Original Article

Effects of different concentrations of sucrose and fetal bovine serum on viability rate of lamb spermatogonial stem cells before and after cryopreservation

Moghaddam AA, Rahimi-Feyli P, Nikousefat Z, Zarghami S

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, I. R. Iran.

Received May 23, 2015; Accepted November 11, 2015

Abstract:

Background: Spermatogonial stem cells (SSCs) have diverse applications in reproductive medicine and biotechnology. Cryopreservation is the well-known method for long-term storage of these cells. The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of fetal bovine serum (FBS) and Sucrose on the viability rate of spermatogonial cells.

Materials and Methods: Testicular cells of pre-pubertal lambs were separated in a two-step enzymatic isolation and purified by differential plating. Then, the cells were divided in 6 groups. Groups 1, 2 and 3 were treated with FBS (10%) and Sucrose (0.07, 0.14 and 0.21 molar concentration (M)) and groups 4, 5 and 6 with FBS (20%) and Sucrose (0.07, 0.14 and 0.21 M), respectively. The viability rate of the cells was evaluated immediately after isolation, addition of cryoprotectant agents and thawing procedures. Identification of spermatogonial cells in the culture was performed using the immunocytochemistry staining against PGP9.5.

Results: The results showed that cryoprotectant do not have any harmful effects on lamb´s SSCs. Moreover, viability rate of the cells in freezing media containing FBS (10%) is significantly higher than the media containing FBS (20%). Furthermore, increasing concentrations of Sucrose (0.07, 0.14 and 0.21 M) had no beneficial effect on the spermatogonial viability rate.

Conclusion: It was concluded that freezing media containing dimethyl sulfoxide (10%) and FBS (10%) and Sucrose (0.07 M) is appropriate for cryopreservation of lamb spermatogonial cells.

Keywords: Lamb Spermatogonia, Cryopreservation, Sucrose, Fetal bovine serum, PGP9.5

* **Corresponding Author.**
Email: peymanrahimi@razi.ac.ir
Tel: 0098 83 383 20041
Fax: 0098 83 383 22599

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2016; Vol. 20, No 2, Pages 157-164

Please cite this article as: 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

اثرات غلظت‌های مختلف ساکاروز و سرم جنین گوساله بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بره قبل و بعد از انجماد

علی اصغر مقدم [۱]، پیمان رحیمی فیلی [۲*]، زهرا نیکوصفت [۲]، سجاد ضرغامی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کاربردهای فراوانی در طب تولید مثلی و زیست‌فناوری دارند. جهت نگهداری طولانی‌مدت این سلول‌ها از تکنیک انجماد استفاده می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف FBS و ساکاروز روی درصد حیات اسپرماتوگونی بره بود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بیضه بره‌های نابالغ با روش هضم آنزیمی دو مرحله‌ای استخراج شده و با حذف تمایزی خالص‌سازی گردید. سپس، سلول‌ها به ۶ گروه آزمایشی تقسیم بندی شدند. در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ از FBS با غلظت ۱۰ درصد و از ساکاروز به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱ مولار و در گروه‌های ۴، ۵ و ۶ از FBS با غلظت ۲۰ درصد و از ساکاروز به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱ مولار استفاده شد. درصد حیات سلول‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی در سه مرحله مختلف (بلافاصله پس از استخراج، متعاقب افزودن محیط انجماد و پس از یخ‌گشایی) مورد سنجش قرار گرفت. جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه PGP9.5 استفاده شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد مواد محافظ در برابر انجماد اثرات سمی روی اسپرماتوگونی بره ندارند. هم‌چنین، درصد زنده‌مانی این سلول‌ها در محیط حاوی ۱۰ درصد FBS به‌طور معنی‌داری بیشتر از درصد زنده‌مانی آنها در محیط حاوی ۲۰ درصد FBS بود. علاوه بر این، افزایش غلظت‌های ساکاروز (۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱) تاثیر مثبتی روی درصد زنده‌مانی اسپرماتوگونی نداشت.

نتیجه‌گیری: در مجموع به‌نظر می‌رسد استفاده از محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد DMSO توام با ۱۰ درصد FBS و ۰/۰۷ مولار ساکاروز برای انجماد اسپرماتوگونی بره مناسب است.

