

## **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*

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

علی اصغر مقدم<sup>۱</sup>، پیمان رحیمی فیلی<sup>۲\*</sup>، زهرا نیکوصفت<sup>۳</sup>، سجاد ضرغامی<sup>۳</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کاربردهای فراوانی در طب تولید مثلی و زیست‌فناوری دارند. جهت نگهداری طولانی-مدت 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 نایالغ 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 به ترتیب 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 به ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۷، ۰/۱۴ و ۰/۲۱ مولار استفاده شد. درصد حیات سلول‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی در سه مرحله مختلف (بالاچاله پس از استخراج، متعاقب افزودن محیط انجماد و پس از یخ‌گشایی) مورد سنجش قرار گرفت. جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه PGP9.5 استفاده شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد مواد محافظ در برای انجماد اثرات سمی روی اسپرماتوگونی بره ندارند. هم‌چنین، درصد زنده‌مانی این سلول‌ها در محیط حاوی ۱۰ درصد FBS به طور 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 بمنظور می‌رسد استفاده از محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد DMSO توان با ۱۰ درصد FBS و ۰/۰۷ مولار ساکاروز برای انجماد اسپرماتوگونی بره مناسب است.

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

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

## مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) که سرآغاز فرآیند اسپرماتوژنر هستند با تزايد 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] به عنوان 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 به دلیل نبود نشانگرهای اختصاصی سطحی سلول و تعداد نسبتاً کم این سلول‌ها در بیضه مشکل می‌باشد [۵].

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

<sup>۲</sup> استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

<sup>۳</sup> دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

\*نشانی نویسنده مسئول،

کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

تلفن: ۰۸۳۳۸۳۲۵۹۹، دکلپیس: ۰۸۳۳۸۳۲۰۰۴۱

پست الکترونیک: peymanrahimi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۳/۲

پیشرفت در علم کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و توانایی ارزیابی پتانسیل بنیادی بودن عملکرد این سلول‌ها به واسطه 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 به کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل دخیل در ناباروری را بهتر بررسی نمود [۷]. علاوه بر این، چنین سلول‌هایی هدف مناسبی برای دست-کاری‌های 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 طولانی مدت این سلول‌ها با استفاده از تکنیک انجماد به تولید حیوانات تراویرخته 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

## 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 بیخ 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 به طور کامل از بیضه جدا شد. سپس، ۱۰ گرم بافت پارانژیم بیضه به کمک قیچی استریل برداشته شده و داخل لوله فالکون استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (GIBCO, UK) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و به مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتی‌فیوژ (Hettich, Germany) شد؛ این عمل ۳ بار تکرار گردید. برای استخراج سلول از بیضه از روش van Pelt و همکاران استفاده شد [۲۰]. به طور خلاصه ابتدا بافت بیضه با استفاده از قیچی استریل به طور کامل تکه تکه شد و سپس وارد مرحله هضم آنزیمی شد. در مرحله اول هضم آنزیمی پتری‌دیش حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه به مدت ۴۵ دقیقه در مجاورت آنزیم‌های کلائزناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم ترپیسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma-Aldrich, Germany) در انکوباتور (Mem- (mert, Germany) قرار داده شد. به منظور افزایش راندمان تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانژیم بیضه هر ۱۰ دقیقه یکبار پی‌پتاز شد. در مرحله دوم هضم آنزیمی، سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در مجاورت آنزیم‌های کلائزناز 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، محتويات پتری‌دیش‌ها داخل لوله‌های فالکون استریل منتقل شده و به منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقیمانده به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتی‌فیوژ شد. به منظور توقف هضم آنزیمی هم حجم آنزیم مورد استفاده، FBS به لوله فالکون اضافه شد. به منظور حذف سلول‌های مایویید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری (Sartorius, Denmark) عبور داده شد و به مدت ۲ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتی‌فیوژ شد. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتی‌فیوژ، رسوب موجود در لوله‌های فالکون با ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM آماده حاوی آنتی‌بیوتیک حل گردید.

