهتر نقش آن در برخی شرایط پاتوفیزیولوژیک کمک کند. در تحقیق انجام شده روی سلول‌های سرتولی نیز مشاهده شد که داروی دولوکستین از طریق افزایش میزان ژن بیان کننده‌ی پروتئین Cx43 با افزایش ارتباطات بین سلولی قادر به ارائه سیگنال پیش برنده آپوپتوزیس به سلول‌های مجاور درون لوله سمینی‌فروس بافت بیضه است.

۶- نتیجه‌گیری

تیمار سلول‌های سرتولی TM4 با دوز ۱۵ میکروگرم / میلی‌لیتر دولوکستین به‌عنوان دوز بازدارنده میانی در بازه زمانی ۴۸ ساعت، از طریق افزایش بیان ژن‌های Cx43 و Bax باعث کاهش عملکرد سلول‌های سرتولی می‌شود. با توجه به آنالیز فلوسایتومتری مرگ سلولی و نیز افزایش بیان Bax و Cx43 احتمالا دولوکستین از طریق افزایش آپوپتوزیس در سلول‌های سرتولی و افزایش انتقال سیگنال‌های القاکننده مرگ می‌تواند به‌عنوان عامل مخل باروری بر اسپرماتوژنز تاثیر منفی داشته باشد. هرچند نتایج این تحقیق حاصل بررسی در شرایط *in vitro* می‌باشد، به‌طور کامل نمی‌تواند معرف شرایط *in vivo* باشد، از این رو برای اثبات نتایج حاصل از این تحقیق بایستی مکانیسم مولکولی تاثیر دلوکستین در سطح پروتئین نیز بررسی شده و مطالعات دیگری در سطح پیش بالینی صورت گیرد.

7- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات مسئولان و کارکنان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه خوارزمی تهران و مساعدت آزمایشگاه تحقیقاتی ژنیران و شرکت دانش بنیان ایده زیست نوترکیب و تمامی همکاران صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

8- منابع

1. Nabavi SM, Daglia M, Braidy N, Nabavi SF. Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. Nutr Neuros. 2017; 16;20(3):180-194.

2. Bai CF, Sun JW, Li J, Jing WH, Zhang XK, Zhang X, Ma LL, Yue R, Cao FL. Gender differences in factors associated with depression in infertility patients. J Adv Nurs. 2019; 75(12):3515-3524.

3. Khushboo, Sharma B. Antidepressants: mechanism of action, toxicity and possible amelioration. J Appl Biotechnol Bioeng. 2017;3(5):437-448.

4. Zarate C, Duman RS, Liu G, Sartori S, Quiroz J, Murck H. New paradigms for treatment-resistant depression. Ann N Y Acad Sci. 2013;1292:21-31.

5. Mohammadiyan S, Hayati Roodbari N, Parivar K. The effect of zolpidem on oogenesis and LH, FSH of adult NMRI mouse strain. J Cell Tissue. 2019;10(2):72-84

6. Hasanpour A, Afshari F, Issabeagloo E. The assessment of morphological Citation changes of ovary and fallopian tube after application of antiprogesterone and estrogen in the hyperstimulated mice. J Cell Tissue. 2022;13(1):45-55

7. Liza O'Donnell, Lee B. Smith, Diane Rebourcet, Sertoli cells as key drivers of testis function,Seminars in Cell & Developmental Biology 2022: 121: 2-9,

8. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. Andrology. 2017;5(5):845-862.

9. López-Solà M, Pujol J, Hernández-Ribas R, Harrison BJ, Contreras-Rodríguez O, Soriano-Mas C, et al. Effects of duloxetine treatment on brain response to painful stimulation in major depressive disorder. Neuropsychopharmacology. 2010;35(11):2305-2317.

10. Schulz RW, Menting S, Bogerd J, França LR, Vilela DA, Godinho HP. Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. Biol Reprod. 2005;73(5):891-898.

11. Khanehzad M, Abolhasani F, Koruji SM, Ragerdi Kashani I, Aliakbari F. The roles of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells. Tehran Univ Med J. 2016; 10;73(12):878-887.

12. Mohammadi Sardoo M, Nabiuni M, Amirheidari B, Mandegary A. Structure and function of blood-testis barrier and its role in damages induced by environmental contaminants. Ir J Physiol Pharmacol. 2018; 10;1(4):280-271.

13. Nisar A, Ping Y , Hong C, Imtiaz AU , Abdul H, Lingling W, et al. Characterization of inter-Sertoli cell tight and gap junctions in the testis of turtle: Protect the developing germ cells from an immune response. Microb Pathog. 2018;123:60-67.

