نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۶، پاییز ۱۴۰۱
ص‌ص: ۸۵~۹۶

آماده‌سازی گیرنده‌های پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از تیمارهای گرما یا سرما

- **محمد هادی رسولی**
دانش آموخته دکتری گروه علوم دامی، پژوهشکده کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
- **محمد زندی** (نویسنده مسئول)
دانشیار، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش های علمی وصنعتی ایران.
- **علی اصغر صادقی**
دانشیار، پژوهشکده کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
- **ناصر امام‌جمعه کاشان**
استاد، پژوهشکده کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

تاریخ دریافت : آبان ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش : فروردین ۱۴۰۱
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۱۱۵۲۹۴
Email: mz1075@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ ASJ.2022.353042.2120

چکیده

اگر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، به بیضه بره‌هایی که فاقد این نوع از سلول‌ها می‌باشند پیوند شوند در بیضه آنها شروع به تولید اسپرم می‌نمایند. هدف از انجام این تحقیق آماده‌سازی بیضه بره‌های گیرنده پیوند بود. برای این منظور از تیمارهای دمایی ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد و یا از تیمار یخ آب به مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه در سه نوبت به فاصله دو روز استفاده شد.نتایج نشان داد در تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد وضعیت بیضه‌ها طبیعی بود اما تیمار ۵۵ درجه سانتی‌گراد باعث ایجاد عفونت در لوله‌های اسپرم‌ساز شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تخریب کامل بیضه‌هاصورت گرفت. استفاده از تیمارهای یخ آب تغییری در وضعیت ظاهری بیضه‌ها ایجاد نکرد. تشکیل کلونی پس از استخراج و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد و تیمارهای یخ آب بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت($P<0/05$). بیان ژن‌های *Plzf*، *cmyc* و*gfrl*به عنوان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد و تیمارهای یخ آب بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت($P<0/05$). بر این اساس برای کاهش تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه بره می‌توان از تیمار یخ آب و یا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در سه نوبت به فاصله دو روز استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، گیرنده پیوند، تیمار گرما، تیمار سرما.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 136 pp: 85-96

Preparation of spermatogonial stem cell transplant receptors using heat or cold treatments

By: Mohammad Hadi Rasouli[1], Mohammad Zandi[2*], Ali Asghar Sadeghi[1], Naser Emamjomeh-Kashan[1]

[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

*Corresponding author. Email: mz1075@yahoo.com, mz1075@irost.ir

Received: November 2021 **Accepted: April 2022**

If spermatogonial stem cells are transplanted into the testicles of lambs that do not have this type of cells, they begin to produce sperm in their testicles of the recipient rams. The aim of this research was to prepare the testicles of transplant recipient's lambs.. For this purpose, temperature treatments of 35, 45, 55 and 65 °C or water-ice treatment for 20, 40 and 60 minutes were used for three times with two days interval. The results showed that the condition of the testicles was normal at 45 °C, but the treatment at 55 °C caused infection in the seminiferous tubules and at 65 °C, the testicles were completely destroyed. The use of water-ice treatments did not change the appearance of the testicles. Colony formation after extraction and culture of spermatogonial stem cells at 45 °C treatment and water-ice treatments were significantly reduced compared to the control ($P < 0.05$). The expression of *c-myc*, *plzf*and *gfrl* genes as specific markers of spermatogonial stem cells was significantly reduced in 45 °C and cold treatments compared to the control ($P < 0.05$). Accordingly, to reduce the number of spermatogonial stem cells in lambs' testicles, water ice or 45 °C treatments for 20 minutes can be used three times at intervals of two days.

Key words: Spermatogonial Stem Cells, Transplant receptors, Heat Treatment, Cold Treatment.

مقدمه

کشت و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از موضوعات مهم در زمینه استفاده کاربری از این سلول‌ها می‌باشد (Oatley و همکاران، ۲۰۰۵).پیوند سلول‌های زایا به منظور بارورسازی موش-های نابارورربرای اولین بار در سال ۱۹۹۴ انجام شد. پس از آن ازاین فناوری به منظور بارورسازی کودکانی که به دلیل شیمی درمانی سلول‌های بنیادی بیضه آنها تخریب شده بود، مورد استفاده قرار گرفت (Mulder و همکاران، ۲۰۱۸).پیوند سلول‌های زایای حیوانات اهلی نر اهمیت زیادی دارد چون از آنها برای تولید حیوانات تراژن، تکثیر نرهای مولد و حفظ ذخایر ژنتیکی می‌توان استفاده نمود (Herrid و همکاران، ۲۰۰۹).اهمیت استفاده از این فناوری در صنعت پرورش گوسفند به دلیل مشکلات مربوط به انجماد اسپرم، انجام تقلیح مصنوعی و انتقال رویان می‌باشد، به-طوری که از این روش به عنوان ابزاری برای جابجایی و انتقال مواد ژنتیکی می‌توان بهره برد (Rodriguez-Sosa وهمکاران، ۲۰۰۶).