واژگان کلیدی: اسپرماتوگونی بره، انجماد، ساکاروز، سرم جنین گاو، PGP9.5

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۵، صفحات ۱۶۴-۱۵۷

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) که سرآغاز فرآیند اسپرماتوژنز هستند با تزاید و تمایز مداوم خود این فرآیند را پیش می‌برند. سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A در بسیاری از پستانداران غیر پریمات از جمله گوسفند و جوندگان [۱] به‌عنوان سلول‌های بنیادی در نظر گرفته می‌شوند [۲،۱]. این سلول‌ها پس از انجام تعدادی تقسیم میتوز و میوز به اسپرماتوسیت، اسپرماتید و پس از تکامل به اسپرماتوزوآ تبدیل می‌شوند [۳]. این سلول‌ها یک جمعیت سلولی کم تعداد هستند که در یک ریز محیط پیچیده سلولی درون بیضه پراکنده شده‌اند [۴]. شناسایی و جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌دلیل نبود نشانگرهای اختصاصی سطحی سلول و تعداد نسبتا کم این سلول‌ها در بیضه مشکل می‌باشد [۵].

پیشرفت در علم کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و توانایی ارزیابی پتانسیل بنیادی بودن عملکرد این سلول‌ها به‌واسطه تکنیک پیوند، درهای جدیدی را جهت مطالعات عملکرد ژن در این نوع سلول که دسترسی به آن مشکل است می‌گشاید [۶]. امروزه، کشت، انجماد و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روش جدیدی است که به‌کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل دخیل در ناباروری را بهتر بررسی نمود [۷]. علاوه بر این، چنین سلول‌هایی هدف مناسبی برای دست‌کاری‌های ژنتیکی و تحقیقات درمانی و آزمایش‌های بیولوژیکی محسوب می‌شود. نکته قابل توجه در مورد این سلول‌ها، دارا بودن قدرت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعدی می‌باشد، که از این نظر تنها سلول‌های بنیادی بزرگسالان هستند که این خاصیت را دارند [۸]. هم‌چنین، کشت آزمایشگاهی و نگهداری طولانی‌مدت این سلول‌ها با استفاده از تکنیک انجماد به تولید حیوانات تراریخته کمک می‌نماید [۹]. پروتکل‌های کشت بلندمدت و انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مطالعات پیشین شرح داده شده است [۱۰]. توسعه و پیشرفت در تکنیک‌های کشت آزمایشگاهی و انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات اهلی لازمه انجام

[۱] دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
[۲] استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
[۳] دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
*نشانی نویسنده مسئول:
کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی
تلفن: ۰۸۳۳۸۳۲۲۵۹۹ دورنویس: ۰۸۳۳۸۳۲۰۰۴۱
پست الکترونیک: peymanrahimi@razi.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۸/۲۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

تکنیک پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی در این گونه‌ها می‌باشد. انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی امکان بقای طولانی‌مدت این سلول‌ها، بدون ایجاد اثرات مخرب آشکار بر عملکردشان را فراهم می‌سازد. انجماد بهترین روش برای حفظ طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است [۱۱]. مطالعه در زمینه روش‌های مختلف انجماد و تاثیر آن بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی به شناخت هرچه بیشتر این سلول‌ها کمک می‌کنند. باتوجه به کاربرد این جمعیت سلولی پراهمیت در تولید حیوانات تراریخته [۱۲]، درمان سرطان (حفظ سلول‌های بنیادی در بیماران انکولوژیک)، درمان ناباروری و کنترل باروری در انسان [۱۳]، حفظ گونه‌ها و نژادهای حیوانی کمیاب، نادر و در حال انقراض [۱۲]، دست‌کاری‌های ژنتیکی و ایجاد حیوانات دورگه به‌منظور ایجاد قابلیت سازگاری زیاد با شرایط اقلیمی متفاوت [۱۲]، آشنایی هرچه بیشتر با این سلول‌ها جهت تولید آزمایشگاهی و نگهداری طولانی‌مدت این سلول‌ها ضروری می‌باشد. سرم گوساله جنینی (FBS) یکی از معمول‌ترین مواد محافظ سلول در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد می‌باشد. FBS سرشار از فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، پروتئین‌ها (از جمله آلبومین، گاماگلوبولین و آلفاگلوبین)، ویتامین‌ها (EوA)، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها (از جمله لیپوپروتئین)، مواد معدنی و عناصر کمیاب و مواد ناشناخته دیگری است [۱۴]. دیده شده است که FBS روی بقای سلول‌ها در زمان انجماد تاثیر مثبتی دارد. محققین بر این باورند که غشای پلاسما در طول فرآیند انجماد در حضور FBS بهتر حفظ می‌شود. در واقع FBS نقش خود را در فرآیند انجماد با خروج آب از سلول و جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ ایفا می‌کند [۱۵]. هم‌چنین، وجود ساکاروز در محیط انجماد برای بهبود زنده‌مانی سلول‌ها ضروری است [۱۶]. تاکنون ساکاروز در انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی خوک، گاو و موش با موفقیت استفاده شده است [۱۹،۱۱–۱۷]. باتوجه به اهمیت بالقوه گونه دامی گوسفند در ساخت حیوانات تراریخته و به تبع آن تولید زیست‌داروهای مختلف و هم‌چنین مدل‌های آزمایشات پزشکی و بالینی، پایه‌ریزی بهترین پروتکل برای انجماد و نگهداری طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی با استفاده از FBS و ساکاروز در این گونه دامی در محیط آزمایشگاه بسیار مهم به‌نظر می‌رسد. هدف از انجام این طرح، بررسی و مطالعه تعیین بهترین غلظت FBS و ساکاروز و در نهایت پیشنهاد یک پروتکل برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت آن‌ها در محیط آزمایشگاه است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌ها

