Archive of SID

Original Article

Assessment of the cryoprotective effects of fetal bovine serum (FBS) and trehalose on the viability rate of caprine spermatogonial stem cells (SSCs)

Ahmadi M[1], Rahimi-Feyli P[2], Moghaddam AA[2], Alimohammadi S[3*]

1- D.V.M Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, I.R. Iran.
2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, I.R. Iran.
3- Department of Basic Sciences, Section of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, I.R. Iran.

Received: 2020/11/23 | Accepted: 2021/02/17

Abstract:

Background: Spermatogonial stem cells (SSCs) are the foundation of spermatogenesis, because they have the capacity of self-renewal, and differentiation into spermatozoa. Freezing is the most common long-term preservation approach for SSCs. The present study aimed to investigate the cryoprotective impacts of FBS (Fetal Bovine Serum) and trehalose on caprine SSCs.

Materials and Methods: SSCs were isolated from prepubertal goat testis by enzymatic digestion and differential plating. Cells were divided into 9 groups. The control group included SSCs without cryoprotective agents. In the treatment groups 1, 2, 3 and 4, concentration of 10% FBS, and various concentrations of trehalose (0, 50, 100 and 200 mM), and in the treatment groups 5, 6, 7, and 8, concentration of 20% FBS and various concentrations of trehalose (0, 50, 100 and 200 mM) were used respectively. The viability rate of the cells was assessed immediately after isolation, following addition of cryoprotectant agents and after thawing. Identification of cells was confirmed by immunocytochemical staining against PGP9.5 antigen. Data were analyzed using one-way ANOVA test.

Results: The viability rate of SSCs in various treatments following addition of FBS and trehalose were similar to viable cells immediately after isolation. Furthermore, higher viability rates of SSCs after thawing were observed in freezing medium containing 10% FBS and 200 mM trehalose ($P<0.05$).

Conclusion: The results revealed that freezing in 10% FBS with 200 mM trehalose acts as efficient method for the cryopreservation of caprine SSCs.

Keywords: Cryoprotectant agents, Fetal bovine serum (FBS), Trehalose, Spermatogonial Stem Cells (SSCs)

*Corresponding Author
Email: S.alimohammadi@razi.ac.ir
Tel: 0098 938 151 8467
Fax: 0098 833 832 0041

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2021; Vol. 25, No 1, Pages 714-723

Please cite this article as: Ahmadi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA, Alimohammadi S. Assessment of the cryoprotective effects of fetal bovine serum (FBS) and trehalose on the viability rate of caprine spermatogonial stem cells (SSCs). ***Feyz*** 2021; 25(1): 714-23.

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی اثرات محافظت‌کنندگی در برابر انجماد سرم جنین گاو و ترهالوز بر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز

محدثه احمدی [۱]، پیمان رحیمی فیلی [۲]، علی‌اصغر مقدم [۳]، صمد علی‌محمّدی [۴*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs: Spermatogonial Stem Cells)، اساس اسپرماتوژنز هستند؛ زیرا ظرفیت خودنوسازی و تمایز به اسپرماتوزوآ را دارند. انجماد، متداول‌ترین روش حفظ طولانی‌مدت SSCs است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات محافظت‌کنندگی در برابر انجماد سرم جنین گاو (FBS: Fetal Bovine Serum) و ترهالوز بر SSCs بز بود.

مواد و روش‌ها: SSCs از بیضه بز نابالغ توسط هضم آنزیمی و حذف تمایزی جداسازی شدند. سلول‌ها به ۹ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل شامل SSCs بدون عوامل محافظت‌کننده انجماد بود. در گروه‌های تیمار ۱، ۲، ۳ و ٤؛ غلظت ۱۰ درصد FBS و غلظت‌های مختلف ترهالوز (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مول) و در گروه‌های تیمار ۵، ٦، ۷ و ۸؛ غلظت ۲۰ درصد FBS و غلظت‌های مختلف ترهالوز (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مول) به‌ترتیب استفاده شد. میزان زنده‌مانی سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی، افزودن مواد محافظ انجماد و یخ‌گشایی ارزیابی شد. ماهیت سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 تأیید شد. داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تحلیل گردیدند.

نتایج: میزان زنده‌مانی SSCs در تیمارهای مختلف، متعاقب افزودن FBS و ترهالوز بلافاصله پس از جداسازی، مشابه سلول‌های زنده بود. علاوه‌بر این، بیشترین میزان زنده‌مانی SSCs پس از یخ‌گشایی در محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که انجماد در FBS ۱۰ درصد توأم با ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز به‌عنوان روش مؤثر برای حفاظت از انجماد SSCs بز عمل می‌کند.

واژگان کلیدی: مواد محافظ انجماد، سرم جنین گاو، ترهالوز، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۱، فرودین-اردیبهشت ۱٤۰۰، صفحات ۷۲۳-۷۱٤

مقدمه

اسپرماتوژنز، فرآیندی پیچیده و سازمان‌یافته شامل تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که در نهایت طی تقسیمات متوالی میتوز و میوز تعداد زیادی اسپرماتوزوآ تولید می‌شود [۱]. SSCs بر روی غشای پایه بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز بیضه قرار دارند و به‌وسیله سلول‌های سوماتیک سرتولی پیرامونی حمایت می‌شوند. این سلول‌ها به‌واسطه ریزمحیطی که در آن قرار دارند، قدرت تکثیر و تمایز خود را حفظ می‌کنند که اصطلاحاً کنام یا Niche خوانده می‌شود [۲].