انتقال موفق سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تا حد زیادی به آماده کردن گیرنده‌های پیوند بستگی دارد. برای این منظور از رشد سلول‌های زایای داخلی و اسپرماتوژنز ممانعت می‌شود که در نتیجه آن جایگزین کردن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیوند شده ممکن شده و اسپرماتوژنزمجددا انجام می‌شود (Ganguli و همکاران، ۲۰۱۶). تیمارهای شیمی درمانی، پرتودهی، گرما و سرما به منظور آماده‌سازی گیرنده‌های پیوند در موش و موش صحرایی

با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما اطلاعات کمی در خصوص موفقیت این روش‌ها در حیوانات اهلی گزارش شده است (Olejnik و همکاران، ۲۰۱۸).

ازبوسولفان به عنوان داروی شیمی درمانی برای آماده کردن گیرنده‌های پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف نظیر موش، موش صحرایی، میمون و خوک استفاده شده است (Mohamed و همکاران، ۲۰۱۵). ولی تزریق داخل صفاق بوسولفان در جوندگان سبب مهار هماتوپویسیس و اثرات جانبی شدید و بعضی اوقات باعث مرگ شده است (Qin و همکاران، ۲۰۱۵). در حیوانات بزرگتر نظیر خوک نیز مشابه حیوانات کوچکتردرمان با بوسولفان باعث مسومیت سیستماتیک و حتی مرگ شد که در نتیجه تخریب شدید مغز استخوان می‌باشد. همچنین اثرات جانبی درمان با بوسولفان کارایی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را کاهش می‌دهد و بر رفاه حیوانات گیرنده تاثیر منفی دارد (Mohamed و همکاران، ۲۰۱۵). برای بر طرف کردن این مشکل از روش پرتودرمانی به عنوان جایگزین شیمی درمانی استفاده شد و نتایج امیدوارکننده‌ای در موش صحرایی، موش، میمون و بز داشت، اما این روش نیاز به تجهیزات تخصصی و گران قیمت دارد و همچنین باعث آهکی شدن لوله‌های اسپرم ساز نیز می‌شود (Qin و همکاران، ۲۰۱۶) که در نتیجه آن حرکت سلول‌های بنیادی در لوله‌های اسپرم ساز را با مشکل مواجه می‌کند (Ma و همکاران، ۲۰۱۱).پس از آن نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نقش تخریبی گرما روی بیضه حیوانات مختلف مانند موش، موش صحرایی، گاو، خوک، گوسفند و انسان را نشان داد. اثرات گزارش شده شامل کاهش موقت وزن بیضه‌ها به همراه ناباوری موقت یا دایم سلول‌های بنیادی بود (Rockett و همکاران، ۲۰۱۱).

مطالعه Ma و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای گرد بیشترین حساسیت را با افزایش دما داشتند، اما اسپرماتوگونی‌ها نیز به افزایش دما حساس بودند.در نتیجه تیمار شوک گرمایی می‌تواند فضای خالی را در گیرنده‌های پیوند ایجاد کند (Ma و همکاران، ۲۰۱۱). اطلاعات کمی در خصوص اثر شوک‌های گرما و سرما بصورت موضعی روی عملکرد بیضه برهای نر وجود دارد و در این مطالعه اثرات این تیمارها روی گیرنده‌های پیوند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش‌ها

به منظور بررسی اثر گرما روی بیضه بره، تعداد ۱۲ راس بره نر نژاد شال با سن حدود ۴ ماه در چهار گروه سه راسی تحت تیمارهای دمایی ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بطوری که دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای این منظور بیضه‌های بره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف آب گرم قرار گرفتند و این تیمارها برای ۳ نوبت و با فاصله زمانی ۲ روز انجام شد.

برای بررسی اثر سرما از تعداد ۹ راس بره نر نژاد شال با سن حدود ۴ ماه در سه گروه آزمایشی سه راسی استفاده شد. برای این منظور بیضه بره‌ها در ظرف‌های یخ آب به مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه قرار گرفت.این تیمارها برای ۳ نوبت و با فاصله زمانی ۲ روز بر روی هر یک از دام‌ها انجام شد.

شش هفته پس از اعمال تیمارهای گرما و سرما، بیضه های بره‌ها به روش جراحی از بدن آن‌ها خارج شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از استحصال سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه-ها، تشکیل کلونی و میزان بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند (*plzf*، *c-myc* و*gfrl*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و محیط‌های کشت

در این مطالعه پرایمرها و مواد مورد نیاز برای انجام پی سی آر از شرکت سینا کلون و ظروف کشت از شرکت سورفا خریداری شدند.

جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از روش van pelt و همکاران(۱۹۹۶)با اندکی تغییرات و بهینه سازی استفاده شد. برای این منظور بیضه‌های مورد مطالعه در فاصله زمانی دو

ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا بیضه‌ها سه بار با آب مقطر و سپس ۱۰ بار با سرم فیزیولوژی حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین (۱ درصد)، (شرکت Inoclone) شستشو شدند. برای از بین بردن آلودگی‌ها الکل ۷۰ درصد روی بیضه‌ها اسپری شده و با سرم فیزیولوژی آبکشی شدند. پس از جدا کردن بافت‌های اطراف بیضه دو میلی متر از بافت بیضه پس از انجام برش‌های متعدد و کاهش اندازه بافت به فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل شد.پنج میلی‌لیتر از محیط کشت DPBS (شرکت Gibco) + آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین (۱ درصد) با استفاده از فیلتر ۲۲/۵ میکرومتری به درون فالکون حاوی بافت بیضه فیلتر شد و پس ازشستشو به مدت دو دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پلیت ته نشین شده جمع آوری شده و سوپرناتانت دور ریخته شد. این مراحل شستشو برای چهار بار تکرار شد. سپس شستشو با ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM + پنی سیلین و استرپتومایسین (۱ درصد) انجام گرفت. پس از آن پلیت حاصله به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و آنزیم‌های مرحله اول شامل تریپسین ۰/۲۵ درصد (۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، (شرکت Sigma)، هیالورونیداز (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، (شرکت Sigma)، کلاژناز (۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، (شرکت Sigma) و DNase (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، (شرکت Sigma) به سلول‌ها اضافه شدند.