14. Lucas TF, Nascimento AR, Pisolato R, Pimenta MT, Lazari MF, Porto CS. Receptors and signaling pathways involved in proliferation and differentiation of Sertoli cells. Spermatogenesis. 2014; 4(1):e28138: 1-9.

15. Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. Reprod Toxicol. 2004;18(3):413-421.

16. Kiani Z, Simbar M, Hajian S, Zayeri F. The prevalence of depression symptoms among infertile women: a systematic review and meta-analysis. Fertil Res Pract. 2021; 7 (1): 6-12.

17. Maroufizadeh S, Hosseini M, Rahimi Foroushani A, Omani-Samani R, Amini P. The effect of depression on quality of life in infertile couples: an actor-partner interdependence model approach. Health Qual Life Outcomes. 2018; 16(73): 1-7.

18. Hegyi BE, Kozinszky Z, Badó A, Dombi E, Németh G, Pásztor N. Anxiety and depression symptoms in infertile men during their first infertility evaluation visit. J Psychosom Obstet Gynecol. 2019; 40(4), 311-317.

19. Gao Y, Mruk DD, Cheng CY. Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis–a mechanistic and therapeutic insight. Expert Opin Ther Targets. 2015; 3;19(8):1073-1090.

20. Punjani N, Kang C, Flannigan R, Bach P, Altemus M, H Kocsis J, et al.. Impact of duloxetine on male fertility: A randomised controlled clinical trial. Andrologia . 2021;53(10):e14207.

21. Jensen K, WuWong DJ, Wong S, Matsuyama M, Matsuyama S. Pharmacological inhibition of Bax-induced cell death: Bax-inhibiting peptides and small compounds inhibiting Bax. Exp Biol Med (Maywood). 2019; 244(8): 621–629.

22. Fen Zh, Zhijing N, Shuqi Zh , Yanna W, et al. Flurochloridone induced cell apoptosis via ER stress and eIF2α-ATF4/ATF6-CHOP-Bim/Bax signaling pathways in mouse TM4 sertoli Cells. Int J Environ Res Public Health. 2022;11;19(8): 1-12.

23. Rostami A, Vakili S, Koohpeyma F, Namvar Jahromi B. Ellagic acid effects on testis, sex hormones, oxidative stress, and apoptosis in the relative sterility rat model following busulfan administration. BMC Complement Med Ther. 2022; 22 (1):1-14.

24. 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.

25. Saleem U, Zubair S, Riaz A, Anwar F, Ahmad B. Effect of Venlafaxine, Pramipexole, and Valsartan on Spermatogenesis in Male Rats. ACS Omega. 2020; 5(32):20481-20490.

26. Wang M, Zhang L, Liu X, Qiu S, Xu R, Yang C, Lu Y. Duloxetine alleviates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by regulating p53-mediated apoptosis. 2022. Neuro Report: 33 (10): 437-444.

27. Kajiwara I, Sano M, Ichimaru Y, Oshima Y, Kitajima O, Hao H, et al. Duloxetine improves cancer-associated pain in a mouse model of pancreatic cancer through stimulation of noradrenaline pathway and its antitumor effects. PAIN: 2020 ; 161(12):2909-2919.

28. Lu Y, Zhang P, Zhang Q, Yang C, Qian Y, Suo J, et al. Duloxetine attenuates paclitaxel-induced peripheral nerve injury by inhibiting p53-related pathways. J Pharmacol and Exp Ther. 2020; 373 (3) 453-462.

29. Siti HN, Jalil J, Asmadi AY, Kamisah Y. Effects of quercetin on cardiac function in pressure overload and postischemic cardiac injury in rodents: A systematic review and meta-analysis. Cardiovas Drugs Ther. 2020; 36(1):15-29.

30. Brehm R, Zeiler M, Rüttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lécureuil C, Steger K, Konrad L. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. The American J Pathol. 2007; 1;171(1):19-31.

31. Couture R, Martin LJ. The transcription factors SF-1 and SOX8 cooperate to upregulate Cx43 expression in mouse TM4 sertoli cells. Biochem Biophys Rep. 2020; 24:100828:1-8.

32. Staggenborg S, Koch R, Rode K, Huneke H, Tiedje L, Wirth G, et al. Connexin43 represents an important regulator for Sertoli cell morphology, Sertoli cell nuclear ultrastructure, and Sertoli cell maturation. Scientific Reports. 2022; 12: 12898.

33. Hollenbach J, Jung K, Noelke J, Gasse H, Pfarrer C, Koy M, Brehm R. Loss of connexin43 in murine Sertoli cells and its effect on blood-testis barrier formation and dynamics. PLoS ONE. 2018; 13(6): e0198100.

34. Sridharan S, Brehm R, Bergmann M, Cooke PS. Role of connexin 43 in Sertoli cells of testis. Ann N Y Acad Sci.2007; 1120:131-143.