۱. دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۴. استادیار، گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی

تلفن: ۰۹۳۸۱۵۱۸۴۶۷ **دورنویس:** ۰۸۳۳۸۳۲۰۰۴۱

پست الکترونیک: S.alimohammadi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۱۱/۲۹

SSCs در انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد، نقش مؤثری دارند. بنابراین در بین جمعیت سلول‌های بنیادی در بدن منحصربه‌فرد بوده، هدف مناسبی برای دستکاری‌های ژنتیکی هستند [٤،۳]. SSCs در درمان نازایی، حفظ و بازگرداندن باروری در مردان مبتلا به سرطان که تحت شیمی‌درمانی با دوزهای بالا و تابش اشعه قرار گرفته‌اند، اصلاح نژاد و نیز تولید محصولات نوترکیب دارویی و صنعتی حائز اهمیت فراوانی می‌باشند [۵]. علاوه‌بر موارد ذکرشده، استفاده از این سلول‌ها در زمینه زیست‌فناوری برای تولید حیوانات تراریخته با بهره‌وری و ارزش تجاری بالا مهم و ضروری است [٦]. با توجه به کاربردهای متنوع سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، مطالعات گسترده‌ای بر روی این سلول‌ها انجام شده است. این مطالعات به جنبه‌های متفاوتی، مانند روش‌های جداسازی، ایجاد شرایط کشت مناسب جهت غنی‌سازی و نگهداری طولانی‌مدت این سلول‌ها پرداخته‌اند [۷]. در این ارتباط، کشت‌های مناسب آزمایشگاهی و انجماد یا حفاظت سرمایی (Cryopreservation)، به‌طور ویژه‌ای برای دسترسی به این هدف مفید می‌باشند [۸]. انجماد SSCs امکان حفظ و بقای طولانی‌مدت این سلول‌ها را فراهم می‌سازد [۹]. توسعه و پیشرفت در تکنیک انجماد SSCs، لازمه انجام تکنیک پیوند

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. از جمله کاربردهای مهمّ انجماد و پیوند، می‌توان به بازگرداندن و حفظ باروری در انسان و برخی از حیوانات و گونه‌های باارزش اشاره کرد [۱۰]. حفاظت سرمایی بافت‌ها و سلول‌های جنسی، یکی از روش‌های مورد توجه محققان در سال‌های اخیر در زمینه پزشکی تولیدمثل است [۱۱]. تحقیق در خصوص روش‌های مختلف انجماد و تأثیر آن بر میزان زنده‌مانی SSCs، رویکردهای جدیدی را جهت درک بیولوژی این سلول‌ها در بر دارد و کمک فراوانی به شناخت هرچه بیشتر آن‌ها می‌کند. اکثر پروتکل‌های انجمادی که امروزه به‌کار می‌رود، برای سلول‌های سوماتیک و رده‌های سلولی مختلف تنظیم شده است و اطلاعات کمی در مورد بهینه‌سازی محیط انجماد SSCs وجود دارد [۱۲]. علیرغم این‌که انجماد SSCs یکی از روش‌های ضروری حفاظت و نگهداری از آن‌ها برای مدت‌زمان طولانی محسوب می‌شود، اما مشخص شده است که این روش می‌تواند به‌واسطه تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) (ROS)، آسیب‌هایی را از قبیل: کاهش زنده‌مانی، القای آپوپتوز، از دست دادن یکپارچگی DNA، پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و تجزیه غشای سلولی به این سلول‌ها وارد کند [۱۴،۱۳]. مهم‌ترین اصل برای بهبود بقای سلول‌ها در هنگام انجماد - یخ‌گشایی، جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ می‌باشد. افزودن مواد محافظ سرمایی (CPAs: Cryoprotective Agents)، کنترل میزان انجماد و ذوب می‌توانند آسیب‌های احتمالی ناشی از فرآیند انجماد را تا حدودی کاهش دهند و از اجزای سلول حفاظت نمایند [۱۵]. در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی روی کاربرد انواع مواد محافظ سرمایی نفوذپذیر و نفوذناپذیر در انجماد SSCs به عمل آمده است. FBS و ترهالوز از معمول‌ترین مواد محافظ سلول در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد می‌باشند. تأثیرات مثبت این دو ماده در مطالعات مختلفی که بر روی بقای SSCs در موش [۱۶،۱۲]، گوسفند [۱۷]، گاو [۱۸] و خوک [۱۹] در زمان انجماد صورت گرفته، مشاهده شده است. در این راستا از FBS در زمان انجماد سلول‌های بنیادی جنینی استفاده شد و مشخص گردید که بر بقای آن‌ها، تأثیر مثبت دارد [۲۰]. علاوه‌بر این، استفاده از ترهالوز در محیط انجماد سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های فیبروبلاست، درصد زنده‌مانی آن‌ها را پس از یخ‌گشایی بهبود بخشید [۲۲،۲۱]. همچنین، Aboagla و Terada [۲۳] و Eroglu و همکاران [۲۱] در مطالعه خود گزارش کردند که افزودن ترهالوز باعث بهبود زنده‌مانی و عملکرد اسپرماتوزوآ و اووسیت پس از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی می‌شود. علیرغم اهمیت گونه حیوانی بز در طراحی حیوان تراریخته، تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب و اهمیت اقتصادی پرورش آن، مطالعات در خصوص انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این، گونه بسیار محدود بوده است. بنابراین، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی غلظت‌های مختلف FBS و ترهالوز بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز به‌دنبال فرآیند انجماد - یخ‌گشایی به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت آن‌ها در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌ها

در این مطالعه، موازین اخلاقی کار با حیوانات با شماره ۱۳۳۳۵۹۸۸ که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی می‌باشد، رعایت گردید. مطالعه حاضر به روش آزمایشگاهی و تجربی انجام گرفت. برای انجام این آزمایش، جهت تهیه نمونه‌های بیضه از ۱۰ بز کشتاری نابالغ استفاده شد. نمونه‌های بیضه از بزهای نابالغ با سنّ ۳-۲ ماه از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان کرمانشاه تهیه شد. شناسایی سنّ حیوان بر اساس فرمول دندانی و همچنین پرسش از صاحب دام صورت گرفت. پس از تأیید دام موردنظر، بیضه همراه با اسکروتوم جدا شد و به‌سرعت در مجاورت یخ قرار گرفت. بیضه‌ها در کنار یخ و در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی منتقل گردید. بیضه‌ها با تنتور ید و الکل ۷۰ درصد شستشو داده شدند. در آزمایشگاه، بیضه از اسکروتوم خارج شد و با استفاده از پنس و تیغ جراحی استریل، اپیدیدیم به‌طور کامل از بیضه جدا گردید. پس از جداکردن اپیدیدیم، بیضه چندبار با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شد. سپس ۱۰ گرم از بافت پارانشیم بیضه به کمک قیچی استریل جدا گردید و به داخل لوله فالکون (SPL, South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, UK) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و سه مرتبه و هر بار به‌مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ (Hettich, Germany) گردید. جهت جداسازی و استخراج سلول‌های لوله‌های منی‌ساز از بافت پارانشیم بیضه، از روش van Pelt و همکاران [۲۴] و زندی و همکاران [۲۵] استفاده شد. به‌منظور هضم مکانیکی، بافت پارانشیم بیضه، پس از شستشو به داخل پتری‌دیش منتقل گردید و توسط پنس و قیچی استریل، قطعه‌قطعه شد و در ادامه وارد مرحله هضم آنزیمی گردید. در مرحله اوّل هضم آنزیمی، آنزیم‌های کلاژناز تیپ ٤ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ترپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma Chemical Co, St.

www.SID.ir

Archive of SID

Louis, MO, USA) به پتری‌دیش‌های حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه اضافه شدند و پتری‌دیش‌ها به‌مدت ٤٥ دقیقه در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار گرفتند. به‌منظور افزایش تأثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانشیم بیضه، هر ۱۰ دقیقه یک‌بار عمل پیپتاژ صورت گرفت. همچنین جهت ارزیابی هضم آنزیمی و روند بازشدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، هر ۱۰ دقیقه یک‌بار بافت پارانشیم بیضه با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX71® Inverted Microscope) مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور حذف بافت‌های هضم‌شده حاصل از جداشدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، محتویات هر یک از پتری‌دیش‌ها به داخل لوله‌های فالکون منتقل شد و به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۱٤۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس محتویات زیرِ لوله‌های فالکون که حاوی لوله‌های منی‌ساز بود، برداشته شد و به داخل پتری‌دیش‌های استریل منتقل گردید و وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شد. در این مرحله به‌منظور هضم لوله‌های منی‌ساز و آزادسازی سلول‌های موجود در آن‌ها، آنزیم‌های کلاژناز تیپ ٤ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دزوکسی‌ریبونوکلئاز (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به نمونه‌ها اضافه گردیدند و پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. به‌منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقی‌مانده، لوله‌های فالکون به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفیوژ شدند. جهت توقف هضم آنزیمی، از محلول FBS (Sigma-Aldrich, USA) استفاده گردید. تعلیق حاصل، حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و میوئید (Myoid) بود. در مرحله بعد برای حذف سلول‌های میوئید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری استریل (Sartorius, Germany) عبور داده شد. تعلیق حاصل در لوله‌های فالکون جمع‌آوری گردید و هرکدام به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰ به‌منظور رسوب‌دادن سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی سانتریفیوژ شدند. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ، رسوب سلولی موجود در لوله‌های فالکون در مقدار مناسب DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک حل گردید.

انجماد سلولی

در مطالعه حاضر، بررسی وضعیت حیات و درصد زنده‌مانی سلول‌ها بلافاصله پس از استخراج از بافت بیضه به کمک رنگ‌آمیزی تریپان‌بلوی ۰/٤ درصد (Trypan blue ،UK)، لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) صورت گرفت. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو ۰/٤ درصد مخلوط شد و به‌مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول مذکور به لام هموسیتومتر منتقل شد. با شمارش ۱۰۰ سلول به‌طور تصادفی، تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین شد و بر این اساس درصد زنده‌مانی نمونه محاسبه گردید. انجماد بر اساس روش Izadyar و همکاران [۹] انجام شد. به این‌صورت که غلظت‌های مختلف FBS و ترهالوز (Sigma-Aldrich, USA) که بر پایه ۱۰ درصد DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Sigma-Aldrich, USA) تهیه شده بود، به‌صورت تدریجی در عرض ۱۵-۱۰ دقیقه به شکل قطره‌قطره و به نسبت هم‌حجم با تعلیق سلولی (۱:۱) به هریک از ویال‌های انجماد (Cryovial) ۱/۸ میلی‌لیتری (Corning, Midland, MI, USA) اضافه گردید. شایان ذکر است که در این مطالعه، دوزهای مورد استفاده برای FBS و ترهالوز براساس مطالعات قبلی و با در نظر گرفتن این نکته که دوزهای مذکور تأثیر سمّی بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نداشتند، انتخاب گردیدند [۱۷،۱۲]. سپس ویال‌ها به‌آرامی تکان داده شدند تا محیط انجماد و تعلیق سلولی کاملاً مخلوط شوند. محلول‌های مختلف انجماد در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

جدول شماره ۱- گروه‌بندی تیمارهای مختلف استفاده‌شده در آزمایش

کنترل (Fresh)	SSCs بدون افزودن مواد محافظ انجماد
تیمار ۱ (F10T0)	SSCs+۱۰ درصد FBS+۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ۲ (F10T50)	SSCs+۱۰ درصد FBS+۵۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ۳ (F10T100)	SSCs+۱۰ درصد FBS+۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ٤ (F10T200)	SSCs+۱۰ درصد FBS+۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ۵ (F20T0)	SSCs+۲۰ درصد FBS+۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ٦ (F20T50)	SSCs+۲۰ درصد FBS+۵۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ۷ (F20T100)	SSCs+۲۰ درصد FBS+۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز
تیمار ۸ (F20T200)	SSCs+۲۰ درصد FBS+۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز

سپس مجدداً درصد حیات سلول‌های موجود در هر ۸ تیمار آزمایشی محاسبه گردید (تست سمّیت شیمیایی محلول انجماد). در مرحله بعد، هر کدام از ویال‌های مذکور به‌مدت ۲ ساعت به یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت انجماد بر روی بخار نیتروژن نگهداری گردیدند و پس از آن به تانک نیتروژن مایع (Spectrum-35 Series, USA) با دمای ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از ۲٤ ساعت، جهت یخ‌گشایی

www.SID.ir

Archive of SID

تعلیق سلولی منجمد، ویال‌های انجماد از تانک نیتروژن مایع خارج گردیدند و به‌مدت ۲ دقیقه در بن‌ماری ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از یخ‌گشایی، محتویات هر یک از ویال‌ها به لوله‌های فالکون منتقل گردیدند و به هر کدام محیط DMEM به‌صورت تدریجی و به آهستگی اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس تعلیق محلول بالای هر یک از لوله‌ها دور ریخته شد. در نهایت، درصد زنده‌مانی سلول‌های هر یک از لوله‌های فالکون (۸ تیمار مختلف) طبق روشی که پیش از این نیز ذکر شد، محاسبه گردید.

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توسط رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی

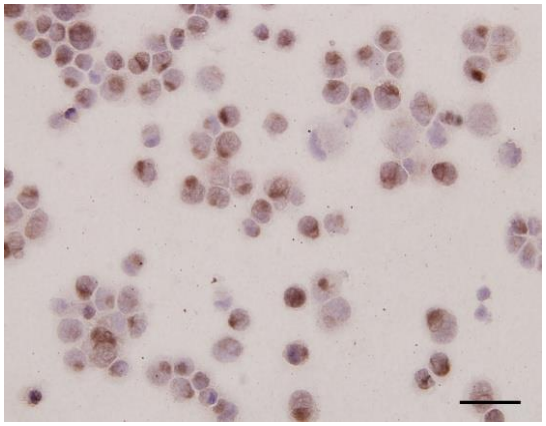
جهت شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ **A** از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 از روش حیدری و همکاران [۲۶] و Rodriguez-Sosa و همکاران [۲۷] استفاده شد. به این‌صورت که پس از جداسازی سلول‌ها، بلوک‌کردن اوّلین مکان غیراختصاصی به‌وسیله avidin/biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی پنج درصد سرم گوسفند به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس اسلاید با آنتی‌بادی اوّلیه غیر کونژوگه خرگوش علیه نشانگر PGP9.5 (Dako, Carpinteria, CA, USA) با رقت ۱:٤۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز (PBS-GS) به‌مدت ٦۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از سه مرتبه شستشو با PBS (هر بار ۵ دقیقه)، مقطع به‌مدت ٤۵ دقیقه در دمای اتاق در معرض آنتی‌بادی ثانویه (biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna Research Institute, Iran) قرار گرفت و مجدداً با TBS/BSA (Tris-Buffered Saline/Bovine Serum Albumin) شستشو داده شد. در ادامه مقطع به‌مدت ۳۰ دقیقه در تماس با HPR-conjugted streptavidin (Biosource, USA) با رقت ۱:۲۵۰ (**v/v**) قرار داده گرفت و با TBS/BSA شستشو داده شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی آمینو بنزیدین (DAB; Roche, Germany) به مقطع به‌مدت ۱۰ دقیقه، رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید به‌طور کامل در آب‌مقطر تمیز شد و مجدداً با هریس هماتوکسیلین به‌مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی گردید و دوباره با آب مقطر شستشو داده شد. در ادامه، اسلاید با الکل، آبگیری و با گزیلول، شفاف و با انْتلان (Entellan) (Merck, Germany) پوشانده شد و زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این مطالعه، از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۱ استفاده گردید. داده‌های جمع‌آوری‌شده از نظر نرمال‌بودن ارزیابی گردیدند. تعداد تکرار آزمایش ۵ مرتبه می‌باشد. داده‌ها براساس میانگین±خطای استاندارد ارائه شدند و سپس با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) اثرات غلظت‌های مختلف FBS و ترهالوز مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون تکمیلی دانکن صورت پذیرفت. مقادیر $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌واسطه رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن اختصاصی PGP9.5 انجام شد و همان‌گونه که دیده می‌شود، سیتوپلاسم این سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای درآمده است که نشان‌دهنده بیان ژن مارکر فوق در سلول‌های استخراج‌شده از بیضه می‌باشد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی علیه آنتی‌ژن اختصاصی PGP9.5. سیتوپلاسم سلول‌های اسپرماتوگونی به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شود. (نوار مقیاس: ۲۰ میکرومتر).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲- درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلافاصله پس از جداسازی و متعاقب اضافه کردن مواد مختلف محافظ انجماد در گروه کنترل و تیمارهای مختلف

گروه‌های آزمایشی	درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs)
کنترل (Fresh)	۸۷/٦٤±۲/۳۳[a]
تیمار ۱ (F10T0)	۸۷/٦٤±۲/۰۸[a]
تیمار ۲ (F10T50)	۸٦/۲۸±۲/۳۸[a]
تیمار ۳ (F10T100)	۸٤/۸۲±۲/٤۱[a]
تیمار ٤ (F10T200)	۸٤/٦۲±۲/٥٦[a]
تیمار ٥ (F20T0)	۸٤/۱٤±۲/٤[a]
تیمار ٦ (F20T50)	۸٤/۰٤±۳/۰۲[a]
تیمار ۷ (F20T100)	۸۳/۸±۲/۳۸[a]
تیمار ۸ (F20T200)	۸۳/۷۲±۲/۹٥[a]

داده‌ها بر اساس میانگین±خطای استاندارد بیان شده است.
داده‌ها توسط آزمون‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تکمیلی دانکن آنالیز شدند.
حروف مختلف تفاوت معناداری را بین تیمارهای مختلف نشان می‌دهند ($P<۰/۰٥$).

درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف، متعاقب اضافه کردن مواد محافظ انجماد (FBS و ترهالوز) مشابه درصد حیات این سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی (۸۷/٦٤±۲/۳۳) بود و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>۰/۰٥$). بنابراین، به نظر می‌رسد مواد محافظ انجماد، تأثیر سمّی روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نداشته و منجر به کاهش معنادار درصد زنده‌مانی این سلول‌ها در مرحله قبل از انجماد نشده‌اند. این مقایسه به تست سمّیت معروف بود و هدف از انجام آن بررسی تأثیر سمّی مواد محافظ انجماد بر زنده‌مانی سلول‌ها می‌باشد (جدول شماره ۲). اثرات غلظت‌های مختلف FBS (۱۰ و ۲۰ درصد) و ترهالوز (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مول) بر روی درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی در جدول شماره ۳ ذکر شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میانگین درصد حیات سلول‌ها پس از یخ‌گشایی در تیمارهای حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F10T100)، ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F10T200) و ۲۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F20T200) در مقایسه با گروه کنترل (Fresh) به‌طور معناداری افزایش پیدا کرده است ($P<۰/۰٥$). علاوه‌بر این، در میان تیمارهای دارای غلظت‌های FBS یکسان و ترهالوز مختلف؛ تیمار حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F10T200) و نیز تیمار حاوی ۲۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F20T200) بیشترین میزان زنده‌مانی را نشان داده‌اند ($P<۰/۰٥$). در مقایسه بین تیمارهای دارای غلظت‌های FBS مختلف و ترهالوز یکسان؛ درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F10T100) بیشتر از گروه حاوی ۲۰ درصد FBS و ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F20T100) است. همچنین، درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F10T200) بیشتر از گروه حاوی ۲۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز (F20T200) می‌باشد ($P<۰/۰٥$). در حالت کلی می‌توان گفت که بیشترین میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از یخ‌گشایی در محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول ترهالوز مشاهده شد ($P<۰/۰٥$) (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استخراج‌شده از بیضه پس از فرآیند انجماد - یخ‌گشایی در گروه کنترل و تیمارهای مختلف

گروه‌های آزمایشی	درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs)
کنترل (Fresh)	۳۱/۸±۱/٦
تیمار ۱ (F10T0)	۳۷/۷۸±۱/٥۸[a]
تیمار ۲ (F10T50)	٤۱/٤٤±۱/۰٥[b]
تیمار ۳ (F10T100)	٥۲/۹٦±۱/۳۳[*, c, #]
تیمار ٤ (F10T200)	٦۷/۳۰±۱/۸۹[*, c, #]
تیمار ٥ (F20T0)	۳٤/۰۸±۰/۹۷[a]
تیمار ٦ (F20T50)	۳۹/۳۲±۱/٦۱[ab]
تیمار ۷ (F20T100)	٤۷/٤±۰/۸۷[ab]
تیمار ۸ (F20T200)	٦۰/۸۲±۰/٦٦[*, b]

داده‌ها بر اساس میانگین±خطای استاندارد بیان شده است.
داده‌ها توسط آزمون‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تکمیلی دانکن آنالیز شدند.
* نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه کنترل و تیمارهای مختلف می‌باشد ($P<۰/۰٥$).
حروف مختلف (a، b و c) در تیمارهای با غلظت‌های FBS یکسان و ترهالوز مختلف بیانگر تفاوت معنادار می‌باشند ($P<۰/۰٥$).
نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین تیمارهای با غلظت‌های FBS مختلف و ترهالوز یکسان می‌باشد ($P<۰/۰٥$).

بحث

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) نقطه شروع اسپرماتوژنز هستند و حضور آن‌ها برای تداوم تولید اسپرماتوزوآ و حفظ باروری ضروری است. علاوه‌بر این، از آن‌جا که این سلول‌ها تنها سلول‌های بنیادی جهت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعدی هستند، یک هدف عالی برای اصلاح ژنتیکی محسوب می‌شوند. بنابراین، شناخت فعالیت‌های بیولوژیکی و مکانیسم‌های حاکم بر