پس از اضافه کردن آنزیم‌ها نمونه‌های حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰در دقیقه قرار گرفتند. پس از انجام مرحله اول هضم آنزیمی با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سوپرناتانت جدا شده و پلیت به منظور انجام مرحله دوم هضم آنزیمی با آنزیم‌های هیالورونیداز(۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کلاژناز(۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و DNase (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه گردید. برای غیر فعال کردن آنزیم‌ها، ۵ میلی لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS(شرکت Gibco) استفاده شد.

خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

برای خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از روش هایفیلتراسیون و حذف تمایزی استفاده شد. در روش فیلتراسیون، سوسپانسیون سلولی به ترتیب از فیلترهای ۸۰ و ۶۰ نانومتر عبور داده شدند. در روش حذف تمایزی سلول‌ها به فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM (شرکت Inoclone) تکمیل شده باFBS (۱۵ درصد) و پنی سیلین و استرپتومایسین (۱ درصد) اضافه شدند و به مدت ۱۲ الی ۱۸ ساعت به سلول‌های سرتولی اجازه داده شد به سطح فلاسک‌ها متصل شوند در حالیکه سلول-های اسپرماتوگونی در محیط کشت بصورت معلق باقی ماندند.

تهیهٔ بستر

برای تهیه بستر کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از سلول‌های سرتولی استفاده شد. سلول‌های سرتولی در مرحله حذف تمایزی مطابق قسمت قبل تولید شدند، سپس برای توقف تقسیمات میتوزی آنها را با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مایتومایسین-C (شرکت Sigma) به مدت ۳ ساعت تیمار نموده و از آنها برای تهیه بستر در کف پتری دیش‌های مورد استفاده برای کشت سلول-های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه

استخراج mRNA

برای استخراج mRNA ابتدا سلول‌ها به تیوپ‌های شستشو شده با DEPC (شرکت Thermo Fisher) منتقل شدند و برای تشکیل پلیت با۱۵۰۰دور در دقیقه به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شدند. بر اساس پروتکل شرکت سیناکلون به هر تیوپ یک میلی لیتر RNA-PLUS (شرکت سینا کلون) اضافه شد و پس از انجام ورتکس به مدت یک دقیقه، در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (شرکت Sigma) به آنها اضافه شد و پس از تکان دادن شدید به مدت ۱۵ دقیقه درون یخ قرار گرفتند. تیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله محتویات تیوپ‌ها بصورت سه لایه مشخص تشکیل شد. لایه رویی حاوی mRNA بود که پس از

جدا کردن به تیوپ جدید منتقل شد و هم اندازه آن از ایزوپروپانول (شرکت Sigma) به تیوپ اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد. پس از این مرحله با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پلیت تشکیل شده دو نوبت با استفاده از ۲۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۵ درصد شستشو شد و پس از خشک کردن پلیت در ۵۰ میکرولیتر آب حاوی DEPC بصورت محلول درآمد.

سنتز cDNA و انجام RT-PCR

mRNA استخراج شده با استفاده از DNase (شرکت Ambion) تیمار شد تا آلودگی احتمالی با دنا از بین برود. غلظت mRNA با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. نیم میلی‌گرم از mRNA برای ساخت cDNA استفاده شد. نسخه برداری معکوس با استفاده از آنزیم MMLV و آغازگر oligo-DT بر اساس پروتکل شرکت تاکارا ژاپن انجام گرفت. واکنش RT-PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام پذیرفت و شامل ۵ میلی‌لیتر سایبرگرین (شرکت سینا کلون)، ۱/۴ میکرولیتر آب، ۰/۸ از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پسرو و ۲ میکرولیتر از رشته الگو بود. شرایط واکنش شامل واسرشتی در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بود. پس از آن برنامه چرخشی(۴۰ چرخه) شامل۹۴درجه سانتی-گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای ویژه اتصال آغازگر (۶۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ ثانیه و در پایان۷۲ درجه سانتی‌گرادبه مدت ۲۰ ثانیه بود. واکنش در مرحله‌ی توسعه در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به پایان رسید. داده‌ها با استفاده از روش دلتا دلتا ct تجزیه و تحلیل شد وژن β actin به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

مشخصات آغازگرها

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق (جدول ۱) با استفاده از نرم افزار پرایمر۳ طراحی و توسط شرکت سینا کلون سنتز گردید.