تکنیک پیوند سلول‌های اسپرما توگونی در این گونه‌ها می‌باشد. انجاماد سلول‌های بنیادی اسپرما توگونی امکان بقای طولانی مدت این سلول‌ها، بدون ایجاد اثرات مخرب آشکار بر عملکردشان را فراهم می‌سازد. انجاماد بهترین روش برای حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرما توگونی است [۱۱]. مطالعه در زمینه روش‌های مختلف انجاماد و تاثیر آن بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی به شناخت هرچه بیشتر این سلول‌ها کمک می‌کنند. با توجه به کاربرد این جمعیت سلولی پراهمیت در تولید حیوانات تراریخته [۱۲]، درمان سرطان (حفظ سلول‌های بنیادی در بیماران انکولوژیک)، درمان نایاروری و کنترل باروری در انسان [۱۳]، حفظ گونه‌ها و نژادهای حیوانی کمیاب، نادر و در حال انقراض [۱۲]، دست-کاری‌های ژنتیکی و ایجاد حیوانات دورگه به منظور ایجاد قابلیت سازگاری زیاد با شرایط اقلیمی متفاوت [۱۲]، آشنایی هرچه بیشتر با این سلول‌ها جهت تولید آزمایشگاهی و نگهداری طولانی مدت این سلول‌ها ضروری می‌باشد. سرم گوساله جنینی (FBS) یکی از معمول‌ترین مواد محافظه سلول در برابر آسیب‌های ناشی از انجاماد می‌باشد. FBS سرشار از فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، پروتئین‌ها (از جمله آلبومین، گاما‌گلوبولین و آلفا‌گلوبولین)، ویتامین‌ها (E,A)، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها (از جمله لیپوپروتئین)، مواد معدنی و عناصر کمیاب و مواد ناشناخته دیگری است [۱۴]. دیده شده است FBS روی بقای سلول‌ها در زمان انجاماد تاثیر مثبتی دارد. محققین بر این باورند که غشای پلاسمای در طول فرآیند انجاماد در حضور FBS بهتر حفظ می‌شود. در واقع FBS نقش خود را در فرآیند انجاماد با خروج آب از سلول و جلوگیری از تشکیل کریستال‌های بیخ ایفا می‌کند [۱۵]. هم‌چنین وجود ساکاروز در محیط انجاماد برای بهبود زنده‌مانی سلول‌ها ضروری است [۱۶]. تاکنون ساکاروز در انجاماد سلول‌های اسپرما توگونی خوب، گاو و موش با موفقیت استفاده شده است [۱۷-۱۹، ۱۱]. با توجه 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 انجاماد و نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی با استفاده از FBS و ساکاروز در این گونه دامی در محیط آزمایشگاه بسیار مهم به نظر می‌رسد. هدف از انجام این طرح، بررسی و مطالعه تعیین بهترین غلظت FBS و ساکاروز و در نهایت پیشنهاد یک پروتکل برای انجاماد سلول‌های بنیادی اسپرما توگونی گوسفند به منظور نگهداری طولانی مدت آن‌ها در محیط آزمایشگاه است.

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 ایمنوستیوشیمی علیه آنتی زن PGP9.5 با استفاده از روش حیدری و همکاران [۲۱] به شرح 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 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس، اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش Dako، (PGP9.5) با رقت ۱:۱۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. مقطع پس از سه مرتبه شستشو با TBS/BSA (هربار ۵ دقیقه) در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه تماس با آنتی‌بادی ثانویه biotinylated sheep anti-rabbit IgG، Avicenna (Research Institute, Iran) قرار گرفت و مجدداً با TBS/BSA شستشو داده شد. مقطع به مدت ۳۰ دقیقه در تماس (Biosource, USA) HRP-conjugated streptavidin با رقت ۱:۵۰۰ قرار داده شد و سپس با TBS/BSA شستشو داده شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی‌آمینوبنیزیدین (Roche, Germany) به مقطع، به مدت ۸-۱۰ دقیقه رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید با آب مقطر کاملاً تمیز شد و مجدداً با هریس هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شد. دوباره با آب مقطر شستشو داده شد. سپس، اسلاید با الکل آب‌گیری شد و با گزیلول شفاف شد و با انتال (Merck, Germany) پوشانده شد. در نهایت سطح اسلاید به وسیله گلیسروول و PBS (نسبت ۱:۱) پوشانده شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری Olympus، Japan (Olympus, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

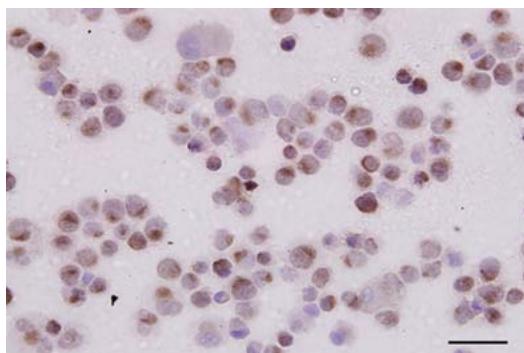
#### آنالیز آماری

برای نرمال کردن داده‌ها از نرم‌افزار آماری R 3.1.2R تست کاکس باکس استفاده شد. سپس، با استفاده از آنالیز واریانس اثرات انجاماد، غلطت‌های مختلف FBS و غلظت‌های مختلف ساکاروز مورد بررسی قرار گرفت و آزمون میانگین بین گروه با استفاده از تست دانکن صورت پذیرفت. مقادیر  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