www.SID.ir

Archive of SID

توانایی آن‌ها برای خودنوزایی و تمایز مهم می‌باشد [۵]. در این خصوص، یک اصل ضروری برای مطالعه بیولوژی SSCs، توانایی تکثیر و حفظ جمعیت این سلول‌ها در *in vitro* برای دوره طولانی‌مدت است تا بتوان از آن‌ها به نحو مناسب و بهتری در موارد تحقیقاتی و درمانی استفاده کرد [۲۸]. از آن‌جایی که تعداد SSCs بسیار کم می‌باشد و نسل‌های مختلف سلول‌های زایا در بیضه حیوانات بالغ وجود دارند، سنّ مناسب برای جداسازی این سلول‌ها از بیضه و تکثیر آن‌ها، پیش از بلوغ می‌باشد [۹]. در مطالعه حاضر نیز بعد از استخراج SSCs از بافت بیضه بز نابالغ، برای تأیید ماهیت این سلول‌ها از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن اختصاصی PGP9.5 استفاده گردید و نتایج نشان داد که سلول‌ها این نشانگر را بیان کردند. بیان این نشانگر در SSCs گونه دامی بز در مطالعات قبلی انجام‌شده توسط کدیوریان و همکاران [۷]، حیدری و همکاران [۲۶] و شیرازی و همکاران [۲۹] نیز به اثبات رسیده است. انجماد، بهترین و پرکاربردترین روش برای نگهداری طولانی‌مدت SSCs است. از مهم‌ترین کاربردهای پزشکی تحقیقات روی انجماد این سلول‌ها می‌توان به حفظ باروری در پسران نابالغی که به دلیل ابتلا به سرطان تحت شیمی‌درمانی و یا رادیوتراپی قرار می‌گیرند، اشاره کرد. همچنین، انجماد این سلول‌ها می‌تواند برای حفظ گونه‌های پستاندارانی که در معرض خطر انقراض هستند نیز ارزشمند باشد [۳۰]. با این‌وجود، کاهش میزان زنده‌مانی، افزایش پیری و اختلال در عملکردهای سلولی از جمله عوارض گسترده گزارش‌شده در ارتباط با استرس اکسیداتیو است که در طول انجماد و یخ‌گشایی سلول‌ها ایجاد می‌شوند [۳۱]. استرس اکسیداتیو با تعادل بین تولید و تخریب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) درون یک بافت یا تعلیق سلولی ارزیابی می‌شود. فرآیندهای انجماد و یخ‌گشایی می‌توانند تشکیل ROS را افزایش دهند. این ترکیبات در بافت‌های حیاتی و عملکردهای سلولی، آسیب ایجاد می‌کنند و حیات سلولی را به خطر می‌اندازند [۱۰]. SSCs به‌دلیل استرس اسمزی هنگام انجماد و یخ‌گشایی، تغییرات زیادی را متحمل می‌شوند. تغییرات سریع در فشار اسمزی بر ساختار غشای سلولی و ساختارهای داخل سلولی تأثیر می‌گذارد [۳۲]. SSCs نسبت به اسپرم بالغ مقاومت بیشتری در برابر آسیب احتمالی ناشی از انجماد دارند که احتمالاً به دلیل فعالیت متابولیکی کمتر آن‌ها می‌باشد [۳۳]. شواهد تجربی اخیر نشان می‌دهند که آسیب یا مرگ سلول در طی فرآیند انجماد، عمدتاً در اثر تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی و خارج سلولی به‌وقوع می‌پیوندد. در مجموع تشکیل کریستال‌های یخ، باعث آسیب مکانیکی غشای پلاسمایی و به‌دنبال آن تخریب سلولی، آپوپتوز و نکروز می‌شود [۳۴]. تبلور مجدد (Recrystallization) نیز به‌عنوان یک عامل مهمّ دیگر در مرگ سلولی در طی انجماد شناخته شده است [۳۵]. بنابراین به کار بردن روشی که سلول را در برابر آسیب‌های ایجادشده طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی محافظت کند، ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی بر روی کاربرد انواع مواد محافظ سرمایی (CPAs) در انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به عمل آمده است. با این‌حال، مکانیسم‌های اساسی محافظت‌کنندگی CPAs از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هنگام انجماد – ذوب، تا حدّ زیادی ناشناخته است. این ترکیبات به احتمال زیاد در کاهش استرس اسمزی، تثبیت زیست مولکول‌ها و ساختارهای سلولی و محدود کردن اثرات مخرب ROS نقش دارند [۳۶]. بر اساس پژوهش‌های مختلف، افزودن مواد محافظ انجمادی مانند FBS و ترهالوز به محیط انجماد به‌طرز چشمگیری سبب افزایش کارایی انجماد و نیز میزان زنده‌مانی سلول‌های زایا شده است. با توجه به اهمیت گونه حیوانی بز و این‌که مطالعه‌ای در خصوص انجماد SSCs انجام نشده است، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارائه روشی بهینه در انجماد SSCs بز با استفاده از غلظت‌های مختلف FBS و ترهالوز می‌باشد. در مطالعه حاضر، درصد زنده‌مانی SSCs در گروه‌های تیمار، متعاقب اضافه کردن مواد محافظ انجماد مشابه درصد حیات این سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی از بیضه بز نابالغ بود و تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند. این مقایسه به تست سمّیت معروف است که برای ارزیابی مطلوب بودن مواد محافظ انجماد و اطمینان از عدم سمّیت شیمیایی و اثرات سوء احتمالی آن‌ها بر سلول‌های استخراج‌شده از بیضه به‌کار می‌رود. بنابراین مواد محافظ انجماد مورد استفاده در این مطالعه از نظر عدم سمّیت مطلوب به‌نظر می‌رسند. همچنین مشخص شد گروه‌هایی که FBS با غلظت ۱۰ درصد را دریافت کرده بودند، درصد زنده‌مانی بهتری نشان دادند. FBS ترکیبی طبیعی از فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، عناصر کمیاب و سایر مواد مغذی حمایت‌کننده از بقا و تکثیر سلول‌ها می‌باشد و به‌دلیل همین ویژگی‌های خود به یک مکمل استاندارد در محیط کشت سلول‌ها تبدیل شده است [۳۷]. در بیشتر موارد از غلظت ۱۰ درصد FBS استفاده می‌شود [۳۸] که در مطالعه حاضر نیز بالاترین درصد زنده‌مانی SSCs در همین غلظت مشاهده گردید. همچنین در مطالعه مقدم و همکاران [۱۷]، درصد زنده‌مانی SSCs برّه در محیط حاوی ۱۰ درصد FBS به‌طور معناداری بیشتر بود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. انجماد از طریق افزایش شکنندگی غشای سلولی باعث از بین رفتن عملکرد غشایی و آسیب کشنده در سلول‌ها می‌شود. حساسیت غشا، به‌عنوان عامل اصلی ایجاد آسیب در هنگام انجماد – یخ‌گشایی توصیف شده است و تغییرات پایدار