جدول ۱ مشخصات آغازگرها

نام ژن	توالی	دمای اتصال	اندازه (bp)	شماره دسترسی
plzf	F- CCTCAGATGACAATGACACG' R- CGCCTTGGTGGGACTCA'	۶۰	۲۲۴	JN165090.1
c-myc	F- AGAATGACAAGAGGCGGACA R- CAACTGTTCTCGCCTCTTC	۶۰	۲۲۷	NM_001009426.1
gfrl	F:CCACCAGCATGTCCAATGAC R:GAGCATCCCATAGCTGTGCTT	۶۰	۱۰۱	NM_001105411.1 XM_004020339.3
β actin	F- ACCCAGCACGATGAAGATCA R- GTAACGCAGCTAACAGTCCG	۶۰	۱۸۷	U39357.1

آنالیز آماری

برای هر تیمارحداقل سه تکرار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت Means ± SEM نمایش داده شدند. آنالیزهای آماری توسط رویه ANOVA از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ انجام شد. تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ مقایسه شد.

مدل آماری

$$Yij=\mu+Ti+\varepsilon ij$$

در این مطالعه، Yij: صفت مورد مطالعه، μ: میانگین مشاهدات، Ti: اثر تیمار، εij: اثر خطای آزمایش می‌باشد.

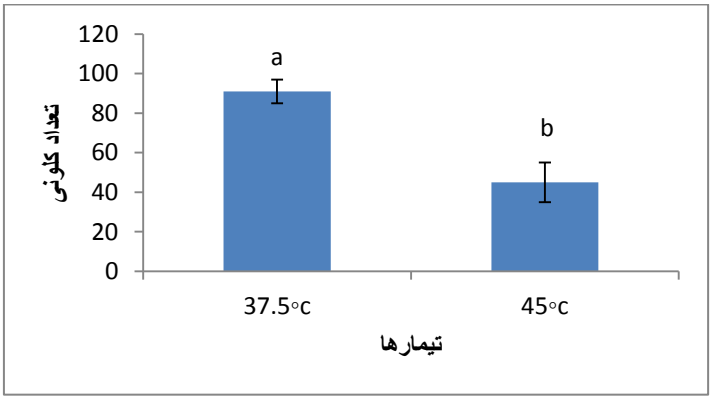
نتایج

مطالعه اثر تیمار گرمایی روی بیضه بره‌ها

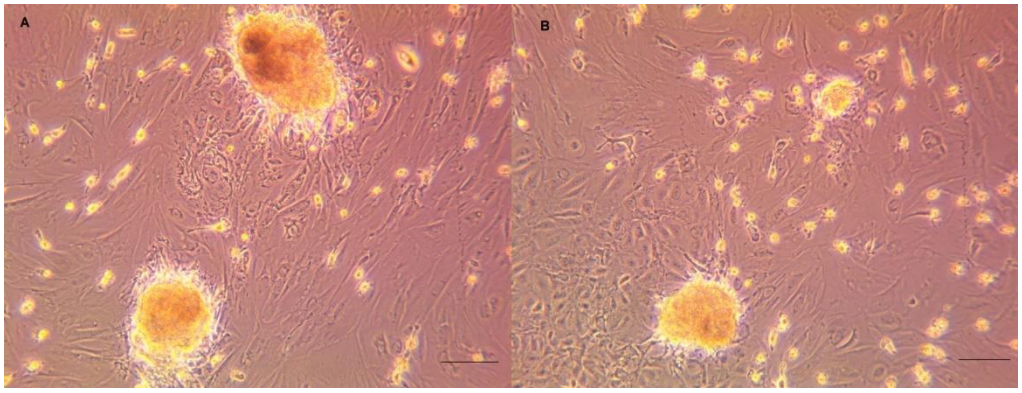
به منظور بررسی اثر شوک گرمایی، بیضه بره‌ها برای ۲۰ دقیقه داخل آب گرم با دماهای ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تیمارها

بصورت یک روز درمیان و برای شش روز ادامه یافت. نتایج نشان داد در تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد وضعیت بیضه طبیعی بود، اما تیمار ۵۵ درجه سانتی‌گراد باعث ایجاد عفونت در لوله‌های اسپرم ساز شد و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد باعث تخریب کامل بیضه بره‌ها شد (شکل ۱). نتایج حاصل از تشکیل کلونی در شرایط کشت آزمایشگاهی پس از استخراج و کشت سلول‌های بنیادی از بیضه‌هایی که تحت تیمارهای گرمایی قرار گرفتند نشان داد میانگین تشکیل کلونی در تیمارهای یخ آب به مدت ۲۰ الی ۶۰ دقیقه به طور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت (به ترتیب ۱۰±۴۵ در مقایسه با ۶±۹۱) ($P<۰/۰۵$) (شکل ۲). تصویر کلونی‌های تشکیل شده در گروه شاهد و تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد در شکل ۳ نشان داده شده است. استخراج و کشت سلول‌های بنیادی در تیمارهای ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به دلیل عفونت و تحلیل بیضه‌ها میسر نبود. بیان ژن‌های اختصاصی *Plzf*، *cmyc* و*gfrl* به عنوان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بطور معنی داری در تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۵$)، (شکل ۴).