جهت تهیه نمونه‌های بیضه از بره‌های کشتاری نابالغ استفاده شد. نمونه‌های مورد نیاز از کشتارگاه صنعتی تهیه و در مجاورت یخ ظرف مدت کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه بیضه از بیضه‌دان خارج شده و با استفاده از پنس و تیغ جراحی استریل اپیدیدیم به‌طور کامل از بیضه جدا شد. سپس، ۱۰ گرم بافت پارانشیم بیضه به کمک قیچی استریل برداشته شده و داخل لوله فالکون استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (GIBCO, UK) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و به‌مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ (Hettich, Germany) شد؛ این عمل ۳ بار تکرار گردید. برای استخراج سلول از بیضه از روش van Pelt و همکاران استفاده شد [۲۰]. به‌طور خلاصه ابتدا بافت بیضه با استفاده از قیچی استریل به‌طور کامل تکه‌تکه شد و سپس وارد مرحله هضم آنزیمی شد. در مرحله اول هضم آنزیمی پتری‌دیش حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه به‌مدت ۴۵ دقیقه در مجاورت آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم تریپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma-Aldrich, Germany) در انکوباتور (Mem-mert, Germany) قرار داده شد. به‌منظور افزایش راندمان تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانشیم بیضه هر ۱۰ دقیقه یک‌بار پی‌پتاژ شد. در مرحله دوم هضم آنزیمی، سلول‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در مجاورت آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ (به غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و DNaseI (به غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قرار داده شد. سپس، محتویات پتری‌دیش‌ها داخل لوله‌های فالکون استریل منتقل شده و به‌منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقیمانده به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتریفوژ شد. به‌منظور توقف هضم آنزیمی هم‌حجم آنزیم مورد استفاده، FBS به لوله فالکون اضافه شد. به‌منظور حذف سلول‌های مایویید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری (Sartorious, Denmark) عبور داده شد و به‌مدت ۲ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتریفوژ شد. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، رسوب موجود در لوله‌های فالکون با ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM آماده حاوی آنتی بیوتیک حل گردید.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

اضافه کردن محلول انجماد به تعلیق سلولی

وضعیت حیات سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK)، لام هموسیتومتر و میکرو-سکوپ نوری (Olympus, Japan) به‌شرح ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت: ۱۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط شدند و به‌مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول مذکور به لام هموسایتومتر منتقل شد. به‌علت نفوذ رنگ تریپان بلو به درون سلول‌های مرده این سلول‌ها رنگ پذیرفته و به رنگ آبی دیده می-شوند، ولی سلول‌های زنده این رنگ را به بیرون پمپ می‌کنند و به‌صورت سفید و بدون رنگ دیده می‌شوند. با شمارش یک‌صد سلول به‌طور تصادفی تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین شده و بر این اساس درصد حیات نمونه محاسبه گردید. سپس، به هریک از شش عدد لوله انجماد، نیم میلی‌لیتر از تعلیق سلولی (حاوی ۱۰۰۰۰۰ سلول) منتقل شد و متعاقبا ۶ محلول مختلف انجماد با غلظت ۲X که بر پایه ۱۰ درصد DMSO (Sigma, USA) تهیه شده بود به‌صورت تدریجی و آرام‌آرام در عرض ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به شکل قطره‌قطره و به نسبت هم‌حجم با تعلیق سلولی به هریک از ویال‌ها اضافه گردید و سپس به آرامی ویال‌ها را تکان داده تا محیط انجماد و تعلیق سلولی کاملا مخلوط شود. محلول‌های مختلف انجماد به‌شرح ذیل بودند: تیمار۱: ۰/۰۷ مولار ساکاروز و ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار۲: ۰/۱۴ مولار ساکاروز و ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار۳: ۰/۲۱ مولار ساکاروز و ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار۴: ۰/۰۷ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار۵: ۰/۱۴ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار۶: ۰/۲۱ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی. مجددا درصد حیات سلول‌های موجود در هر ۶ ویال محاسبه گردید (تست سَمیت شیمیایی محلول انجماد) و به‌دنبال آن هرکدام از ویال‌های مذکور به‌مدت ۲ ساعت در یخچال با دمای °۴ سانتی‌گراد منتقل شد. بعد از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت انجماد بر روی بخار ازت نگهداری شده و پس از آن به تانک نیتروژن مایع (Spectrum-35 series, USA) با دمای °۱۹۶- درجه منتقل شدند. ویال‌ها پس از ۵ دقیقه از تانک نیتروژن خارج شده و پس از یخ‌گشایی، محتویات هریک از ویال‌ها به داخل لوله‌های فالکون انتقال داده شد و به هریک از لوله‌های فالکون ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM به‌صورت تدریجی و به آهستگی اضافه شد و لوله‌های فالکون در دور ۳۲۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس، تعلیق محلول بالای هریک از لوله‌های فالکون دور ریخته شد. در نهایت، درصد حیات نمونه هریک از لوله‌های فالکون (۶ تیمار مختلف) طبق روشی که پیش از این ذکر شد محاسبه گردید.