www.SID.ir

Archive of SID

غشای پلاسمایی منجر به افزایش نفوذپذیری غشا به آب و کاتیون‌ها و نیز حساسیت به استرس اسمزی می‌شود [۳۹]. غشای پلاسما در طول فرآیند انجماد در حضور FBS بهتر حفظ می‌شود. این فرضیه مطرح شده است که ترکیبات موجود در FBS به‌عنوان تثبیت‌کننده غشا عمل می‌کنند و ممکن است به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی نقش مهمّی در برابر آسیب غشای پلاسمایی در روند انجماد داشته باشند [٤٠]. علاوه‌بر این، FBS نقش محافظتی خود را در فرآیند انجماد – یخ‌گشایی با خروج آب از سلول و جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ و نیز کاهش تبلور مجدد ایفا می‌کند [٤١]. از طرف دیگر، بر اساس مطالعه حاضر، بهترین غلظت ترهالوز برای محافظت از انجماد SSCs بز ۲۰۰ میلی‌مول (mM) بود که مشابه نتایج مطالعه صورت‌گرفته در خوک می‌باشد [۱۹]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که افزودن ترهالوز به محیط انجماد به‌طور قابل‌توجهی باعث بهبودی، بقا و تکثیر SSCs می‌شود [۱۹،۱۸،۱۲]. ترهالوز، یک دی‌ساکارید غیر احیاکننده است که از دو مولکول گلوکز تشکیل شده است. اگرچه مکانیسم عمل ترهالوز تا حدودی ناشناخته است، اما به احتمال زیاد ترهالوز با تشکیل پیوندهای هیدروژن با فسفولیپیدها و پروتئین‌های غشایی، غشای سلولی را در حین انجماد تثبیت می‌کند [٤٢]. همچنین، ترهالوز به‌عنوان یک ماده محافظ انجماد نفوذناپذیر، یک محیط هیپرتونیک ایجاد می‌کند و با ایجاد فشار اسمزی موجب دهیدراتاسیون سلول قبل از انجماد می‌شود. این اثر، میزان یخ‌زدگی داخل سلولی را کاهش می‌دهد و باعث کاهش سلول‌های آسیب‌دیده به‌وسیله تشکیل کریستال‌های یخ می‌شود [٤٣]. از سوی دیگر گزارش شده است که ترهالوز به‌دلیل دارا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی پاک کردن رادیکال‌های آزاد، مانند H_2O_2 و $O_2^{\bullet -}$ را دارد [٤٤]. رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده در طی فرآیند انجماد – ذوب نقش مهمّی را در کاهش میزان زنده‌مانی SSCs ایفا می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها مواد افزودنی هستند که به‌طور نسبی یا کامل از آسیب‌های ناشی از استرس ایجادشده در زمان انجماد – ذوب جلوگیری می‌کنند [١٤]. طبق مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵؛ اثربخشی ترهالوز بر افزایش زنده‌مانی سلول‌های بافت بیضه گوساله در دوره انجماد – ذوب ممکن است به بهبود عملکرد آنتی‌اکسیدانی مربوط باشد [٤٥]. در این راستا، مطالعات آزمایشگاهی مختلف نشان داده‌اند که اضافه‌کردن ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی به محیط انجماد می‌توانند میزان زنده‌مانی SSCs را بهبود ببخشند. برای مثال؛ شعبانی و همکاران نشان دادند که غلظت‌های مختلف ویتامین E و ویتامین C در محیط انجماد، قابلیت زنده‌مانی SSCs را پس از یخ‌گشایی، در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهند [٤٦]. علاوه‌بر این، سلنیوم نیز از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. سلنیوم از اجزای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله گلوتاتیون پراکسیداز به‌شمار می‌رود که در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و رفع استرس اکسیداتیو نقش مهمّی دارد. بروجنی و همکاران در مطالعه خود که به بررسی اثر سلنیوم بر آسیب‌های ناشی از انجماد – ذوب در SSCs موش نابالغ پرداختند، نشان دادند که سلنیوم بر روی این سلول‌ها اثرات محافظتی دارد که به‌واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهار آپوپتوز می‌باشد [٤٧]. در این رابطه، مطالعه دیگری نیز نشان داد که وجود سلنیوم باعث کاهش میزان آسیب بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه موش نابالغ در طی فرآیند انجماد – ذوب می‌شود [٤٨]. بنابراین، با در نظر گرفتن مطالب ذکرشده می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از اثرات محافظت‌کنندگی ترهالوز بر روی SSCs طی فرآیند انجماد – یخ‌گشایی احتمالاً می‌تواند به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، استفاده از محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲۰۰ میلی‌مول (mM) ترهالوز اثرات مثبتی بر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز دارد. بنابراین به‌کار بردن محیط انجماد حاوی این ترکیبات جهت نگهداری طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توصیه می‌شود. در این راستا، انجام مطالعات بیشتر جهت آشکارسازی مکانیسم‌های دخیل ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه رازی می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه رازی (به دلیل حمایت‌های مالی) تقدیر و تشکر می‌گردد.

References:

[1] Oatley JM, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. ***Methods Enzymol*** 2006; 419: 259-82.
[2] de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. ***Microsc Res Tech*** 2009; 72(8): 580-5.
[3] Hill JR, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. ***Reprod Fertil Dev*** 2005; 18(2): 13-18.