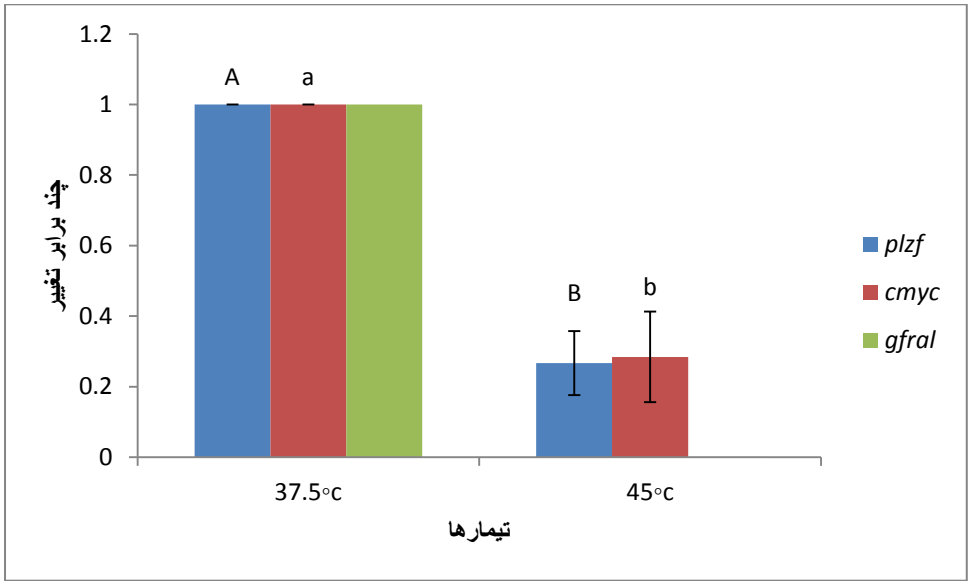
شکل ۱ تصویر بیضه‌ها دو ساعت پس از کشتار (A) تیمار ۵۵ درجه سانتی‌گراد(B) تصویر لوله‌های اسپرم ساز در تیمار ۵۵ درجه سانتی‌گراد،(C) تیمار ۴۵ درجه سانتی‌گراد(D) تیمار ۶۵ درجه سانتی‌گراد



شکل ۲ اثر تیمار گرمایی در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در مقایسه با شاهد (دمای ۳۵ درجه سانتی گراد) روی تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (تیمارهای ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی گراد باعث تشکیل کلونی نشدند.)



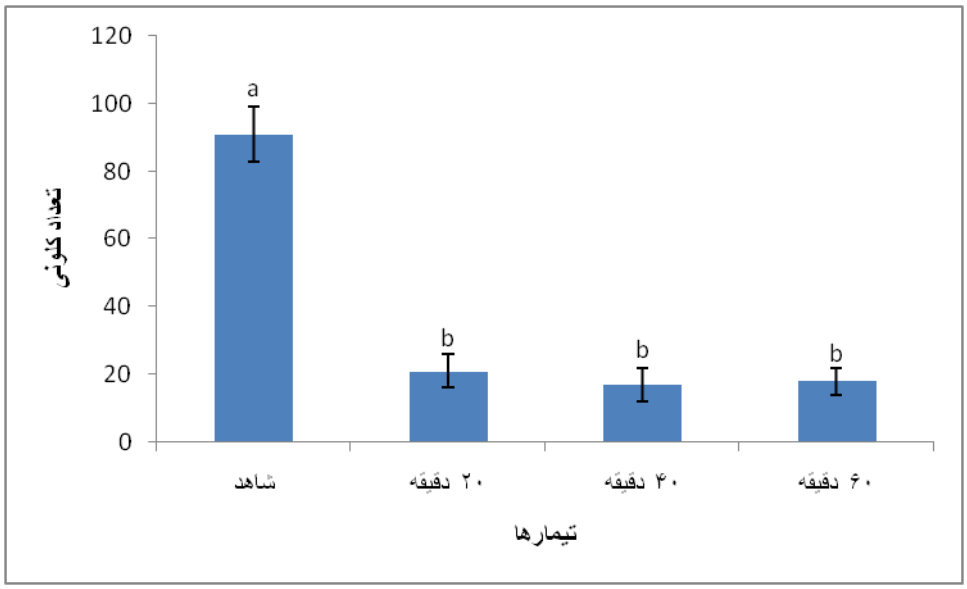
شکل ۳ تشکیل کلونی ۱۰ روز پس از استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در دمای۳۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان شاهد (A) و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (B) (تیمارهای ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی گراد باعث تشکیل کلونی نشدند.)



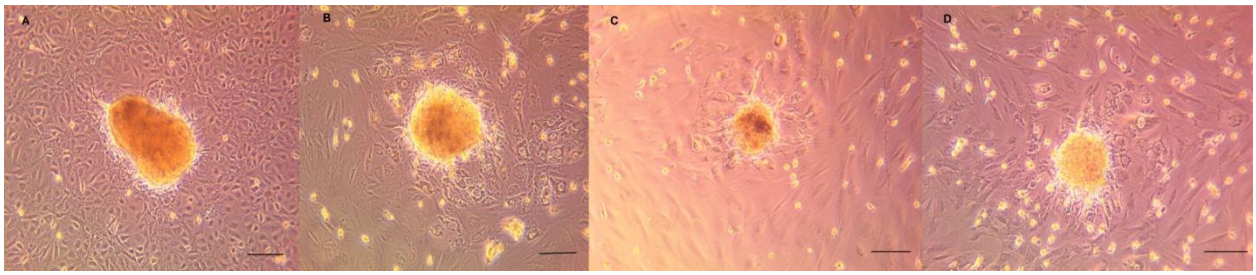
شکل ۴ اثر تیمار گرمایی در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در مقایسه با شاهد (۳۵ درجه سانتی گراد) روی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از استخراج و کشت در شرایط آزمایشگاهی (تیمارهای ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی گراد باعث تشکیل کلونی نشدند.)