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با رنگ‌آمیزی ایمونو-سیتوشیمی علیه نشانگر PGP9.5

جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 با استفاده از روش حیدری و همکاران [۲۱] به‌شرح ذیل استفاده شد: پس از جداسازی سلول‌ها، بلوک کردن اولین مکان غیراختصاصی به-وسیله avidin/biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفند به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس، اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش PGP9.5 (Dako, Carpinteria, USA) با رقت ۱:۱۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. مقطع پس از سه مرتبه شستشو با TBS/BSA (هربار ۵ دقیقه) در دمای اتاق به‌مدت ۴۵ دقیقه تماس با آنتی‌بادی ثانویه (biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna Research Institute, Iran) قرار گرفت و مجددا با TBS/BSA شستشو داده شد. مقطع به‌مدت ۳۰ دقیقه در تماس با HRP-conjugated streptavidin (Biosource, USA) با رقت ۱:۵۰۰ قرار داده شد و سپس با TBS/BSA شستشو داده شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی‌آمینوبنزیدین (Roche, Germany) به مقطع، به‌مدت ۱۰-۸ دقیقه رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید با آب مقطر کاملا تمیز شد و مجددا با هریس هماتوکسیلین به‌مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شد. دوباره با آب مقطر شستشو داده شد. سپس، اسلاید با الکل آب‌گیری شد و با گزیلول شفاف شد و با اِنتِنال (Merck, Germany) پوشانده شد. در نهایت سطح اسلاید به‌وسیله گلیسرول و PBS (نسبت ۱:۱) پوشانده شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آنالیز آماری

برای نرمال کردن داده‌ها از نرم‌افزار آماری 3.1.2R و تست کاکس‌باکس استفاده شد. سپس، با استفاده از آنالیز واریانس اثرات انجماد، غلظت‌های مختلف FBS و غلظت‌های مختلف ساکاروز مورد بررسی قرار گرفت و آزمون میانگین بین گروه با استفاده از تست دانکن صورت پذیرفت. مقادیر $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار درنظر گرفته شد.

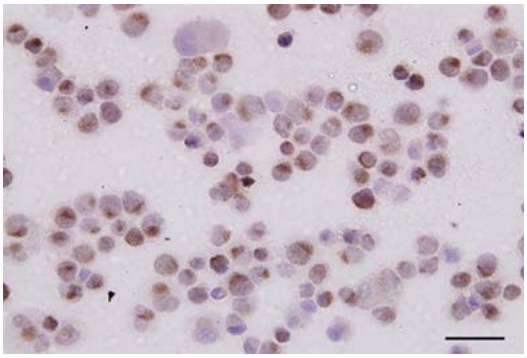
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