اضافه کردن محلول انجاماد به تعلیق سلولی

وضعیت حیات سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ترپیان بلو ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK)، لام هموسیتومتر و میکرو- سکوپ نوری (Olympus, Japan) به شرح ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت: ۱۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۱۰ میکرولیتر رنگ ترپیان بلو ۰/۴ درصد مخلوط شدند و به مدت چند دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول مذکور به لام هموسایتومتر منتقل شد. به علت نفوذ رنگ ترپیان بلو به درون سلول‌های مرده این سلول‌ها رنگ پذیرفته و به رنگ آبی دیده می‌شوند، ولی سلول‌های زنده این رنگ را به بیرون پمپ می‌کنند و به صورت سفید و بدون رنگ دیده می‌شوند. با شمارش یک صد سلول به طور تصادفی تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین شده و بر این اساس درصد حیات نمونه محاسبه گردید. سپس، به هریک از شش عدد لوله انجاماد، نیم میلی‌لیتر از تعلیق سلولی (حاوی ۱۰۰۰۰ سلول) منتقل شد و متعاقباً ۶ محلول مختلف انجاماد با غلظت X ۲ که بر پایه ۱۰ درصد (Sigma, USA) DMSO (تهیه شده بود به صورت تدریجی و آرام‌آرام در عرض ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به شکل قطره‌قطره و به نسبت هم حجم با تعلیق سلولی به هریک از ویال‌ها اضافه گردید و سپس به آرامی ویال‌ها را تکان داده تا محیط انجاماد و تعلیق سلولی کاملاً مخلوط شود. محلول‌های مختلف انجاماد به شرح ذیل بودند: تیمار ۱: ۰/۰۷ مولار ساکاروز و ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار ۲: ۰/۱۴ مولار ساکاروز و ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار ۳: ۰/۲۱ مولار ساکاروز و ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار ۴: ۰/۰۷ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار ۵: ۰/۱۴ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی؛ تیمار ۶: ۰/۲۱ مولار ساکاروز و ۲۰ درصد سرم گوساله جنینی. مجدداً درصد حیات سلول‌های موجود در هر ۶ ویال محاسبه گردید (تست سمتی شیمیابی محلول انجاماد) و بدنبال آن هر کدام از ویال‌های مذکور به مدت ۲ ساعت در یخچال با دمای ۴۰ سانتی‌گراد منتقل شد. بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه جهت انجاماد بر روی بخار ازت نگهداری شده و پس از آن به تانک نیتروژن مایع (Spectrum-35 series, USA) با دمای  $-196^{\circ}$  درجه منتقل شدند. ویال‌ها پس از ۵ دقیقه از تانک نیتروژن خارج شده و پس از بین گشایی، محتویات هریک از ویال‌ها به داخل لوله‌های فالکون انتقال داده شد و به هریک از لوله‌های فالکون ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM به صورت تدریجی و به آهستگی اضافه شد و لوله‌های فالکون در دور ۳۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، تعلیق محلول بالای هریک از لوله‌های فالکون دور ریخته شد. در نهایت،

در مطالعه‌ای که روی سلول‌های اسپرماتوگونی گاو صورت گرفت، نشان دادند افزایش غلظت‌های FBS از ۱۰ به ۲۰ درصد در محیط محافظت در برابر انجاماد حاوی DMSO اثری مشبّتی بر روی بقاء سلول‌ها پس از بخ گشایی ندارد [۱۱].



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

جدول شماره ۱- درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بلا فاصله پس از جداسازی و متعاقب اضافه کردن مواد مختلف محافظت در برابر انجاماد (تست سمیت شیمیابی)

گروه‌ها	از جداسازی بلافاصله بعد	متعاقب اضافه کردن مواد مختلف محافظت در برابر انجاماد
گروه ۱	۸۴/۳۴±۳/۷۲	۸۱/۷±۴/۴۳۸
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 انجاماد

مرحله	۱۰ درصد	۲۰ درصد	اثرات غلظت
قبل از انجاماد	۸۰/۶۷±۲/۱۹ <sup>a</sup>	۸۰/۹۴±۲/۰۳ <sup>a</sup>	
انجاماد- بخ گشایی	۶۱/۹۳±۱/۱۰ <sup>b</sup>	۵۷/۲۲±۰/۸۵ <sup>c</sup>	

مقادیر با حروف متفاوت در هر ستون (انجاماد) و در هر ردیف (FBS) اختلاف معنی‌دار باهم دارند ( $P<0.05$ ).