مطالعه اثر تیمار سرمایی روی بیضه بره‌ها

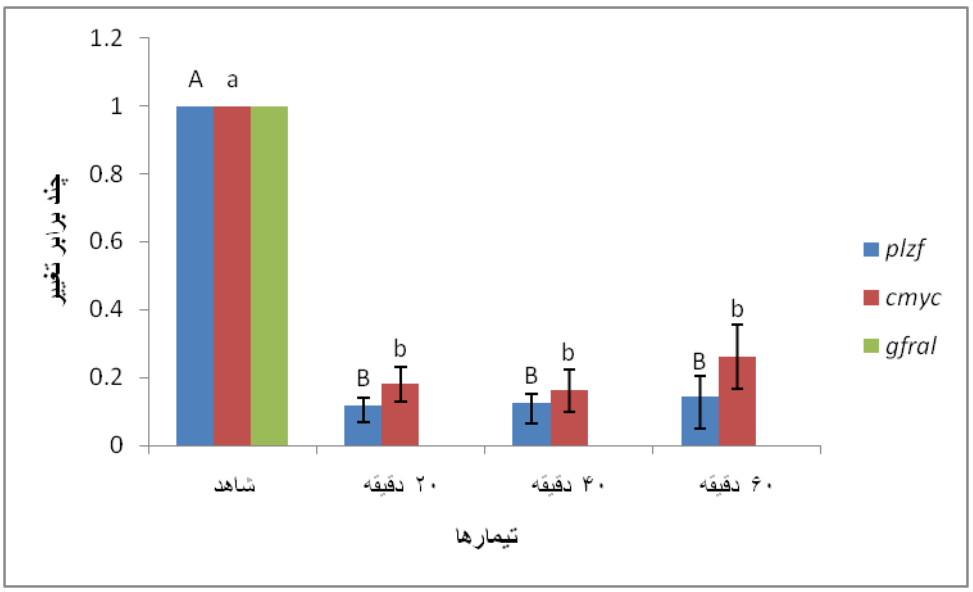
به منظور بررسی اثر شوک سرمایی روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بیضه‌های بره‌ها در ظرف‌های یخ آب به مدت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه قرار گرفت. هر تیمار با فاصله زمانی دو روز با سه تکرار برای هر بره انجام شد. ۶ هفته پس از اعمال تیمارها بیضه‌ها به روش جراحی از بدن دام‌ها خارج شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. نتایج نشان داد استفاده از تیمارهای یخ آب تغییری در وضعیت ظاهری بیضه‌ها ایجاد نکرد اما تشکیل کلونی پس از استخراج و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای یخ آب بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۵$)، (۵±۲۱، ۵±۱۷ و ۴±۱۸ در مقایسه با ۸±۹۱ برای تیمارهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه یخ آب در مقایسه با شاهد)، (شکل ۵). تصویر کلونی‌های تشکیل شده در گروه شاهد و تیمارهای یخ آب در شکل ۶ نشان داده شده است. بیان ژن‌های *Plzf*، *cmyc* و *gfrl* در تیمارهای یخ آب بطور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۵$)، (شکل ۷).



شکل ۵ اثر زمان‌های مختلف تیمار یخ آب روی تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی



شکل ۶ تشکیل کلونی ۱۰ روز پس از استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت تیمارهای شاهد (A)، یخ آب به مدت ۲۰ دقیقه (B)، یخ آب به مدت ۴۰ دقیقه (C) و یخ آب به مدت ۶۰ دقیقه (D)



شکل ۷ اثر تیمار یخ آب در زمان‌های مختلف ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه در مقایسه با شاهد روی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (*Plzf*، *cmyc* و *gfrl*) پس از استخراج و کشت