نتایج

در این مطالعه سلول‌های مستخرج از بیضه آنتی‌ژن PGP9.5 را بیان کردند (شکل شماره ۱). درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های تیمار متعاقب اضافه کردن مواد محافظ انجماد مشابه درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بلافاصله پس از جداسازی بود و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول شماره ۱). لذا، به‌نظر می‌رسد مواد محافظ انجماد تاثیر سمی روی سلول‌های اسپرماتوگونی نداشته و منجر به کاهش معنی‌دار درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی در مرحله قبل از انجماد نشدند ($P>0/05$). اثرات غلظت‌های مختلف FBS (۱۰ و ۲۰ درصد) و غلظت‌های مختلف ساکاروز (۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱ مولار) در مراحل قبل از انجماد و پس از انجماد-یخ‌گشایی به‌ترتیب در جداول شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است. غلظت‌های مختلف FBS (۱۰ و ۲۰ درصد) در مرحله قبل انجماد اثرات معنی‌داری روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی نداشته است ($P>0/05$)، ولی متعاقب انجماد و پس از یخ‌گشایی غلظت‌های ۲۰ درصد FBS در مقایسه با غلظت‌های ۱۰ درصد FBS سبب کاهش معنی‌دار درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی شده است ($P<0/05$). هم‌چنین، غلظت‌های مختلف ساکاروز (۰/۰۷، ۰/۱۴ و۰/۲۱ مولار) در مراحل قبل از انجماد و هم‌چنین متعاقب انجماد و پس از یخ‌گشایی اثرات معنی‌داری روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی ندارد. انجماد به‌تنهایی اثرات معنی‌داری روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی داشته است؛ به‌طوری‌که انجماد در هر دو غلظت FBS و در هر سه غلظت ساکاروز سبب کاهش معنی‌دار درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی در مقایسه با مرحله قبل از انجماد شده‌است. به‌نظر می‌رسد افزایش غلظت FBS در مرحله انجماد و متعاقب یخ‌گشایی اثرات منفی روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی دارد، ولی افزایش غلظت ساکاروز در مرحله انجماد و متعاقب یخ‌گشایی اثرات منفی روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی ندارد ($P<0/05$).

بحث

در این مطالعه برای افزایش درصد حیات بعد از یخ‌گشایی از غلظت‌های مختلف FBS استفاده شد و با افزایش غلظت FBS از ۱۰ به ۲۰ درصد، نرخ حیات سلول‌های اسپرماتوگونی متعاقب یخ‌گشایی کاهش یافت. ایزدیار و همکاران در مطالعه‌ای که روی سلول‌های اسپرماتوگونی گاو صورت گرفت، نشان دادند افزایش غلظت‌های FBS از ۱۰ به ۲۰ درصد در محیط محافظ در برابر انجماد حاوی DMSO اثری مثبتی بر روی بقاء سلول‌ها پس از یخ گشایی ندارد [۱۱].



شکل شماره ۱- رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه پروتئین PGP9.5. سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شوند. میله: ۸۰ میکرومتر

جدول شماره ۱- درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بلافاصله پس از جداسازی و متعاقب اضافه کردن مواد مختلف محافظ در برابر انجماد (تست سمیت شیمیایی)

گروه‌ها	بلافاصله بعد از جداسازی	متعاقب اضافه کردن مواد مختلف محافظ در برابر انجماد
گروه ۱	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۸۱/۷±۴/۳۸
گروه ۲	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۷۹/۰۲±۳/۹۱
گروه ۳	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۸۱/۳±۳/۸۳
گروه ۴	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۸۱/۷±۳/۹۵
گروه ۵	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۸۰/۷۲±۳/۳۷
گروه ۶	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۸۰/۴±۴/۰۱

جدول شماره ۲- اثرات غلظت‌های مختلف FBS (۱۰ و ۲۰ درصد) روی درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط انجماد

	اثرات غلظت FBS	
مرحله	۱۰ درصد	۲۰ درصد
قبل از انجماد	۸۰/۶۷±۲/۱۹^{a}	۸۰/۹۴±۲/۰۳^{a}
انجماد -یخ‌گشایی	۶۱/۹۳±۱/۰۵^{b}	۵۷/۲۲±۰/۸۵^{c}

مقادیر با حروف متفاوت در هر ستون (انجماد) و در هر ردیف (FBS) اختلاف معنی‌دار باهم دارند ($P<0/05$).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

جدول شماره ۳- اثرات غلظت‌های مختلف ساکاروز (۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱ مول) روی درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط انجماد

	اثرات غلظت ساکاروز		
مرحله	۰/۰۷	۰/۱۴	۰/۲۱
قبل از انجماد	۸۱/۷±۲/۷۸[a]	۷۹/۸۷±۲/۴۵[a]	۸۰/۸۵±۲/۶۲[a]
انجماد-یخ‌گشایی	۶۱±۱/۴۸[b]	۵۹/۴۸±۱/۵۷[b]	۵۸/۲۶±۱/۲۴[b]

مقادیر با حروف متفاوت در هر ستون (اثرات انجماد) و در هر ردیف (اثرات ساکاروز) اختلاف معنی‌دار باهم دارند ($P<۰/۰۵$).