## 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 محافظت انجاماد مشابه درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بالافاصله پس از جداسازی بود و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول شماره ۱). لذا، بهنظر می‌رسد مواد محافظت انجاماد تاثیر سمعی روی سلول‌های اسپرماتوگونی نداشته و منجر به کاهش معنی‌دار درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی در مرحله قبل از انجاماد نشدند ( $P>0.05$ ). اثرات غلظت‌های مختلف FBS (۱۰ و ۲۰ درصد) و غلظت‌های مختلف ساکاروز (۰/۱۴ و ۰/۲۱ مولار) در مراحل قبل از انجاماد و پس از انجاماد- بخ گشایی به ترتیب در جداول شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است. غلظت‌های مختلف FBS (۱۰ و ۲۰ درصد) در مرحله قبل انجاماد اثرات معنی‌داری روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی نداشتند ( $P>0.05$ )، ولی متعاقب انجاماد و پس از بخ گشایی 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 (۰/۱۴ و ۰/۲۱ مولار) در مراحل قبل از انجاماد و هم‌چنین متعاقب انجاماد و پس از بخ گشایی اثرات معنی‌داری روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی ندارد. انجاماد به تنهایی اثرات معنی‌داری روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی داشته است؛ به طوری که انجاماد 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 انجاماد شده است. بهنظر می‌رسد افزایش غلظت در مرحله انجاماد و متعاقب بخ گشایی اثرات منفی روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی دارد، ولی افزایش غلظت ساکاروز در مرحله انجاماد و متعاقب بخ گشایی اثرات منفی روی درصد حیات و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی ندارد ( $P<0.05$ ).

## بحث

در این مطالعه برای افزایش درصد حیات بعد از بخ گشایی از غلظت‌های مختلف FBS استفاده شد و با افزایش غلظت FBS از ۱۰ به ۲۰ درصد، نرخ حیات سلول‌های اسپرماتوگونی متعاقب بخ گشایی کاهش یافت. ایزدیار و همکاران

نشان دادند که اضافه کردن غلظت‌های مختلف  $0/07$ ،  $0/14$  یا  $0/21$  مولار ساکاروز به محیط محافظت در برابر انجامد با پایه DMSO سبب افزایش محسوس میزان زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های مذکور می‌شد [۱۱]. مولکول‌های قندی مواد محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر سبب ثبیت ماکرومولکول‌های غشای سلول شده و از این طریق به بقاء بیشتر سلول در خلال انجامد کمک می‌کند [۱۷]. استفاده از مواد محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر توان با مواد محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر و انکوبه کردن سلول‌ها در این تعليق در مرحله قبل از انجامد، منجر به خروج هرچه بیشتر آب از داخل سلول و کاهش مدت زمان تماس سلول با اثرات سمی مواد محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر می‌شد [۱۶]. در صورت استفاده از مواد محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر به تهابی در مرحله پیش‌گشایی غلظت این مواد پس از پیش‌گشایی کاهش یافته و اصطلاحاً رقیق می‌شوند و در نتیجه به علت کاهش فشار اسمزی داخل سلول، آب به سرعت وارد سلول شده و سلول به علت شوک اسمزی دچار تورژسانس می‌شد [۲۷]. لذا، استفاده از ساکاروز به عنوان ماده محافظت در برابر انجامد 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 محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر می‌شد [۱۶]. FBS با کمک فشار آنکوتیک حاصل از پروتئین‌ها [۲۵] و ساکاروز با کمک فشار اسمزی سبب خروج آب از از سلول می‌شوند [۲۴، ۲۳]. بنابراین، محیط مناسب جهت انجامد بهینه و کارا بایستی شامل دی‌ساکاریدها مثل ساکاروز یا تری‌الالوز و پروتئین‌ها و پلیمرها باشد [۲۹، ۲۸]. در مطالعه حاضر درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از جداسازی و متعاقب اضافه کردن مواد محافظت در برابر انجامد به ترتیب  $84/34 \pm 3/72$  و  $53/30 \pm 5/15$  در  $0/07$  و FBS و DMSO مولار ساکاروز استفاده کردند درصد حیات را بلا فاصله بعد از جدا سازی و متعاقب اضافه کردن مواد محافظت در برابر انجامد به ترتیب  $80/83 \pm 3/85$  بود. در مطالعه مشابهی که Kaul و همکاران برای انجامد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز از غلظت‌های  $10$  درصد DMSO و FBS و  $0/07$  مولار ساکاروز استفاده کردند درصد حیات را بلا فاصله بعد از جدا سازی و متعاقب اضافه کردن مواد محافظت در برابر انجامد به ترتیب  $86 \pm 3/5$  درصد و بعد از اضافه کردن محلول انجامد  $84 \pm 3$  درصد و سپس بعد از انجامد و متعاقب پیش‌گشایی  $66 \pm 3/5$  درصد اعلام کردند [۱۱]. عدم سمتی شیمیایی مواد محافظت در برابر انجامد و هم‌چنین روند کاهش درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی در فرآیند انجامد در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه فوق هم‌خوانی دارد. در مطالعه حاضر اثرات سمی