بحث

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منشاء و اساس اسپرماتوژنز بوده و عملکرد صحیح آنها باعث افزایش بهره‌وری تولید اسپرم می‌شود. آنها می‌توانند پس از پیوند، سیستم‌های بازسازی بافت حیوان گیرنده را مجدداً فعال نمایند. عمل پیوند سلول‌های زایا در جوندگان در حال انجام است ولی در حیوانات بزرگ به اندازه کافی تحقیقات انجام نشده است تا کارایی این روش در حیوانات مزرعه ای قابل اثبات باشد.برای آماده کردن حیوانات گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از روش‌های مختلف نظیر شیمی درمانی، پرتودرمانی، گرما و سرما استفاده می‌شود. در حال حاضر، متداول ترین روش آماده سازی گیرنده برای پیوندسلول-های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده از روش شیمی درمانی و داروی بوسولفان است. با این حال، در بعضی از گونه‌ها مانند گوسفند، تجویز بوسولفان با سمیت سیستمیک و عوارض جانبی همراه است که به جایگاه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی آسیب رسانده و باعث کاهش کارایی پیوند و سلامت گیرنده می‌شود. تزریق ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان به داخل بیضه بره باعث کاهش تعداد اسپرماتیدها در بیضه شد اما این اثر تنها ۸ هفته باقی ماند. تزریق ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان به حفره شکمی و یا بیضه بره‌ها به دلیل اثرات جانبی توصیه نشده است (Rasouli و همکاران، ۲۰۲۰). استفاده از روش پرتودرمانی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است که به عنوان جایگزینی برای درمان بوسولفان گزارش شده است. در تحقیقات گذشته، پرتودرمانی موضعی بیضه‌ها در کاهش تعداد سلول‌های زایا در موش‌ها (Creemers و همکاران، ۲۰۰۲)، بزها (Honaramooz و همکاران، ۲۰۰۵) ، قوچ‌ها (Oatley و همکاران، ۲۰۰۵) و گاوهای(Izadyar و همکاران، ۲۰۰۳) گیرنده بسیار موثر بوده است. با این حال، علاوه بر آهکی شدن لوله‌های اسپرم ساز، این روش به تجهیزات رادیوتراپی تخصصی نیاز دارد که در شکل فعلی آن برای کاربردهای میدانی عملی نیست. خطرات احتمالی ناشی از استفاده نامناسب مانند نشت تابش را نیز نمی‌توان نادیده گرفت (Maو همکاران، ۲۰۱۱).نتایج نشان داده است که روش پرتودرمانی عملکرد بیضه را در معرض خطر قرار می‌دهد (Olejnik و همکاران، ۲۰۱۸). استفاده از شوک گرمایی یکی از روش‌های جایگزین برای آماده سازی گیرنده‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. به طوری که شوک گرمایی باعث از بین بردن سلول‌های زایای داخل بیضه از جمله بخشی از سلول‌های اسپرماتوگونی می‌گردد که در نتیجه آن فضای خالی برای انتقال و استقرار سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دهنده پیوند بوجود می-آید. در نتیجه اعمال تنش گرمایی، بستر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که با سلول‌های سرتولی احاطه شده‌اند، بطور جدی تحت تاثیر تنش گرمایی قرار نخواهند گرفت و در نتیجه این سلول‌ها توانایی پشتیبانی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیوند شده را خواهند داشت. همچنین استفاده از تیمار شوک گرمایی محدود به بیضه گیرنده‌ها می‌باشد که مانع از ایجاد اثرات جانبی سیستماتیک در نتیجه قرار گرفتن در تنش گرمایی می‌شود(Ma و همکاران، ۲۰۱۱).

در اکثر پستانداران، هیپرترمی بیضه منجر به مرگ سلول‌های زایا می‌شود و قرار گرفتن در معرض شوک گرمایی کوتاه مدت باعث آپوپتوز و تحلیل رفتن سلول‌های زایا در موش و موش صحرایی شده است. بعلاوه، اگرچه اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای گرد بیشتر در معرض دمای بالا هستند، اسپرماتوگونی‌ها نیز به دمای بالا حساس هستند(Ma و همکاران، ۲۰۱۱). اثر فیزیولوژیکی گرم شدن بیضه پستانداران بالغ در چندین گونه گزارش شده است که شامل کاهش وزن بیضه و یک دوره ناباروری و پس از آن بازگشت تدریجی به حالت طبیعی در طی یک تا دو دوره اسپرم-زایی می باشد (Rockett و همکاران، ۲۰۰۱). ما در این مطالعه تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی را شش هفته پس از اعمال تیمارهای گرما و سرما روی بیضه بره‌ها مورد مطالعه قرار دادیم. نتایج نشان داد که شوک گرمایی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، به طور معنی داری تعداد کلنی‌ها و بیان ژن‌های *cmyc*،*Plzf* و *gfrl* را به عنوان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مقایسه با شاهد

کاهش داد. نتایج دوره‌های طولانی مدت تغییرات دما بر باروری مردان بالغ کاملاً شناخته شده است (Setchell، ۱۹۹۸). مطالعه Thanh و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد در موش هایی که تحت تنش گرمایی ۴۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، ساختار لوله های اسپرم ساز و اسپرماتوژنز کاملا تخریب شدند. روش‌هایی که از عایق کیسه بیضه برای ارزیابی تأثیرات افزایش دمای بیضه استفاده می‌کنند باعث افزایش اسپرم غیرطبیعی و کاهش تعداد اسپرم می-شوند (Rocha و همکاران، ۲۰۱۵). به عنوان مثال در موش‌های صحرایی، وزن بیضه‌ها بعد از یک هفته ۷۰ درصد در مقایسه با شاهد کاهش یافت که با کاهش تعداد اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها همراه بوده است. تیمارهای هایپوترمی (۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه) در موش باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوگونی شد اما در بیضه‌های موش صحرایی که در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفته‌اند اختلافی دیده نشده است. در حالی که در خوک‌های جوان، گرمایش کوتاه مدتبیضه‌ها (۳۹ درجه سانتی گراد) باعث کاهش ۵۰ درصدی تعداد گنوسیت‌ها شده است (Olejnik و همکاران، ۲۰۱۸). نکته‌ای که باید توجه شود این است که درمان شوک گرمایی به اندازه درمان بوسولفان در از بین بردن سلول‌های زایا موثر نبوده است. با این حال، مطالعات قبلی بر روی جوندگان نشان داده است که حذف ناقص سلول‌های زایا مانع از پیوند موفقیت آمیزسلول‌های بنیادی اسپرماتوگونینمی‌شود. هنگامی که بوسولفان نتواند سلول‌های زایا را به طور کامل حذف کند در حقیقت سلامت بیضه و اسپرماتوژنز مشتق شده از دهنده پیوند بهبود می‌یابد (Ma و همکاران، ۲۰۱۱).