مکانیسم دقیقی که FBS از طریق آن از سلول در برابر انجماد محافظت می‌کند هنوز ناشناخته است [۱۵]. در مطالعه جنت علیپور و همکاران افزایش غلظت FBS سبب افزایش زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی شده است [۲۲]، درحالی‌که در مطالعه حاضر افزایش غلظت FBS سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی شده است. علت احتمالی این مسئله این می‌باشد که در مطالعه جنت علیپور و همکاران تنها از FBS به‌عنوان ماده محافظ در برابر انجماد استفاده شده است، درحالی‌که در مطالعه حاضر علاوه بر FBS از ماده محافظ در برابر انجماد ساکاروز به‌عنوان مکمل FBS استفاده شده است. ساکاروز از طریق فشار اسمزی [۲۴،۲۳] و FBS از طریق فشار آنکوتیک سبب خروج آب از سلول در طی انجماد می‌شوند [۲۵] و در زمان یخ‌گشایی آب کمتری به داخل سلول بر می‌گردد که سبب دهیدراته شدن و آسیب به سلول می‌شود؛ در نتیجه درصد زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر برای افزایش درصد حیات از سطوح مختلف ساکاروز به‌عنوان ماده محافظ در برابر انجماد نفوذناپذیر (۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱ مول) استفاده شد و نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد افزایش غلظت ساکاروز تاثیر معنی‌داری روی درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی نداشت. البته این نکته مغایر نقش حفاظتی ساکاروز در برابر انجماد نیست؛ چراکه وجود ساکاروز در محیط انجماد برای بهبود زنده‌مانی سلول‌ها ضروری است [۱۶]. به‌نظر می‌رسد با افزایش غلظت ساکاروز زنده‌مانی بهبود نمی‌یابد و ساکاروز عمل خود را با همان غلظت پایه (۰/۰۷) هم ایجاد می‌کند. Kaul و همکاران برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز از غلظت‌های ۱۰ درصد DMSO و FBS و ۰/۰۷ مول ساکاروز استفاده کردند و سلول‌ها را ابتدا در ۸۰°- سانتی‌گراد و سپس در ۱۹۶°- سانتی‌گراد منجمد کرده و به‌مدت ۲ و ۴ ماه نگهداری کردند [۲۶]. ایزدیار و همکاران اثرات مواد محافظ در برابر انجماد مختلف و پروتکل‌های انجمادی مختلف را روی زنده‌مانی سلول‌های تیپ A گاوی بررسی کرده و نشان دادند که اضافه کردن غلظت‌های مختلف ۰/۰۷، ۰/۱۴ یا ۰/۲۱ مولار ساکاروز به محیط محافظ در برابر انجماد با پایه DMSO سبب افزایش محسوس میزان زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های مذکور می‌شود [۱۱]. مولکول‌های قندی مواد محافظ در برابر انجماد نفوذناپذیر سبب تثبیت ماکرومولکول‌های غشای سلول شده و از این طریق به بقاء بیشتر سلول در خلال انجماد کمک می‌کند [۱۷]. استفاده از مواد محافظ در برابر انجماد نفوذناپذیر توام با مواد محافظ در برابر انجماد نفوذپذیر و انکوبه کردن سلول‌ها در این تعلیق در مرحله قبل از انجماد، منجر به خروج هرچه بیشتر آب از داخل سلول و کاهش مدت زمان تماس سلول با اثرات سمی مواد محافظ در برابر انجماد نفوذپذیر می‌شود [۱۶]. در صورت استفاده از مواد محافظ در برابر انجماد نفوذپذیر به‌تنهایی در مرحله یخ‌گشایی غلظت این مواد پس از یخ‌گشایی کاهش یافته و اصطلاحاً رقیق می‌شوند و در نتیجه به‌علت کاهش فشار اسمزی داخل سلول، آب به سرعت وارد سلول شده و سلول به‌علت شوک اسمزی دچار تورژسانس می‌شود [۲۷]. لذا، استفاده از ساکاروز به‌عنوان ماده محافظ در برابر انجماد نفوذناپذیر با ایجاد تعادل فشار اسمزی در داخل و خارج سلول، مانع ورود بیش از حد آب به داخل سلول شده و سبب جلوگیری از تورم و تورژسانس سلول و کاهش غلظت مواد محافظ در برابر انجماد نفوذپذیر می‌شود [۱۶]. FBS با کمک فشار آنکوتیک حاصل از پروتئین‌ها [۲۵] و ساکاروز با کمک فشار اسمزی سبب خروج آب از سلول می‌شوند [۲۴،۲۳]. بنابراین، محیط مناسب جهت انجماد بهینه و کارا بایستی شامل دی‌ساکاریدها مثل ساکاروز یا تری‌هالوز و پروتئین‌ها و پلیمرها باشد [۲۹،۲۸]. در مطالعه حاضر درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از جداسازی و متعاقب اضافه کردن مواد محافظ در برابر انجماد به‌ترتیب ۸۴/۳۴±۳/۷۲ و ۸۰/۸۳±۳/۸۵ بود. در مطالعه مشابهی که Kaul و همکاران برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز از غلظت‌های ۱۰ درصد DMSO و FBS و ۰/۰۷ مولار ساکاروز استفاده کردند درصد حیات را بلافاصله بعد از جدا سازی و متعاقب اضافه کردن مواد محافظ در برابر انجماد به‌ترتیب ۶۶/۷۵±۳/۵۵۰ و ۵۳/۳۰±۵/۱۵ گزارش کردند [۲۶]. ایزدیار و همکاران نیز درصد حیات را بلافاصله بعد از جداسازی ۸۶±۳/۵ درصد و بعد از اضافه کردن محلول انجماد ۸۴±۳ درصد و سپس بعد از انجماد و متعاقب یخ‌گشایی ۶۶±۳/۵ درصد اعلام کردند [۱۱]. عدم سَمیت شیمیایی مواد محافظ در برابر انجماد و هم‌چنین روند کاهش درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی در فرآیند انجماد در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه فوق هم‌خوانی دارد. در مطالعه حاضر اثرات سمی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