جدول شماره ۳- اثرات غلظت‌های مختلف ساکاروز ( $0/07$ ،  $0/14$  و  $0/21$  مول) روی درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط انجامد

اثرات غلظت ساکاروز			
مرحله	۰/۲۱	۰/۱۴	۰/۰۷
قبل از انجامد	$80/85 \pm 2/62^a$	$79/87 \pm 2/45^a$	$81/77 \pm 2/78^a$
انجامد-پیش‌گشایی	$58/26 \pm 1/24^b$	$61 \pm 1/48^b$	$59/48 \pm 1/57^b$
مقادیر با حروف متفاوت در هر ستون (اثرات انجامد) و در هر ردیف (اثرات ساکاروز) اختلاف معنی‌دار باهم دارند ( $P < 0.05$ ).			

mekanisim دقیقی که FBS از طریق آن از سلول در برابر انجامد محافظت می‌کند هنوز ناشناخته است [۱۵]. در مطالعه جنت علیپور و همکاران افزایش غلظت FBS سبب افزایش زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی شده است [۲۲]. در حالی‌که 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 به عنوان ماده محافظت در برابر انجامد استفاده شده است، در حالی‌که در مطالعه حاضر علاوه بر FBS از ماده محافظت در برابر انجامد ساکاروز به عنوان 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 انجامد می‌شوند [۲۵] و در زمان پیش‌گشایی 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 به عنوان ماده محافظت در برابر انجامد نفوذناپذیر ( $0/07$ ،  $0/14$  و  $0/21$  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 انجامد نیست؛ چراکه وجود ساکاروز در محیط انجامد 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 ( $0/07$ ) هم ایجاد می‌کند. Kaul و همکاران برای انجامد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز از غلظت‌های  $10$  درصد FBS و DMSO و  $0/07$  مول ساکاروز استفاده کردند و سلول‌ها را ابتدا در  $-80^\circ$ - سانتی‌گراد و سپس در  $-196^\circ$ - سانتی‌گراد منجمد کرده و به مدت  $2$  و  $4$  ماه نگهداری کردند [۲۶]. ایزدیار و همکاران اثرات مواد محافظت در برابر انجامد مختلف و پروتکل‌های انجامدی مختلف را روی زنده‌مانی سلول‌های تیپ A گاوی بررسی کرده و

PGP9.5 برای شناسایی ایمنوستیوشیمی و ایمنوهیستوشنی 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 به نظر می‌رسد استفاده از محیط انجماد حاوی ۱۰ درصد DMSO توان با ۱۰ درصد FBS و ۰/۰۷ مولار ساکاروز برای انجماد اسپرماتوگونی بره مناسب است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی و هم‌چنین در راستای به حداقل رساندن کاهش اثرات سوء مواد محافظ در برای 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.

مواد محافظ در برابر انجماد مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و نتایج این مطالعه نشان می‌دهد مواد محافظ در برابر انجماد بلاfaciale پس از اضافه کردن به سلول‌های اسپرماتوگونی تازه چداشده هیچ‌گونه اثرات سمعی روی سلول‌های اسپرماتوگونی ندارد. در مطالعه حاضر میانگین درصد حیات سلول‌ها در تمامی گروه‌های مورد مطالعه بعد از انجماد-بیخ‌گشایی به  $59/57 \pm 1/3$  درصد کاهش یافت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انجماد سبب کاهش معنی‌دار درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود. در سایر مطالعات نیز از انجماد به عنوان 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 بلاfaciale بعد از جداسازی و متعاقب انجماد و بیخ‌گشایی درصد حیات را به ترتیب  $85/33 \pm 1/2$  و  $61/11 \pm 1/2$  درصد گزارش کردند [۳۴]. پیش از این اثبات شده است که در طی فرآیند انجماد، تشکیل کریستال‌های بیخ 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]. به علاوه، در این مطالعه برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوستیو-شیمیی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 استفاده شد. تاکنون از نشانگر

#### 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.

- [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-Ahmabadi 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 gamete cryopreservation 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, Rafiq 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 cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *J Androl* 2006; 27(4): 527-33.