www.SID.ir

Archive of SID

[4] Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2011; 9: 141.
[5] Aponte PM. Spermatogonial stem cells: current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. ***World J Stem Cells*** 2015; 7(4): 669-80.
[6] Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. ***Reproduction*** 2014; 147(3): 65-74.
[7] Kadivarian H, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Evaluation of the effect of follicle stimulating hormone (FSH) on survival and colonization of caprine spermatogonial stem cells during in vitro culture. ***Qom Univ Med Sci J*** 2020; 13(12): 1-12. [in Persian]
[8] Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. ***Methods Cell Biol*** 2008; 86: 59-84.
[9] Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, Den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type a spermatogonia. ***J Androl*** 2002; 23(4): 537-45.
[10] Aliakbari F, Yazdekhasti H, Abbasi M, Hajian Monfared M, Baazm M. Advances in cryopreservation of spermatogonial stem cells and restoration of male fertility. ***Microsc Res Tech*** 2016; 79(2): 122-9.
[11] Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. ***Reprod Biomed Online*** 2004; 9(6): 680-91.
[12] Lee YA, Kim YH, Kim BJ, Kim BG, Kim KJ, Auh JH, et al. Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine spermatogonial stem cells. ***PLoS ONE*** 2013; 8(1): e54889.
[13] Gholami M, Hemadi M, Saki G, Zendedel A, Khodadadi A, Mohammadi-asl J. Does prepubertal testicular tissue vitrification influence spermatogonial stem cells (SSCs) viability? ***J Assist Reprod Genet*** 2013; 30(10): 1271-7.
[14] Len JS, Koh WS, Tan SX. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. ***Biosci Rep*** 2019; 39(8): BSR20191601.
[15] Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. ***Hum Reprod Update*** 2016; 22(6): 744-61.
[16] Lee YA, Kim YH, Ha SJ, Kim BJ, Kim KJ, Jung MS, et al. Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. ***Fertil Steril*** 2014; 101(4): 1165-75.
[17] Moghaddam AA, Rahimi-Felyi P, Nikousefat Z, Zarghami S. Effects of different concentrations of sucrose and fetal bovine serum on viability rate of lamb spermatogonial stem cells before and after cryopreservation. ***Feyz*** 2016; 20(2): 157-64. [in Persian]
[18] Kim KJ, Lee YA, Kim BJ, Kim YH, Kim BG, Kang HG, et al. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. ***Cryobiology*** 2015; 70(2): 175-83.
[19] Lee YA, Kim YH, Ha SJ, Kim KJ, Kim BJ, Kim BG, et al. Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose. ***J Anim Sci*** 2014; 92(3): 984-95.
[20] Yang PF, Hua TC, Tsung HC, Cheng QK, Cao YL. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by programmed freezing. ***Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*** 2005; 1(1): 482-5.
[21] Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. ***Nat Biotechnol*** 2000; 18: 163-7.
[22] Limaye LS, Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. ***J Hematother Stem Cell Res*** 2001; 10: 709-18.
[23] Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. ***Biol Reprod*** 2003; 69(4): 1245-50.
[24] van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. ***Biol Reprod*** 1996; 55(2): 439-44.
[25] Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA, Nikousefat Z. Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro. ***Feyz*** 2016; 20(3): 205-13. [in Persian]
[26] Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Shirazi A, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. ***J Assist Reprod Genet*** 2012; 29(10): 1029-38.
[27] Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. ***Theriogenology*** 2006; 66(9): 2091-103.
[28] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. ***Proc Natl Acad Sci*** 2004; 101(47): 16489-94.
[29] Shirazi MS, Heidari B, Shirazi A, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Rahmati-Ahmadabadi M, et al. Morphologic and proliferative characteristics of goat type A spermatogonia in the presence of different sets of growth factors. ***J Assist Reprod Genet*** 2014; 31(11): 1519-31.
[30] Moraveji SF, Esfandiari F, Sharbatoghli M, Taleahmad S, Nikeghbalian S, Shahverdi A, et al. Optimizing methods for human testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell isolation. ***J Cell Biochem*** 2019; 120(1): 613-21.
[31] Ha SJ, Kim BG, Lee YA, Kim YH, Kim BJ, Jung SE, et al. Effect of antioxidants and apoptosis

www.SID.ir

Archive of SID

inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cells. ***PLoS ONE*** 2016; 11(8): e0161372.
[32] Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good'or 'poor' for freezing. ***Anim Reprod Sci*** 2011; 125(1-4): 112-8.
[33] van Casteren NJ, van der Linden GH, Hakvoort-Cammel FG, Hählen K, Dohle GR, van den Heuvel-Eibrink MM. Effect of childhood cancer treatment on fertility markers in adult male long-term survivors. ***Pediatr Blood Cancer*** 2009; 52(1): 108-12.
[34] Bissoyi A, Nayak B, Pramanik K, Sarangi SK. Targeting cryopreservation-induced cell death: a review. ***Biopreserv Biobank*** 2014; 12(1): 23-34.
[35] Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. ***Ann N Y Acad Sci*** 2006; 1066(1): 119-35.
[36] Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. ***Organogenesis*** 2009; 5(3): 90-6.
[37] Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen ÅF, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. ***Toxicol In Vitro*** 2010; 24(4): 1053-63.
[38] Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. ***ALTEX*** 2003; 20(4): 275-81.
[39] Huebinger J. Modification of cellular membranes conveys cryoprotection to cells during rapid, non-equilibrium cryopreservation. ***PloS ONE*** 2018; 13(10): e0205520.
[40] Marco-Jiménez F, Garzón DL, Peñaranda DS, Pérez L, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, et al. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. ***Cryobiology*** 2006; 53(1): 51-7.
[41] Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclère M, Tam RY, Capicciotti CJ, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. ***Glycobiology*** 2012; 22(1): 123-33.
[42] Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. ***CryoLetters*** 2004; 25(6): 375-88.
[43] Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, et al. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. ***Biol Reprod*** 2013; 88(3): 1-11.
[44] Mizunoe Y, Kobayashi M, Sudo Y, Watanabe S, Yasukawa H, Natori D, et al. Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. ***Redox Biol*** 2018; 15: 115-124.
[45] Zhang XG, Wang YH, Han C, Hu S, Wang LQ, Hu JH. Effects of trehalose supplementation on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine calf testicular tissue. ***Cryobiology*** 2015; 70(3): 246-52.
[46] Shabani H, Zandi M, Ofoghi H, Sanjabi MR, Hoseini Pajooh K. The effect of combining vitamin E and C on the viability improvement of transfected ovine spermatogonial stem cells after cryopreservation and thawing. ***Turk J Vet Anim Sci*** 2017; 41(5): 648-55.
[47] 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.
[48] Kushki D, Azarnia M, Gholami M. Antioxidant effects of selenium on seminiferous tubules of immature mice testis. ***Zahedan J Res Med Sci*** 2015; 17(12): 29-33.

www.SID.ir