مواد محافظ در برابر انجماد مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعه نشان می‌دهد مواد محافظ در برابر انجماد بلافاصله پس از اضافه کردن به سلول‌های اسپرماتوگونی تازه جداشده هیچ‌گونه اثرات سمی روی سلول‌های اسپرماتوگونی ندارد. در مطالعه حاضر میانگین درصد حیات سلول‌ها در تمامی گروه‌های مورد مطالعه بعد از انجماد-یخ‌گشایی به ۱/۳±۵۹/۵۷ درصد کاهش یافت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انجماد سبب کاهش معنی‌دار درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود. در سایر مطالعات نیز از انجماد به‌عنوان عاملی که اثر کاهشی بر درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف از جمله گاو [۳۱،۳۰،۱۱]، موش [۳۲،۲۲،۱۹] و خوک [۳۳] دارد، یاد می‌شود. Wu و همکاران بلافاصله بعد از جداسازی و متعاقب انجماد و یخ‌گشایی درصد حیات را به‌ترتیب ۱/۲±۸۵/۳ و ۱/۲±۶۱/۱ درصد گزارش کرده‌اند [۳۴]. پیش از این اثبات شده است که در طی فرآیند انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ و آسیب غشاء سلولی مهم‌ترین عامل موثر در کاهش درصد حیات سلول‌ها می‌باشد [۳۳]. هم‌چنین، عدم نفوذ کامل مواد محافظ انجماد به داخل سلول از جمله عوامل کاهش‌دهنده درصد حیات طی فرآیند انجماد می‌باشند [۸]. به‌علاوه، در این مطالعه برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتو-شیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 استفاده شد. تاکنون از نشانگر PGP9.5 برای شناسایی ایمنوسیتوشیمی و ایمنوهیستوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف از جمله بز [۲۱]، موش [۳۵]، گاو [۳۶]، گوسفند [۳۷]، انسان [۳۸] و خوک [۳۹] استفاده شده است.

نتیجه‌گیری

در مجموع به‌نظر می‌رسد استفاده از محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد DMSO توام با ۱۰ درصد FBS و ۰/۰۷ مولار ساکاروز برای انجماد اسپرماتوگونی بره مناسب است. باتوجه به نتایج مطالعه حاضر و در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی و هم‌چنین در راستای به حداقل رساندن کاهش اثرات سوء مواد محافظ در برابر انجماد پیشنهاد می‌شود در محیط انجماد با پایه DMSO و از غلظت‌های ۱۰ درصد FBS و یا غلظت‌های کمتر از ۱۰ درصد این ماده و هم‌چنین از غلظت‌های ۰/۰۷ مولار ساکاروز یا کمتر در محیط‌های حاوی مواد محافظ انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بره استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری حرفه‌ای دامپزشکی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه رازی می‌باشد.

References:

[1] De Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. ***Curr Opin in Cell Biol*** 1998: 10(6): 694-701.

[2] Lok D, Weenk D, De Rooij DG. Morphology, proliferation, and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. ***Anat Rec*** 1982; 203(1): 83-99.

[3] Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DP, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. ***Reproduction*** 2003; 126(6): 765-74.

[4] Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. ***Stem Cells*** 2008: 26(11): 2928-37.

[5] Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. ***Development*** 2009: 136(7): 1191-99.

[6] Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. ***J Biol Chem*** 2007: 282(35): 25842-51.

[7] Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. ***Birth Defects Res C Embryo Today*** 2009: 87(1): 27–34.

[8] Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. ***Mol Reprod Dev*** 2003; 64(4): 422-28.

[9] 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.

[10] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. ***Biol Reprod*** 2003: 69(2): 612-16.

[11] Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. ***Reproduction*** 2002: 124(1): 85-94.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]

[12] Hill JR, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. ***Reprod Fertil Dev*** 2006: 18(1-2) 13-8.

[13] Meachem S, von Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective. ***Reproduction*** 2001; 121(6): 825-34.

[14] Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, Ponsaerts P, Wouters G, Doerr D, et al. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. ***Cell Transplant*** 2011; 20(8):1241-57.

[15] 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.

[16] Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. ***Fertil Steril*** 1988; 49(5): 743- 64.

[17] Yang Y, Steeg J, Honaramooz A. The effects of tissue sample size and media on short-term hypothermic preservation of porcine testis tissue. ***Cell Tissue Res*** 2010: 340(2): 397-406.

[18] 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.

[19] Lee YA, Kim YH, Kim, BJ, Jung MS, Auh JH, Seo JT, et al. Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol. ***Biol Reprod*** 2013; 89(5): 109.

[20] 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.

[21] 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.

[22] Janat-Alipoor F, Sadighi Gilani, Eftekhari-Yazdi, Daneshzadeh MT, Khakzad H. The Effect of FBS Concentration on Cryopreservation of Isolated Spermatogonial Cells from Neonatal Mouse by MACS Method. ***J Iran Anat Sci*** 2010; 7(28-29): 113-20. [in Persian]

[23] Orief Y, Schultze-Mosgau A, Dafopoulos K, Al-Hasani S. Vitrification: will it replace the conventional gametecryopreservation techniques? ***Middle East Fertil Soc J*** 2005: 10(3): 171-84.

[24] Huang J, Li Q, Zhao R, Li W, Han Z, Chen X, et al. Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. ***Anim Reprod Sci*** 2008; 106(1-2): 25-35.

[25] Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. ***Cryobiology*** 1984; 21(4): 407-26.

[26] Kaul G, Kaur J, Rafeeqi TA. Ultrasound Guided Transplantation of Enriched and Cryopreserved Spermatogonial Cell Suspension in Goats. ***Reprod Domest Anim*** 2009; 45(6): 249-54.

[27] Jain J, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. ***Fertil Steril*** 2006; 86(4 Suppl): 1037-46.

[28] Sutton RL. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. ***Cryobiology*** 1992; 29(5): 585-98.

[29] Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. ***Reprod Biomed Online*** 2004: 9(2): 164-7.

[30] Redden E, Davey R, Borjigin U, Hutton K, Hinch G, Hope S, et al. Large quantity cryopreservation of bovine testicular cells and its effect on enrichment of type a spermatogonia. ***Cryobiology*** 2009; 58(2): 190-95.

[31] Rahimi-Feyli P, Tajik P, Shafiei Sh, Dodel M, Arbabi F. The effect of poly L-lactic acid nanofiber on the induction of colony formation of frozen-thawed bovine spermatogonial stem cells in vitro. ***Feyz*** 2015: 19(1): 15-23. [in Persian]

[32] Wang P, Li Y, Hu XC, Cai XL, Hou LP, Wang YF, et al. Cryoprotective effects of low-density lipoproteins, trehalose and soybean lecithin on murine spermatogonial stem cells. ***Zygote*** 2014; 22(2): 158-63.

[33] Abrishami M, Anzar M, Honaramooz A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. ***Theriogenology*** 2010; 73(1): 86–9.

[34] Wu J, Hu T, Guo B, Yue Z, Yang Z, Zhang X. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue for spermatogonia enrichment. ***Cryo Letters*** 2011; 32(5): 402-9.

[35] Yasuhiro K, Daiji E, Toshihiko I. Expression of protein gene product 9.5, a neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase, and its developing change in sertoli cells of mouse testis. ***Mol Reprod Dev*** 1999; 54(4): 333–41.

[36] Zhang Z, Hill J, Holland M, Kurihara Y, Loveland KL. Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures. ***J Androl*** 2008; 29(4): 418–30.

[37] Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. ***Theriogenology*** 2006; 66(9): 2091-103.

[38] Von Kopylow K, Kirchhoff C, Jezek D, Schulze W, Feig C, Primig M. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. ***Hum Reprod*** 2010; 25(5): 1104–12.

[39] Zeng W, Avelar GF, Rathi R, Franca LR, Dobrinski I. The length of the spermatogenic cycleis conserved in porcine and ovine testis xenografts. ***J Androl*** 2006; 27(4): 527-33.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-12]