نتایج استخراج و کشتسلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ششهفته پس از تیمار با شوک سرمایی نشان داد که تشکیل کلونی در شرایط آزمایشگاهی در تیمارهای آب یخ به طور قابل توجهی در مقایسه با شاهد کاهش یافت. همچنینبیان ژن‌های*Plzf*،*cmyc* و*gfrl*در تیمارهای یخ آب در مقایسه با شاهد به طور معنی داری کاهش یافت. با این حال در مطالعهOlejnik و همکاران (۲۰۱۸)، خنک سازی در صفر درجه سانتی گراد یا گرمایش در ۴۵ درجه سانتی گراد در بیضه‌های برهای تازه متولد شده منجر به تغییری در وزن بیضه، تعداد گنوسیت‌ها در هر مقطع یا قطر لوله‌های اسپرم ساز نشد. در این سن، گنوسیت‌ها به طور مرکزی درون توبول‌ها قرار دارند و به راحتی قابل مشاهده هستند. مورفولوژی گنوسیت‌ها در بیضه‌های تحت درمان با حرارت، غیرطبیعی به نظر می‌رسد (شکل نامنظم ، هسته بزرگ) اگرچه آماری برای این مشاهدات ارایه نشده است. اما آنها در مطالعه خود، بیضه‌ها را در یک ظرف حاوی آب در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد یا صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت غوطه ور کردند و تیمارها فقط یک بار اعمال شدند و حیوانات ۲ هفته پس از درمان اخته شدند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که هر یک از شوک‌های گرمایی و سرمایی می تواند به منظور آماده سازی گیرنده‌های پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گوسفند مورد استفاده قرار گیرد. به منظور تکمیل نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌شود باروری گیرنده‌های پیوند پس از انجام عمل پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از همکاران پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

منابع

Creemers, L.B., Meng, X., den Ouden, K., van Pelt, A.M.,Izadyar, F., Santoro, M.,Sariola, H. and de Rooij, D.G. (2002). Transplantation of germ cells from glial cell linederivedneurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biology of Reproduction*. 66:1579-1584.

Ganguli, N., Wadhwa, N.,Usmani, A.,Kunj, N.,Ganguli, N.,Sarkar, R.K.,Ghorai, S.M. andMajumdar, S.S. (2016). An efficient method for enerating a germ cell depleted animal model for studies related to spermatogonial stem cell transplantation. *Stem Cell Research and Therapy*.7:142.

Herrid, M., Olejnik, J., Jackson, M.,Suchowerska,N.,Stockwell, S., Davey, R., Hutton, K., Hope, S. and Hill, J.R. (2009). Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biology of Reproduction*. 81: 898–905.

Honaramooz, A., Behboodi, E.,Hausler, C.L.,Blash, S., Ayres, S., Azuma, C.,Echelard, Y. andDobrinski, I. (2005). Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation.*Journal of Andrology*. 26:698-705.

Izadyar, F., Den Ouden, K., Stout, T.A., Stout, J.,Coret, J.,Lankveld, D.P.,Spoormakers, T.J.,Colenbrander, B.,Oldenbroek, J.K.,van der Ploeg, K.D.,Woelders, H. andKal, H.B. (2003). Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells.*Reproduction*. 126:765–774.

Ma, W., An, L., Wu, Z., Wang, X.,Guo, M., Miao, K., Ma, W.andTian, J. (2011). Efficient and safe recipient preparation for transplantation of mouse spermatogonial stem cells: pretreating testes with heat shock. *Biology of Reproduction*. 85: 670–677.

Mohamed, R.H., Karam, R.A. andHagrass, H.A. (2015).Anti-apoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats.*Gene*.561: 107–114.

Mulder, C.L., Catsburg, L.A.E.,Zheng, Y., de Winter-Korver, C.M., van Daalen, S.K.M., van Wely, M., Pals, S.,Repping, S. and van Pelt, A.M.M. (2018). Long-term health in recipients of transplanted in vitro propagatedspermatogonial stem cells. *Human Reproduction*. 33(1): 81–90.

Oatley, J.M., Tibary, A., de Avila, D.M., Wheaton, J.E., McLean, D.J. and Reeves, J.J. (2005).Changes in spermatogenesis and endocrine function in the ram testis due to irradiation and active immunization against luteinizing hormonereleasing hormone.*Journal of Animal Science*. 83:604–612.

Olejnik, J.,Suchowerska, N.,Herrid, M., Jackson, M.,Hinch, G. and Hill, J. (2018).Spermatogonia survival in young ram lambs following irradiation, busulfan or thermal treatment. *Small Ruminant Research*.166:22–27.

Olejnik, J., Suchowersk, N.,Herrida, M.,Jacksond, M.,Hinche, G. andHilla, J. (2018).Spermatogonia survival in young ram lambs following irradiation, Busulfan or thermal treatment. *Small Ruminant Research*. 166: 22–27.

Qin, Y., Liu, L., He, Y., Ma, W., Zhu, H., Liang, M.,Hao, H., Qin, T., Zhao, X. and Wang, D. (2015). Testicular injection of busulfan for recipient preparation in transplantation of spermatogonial stem cells in mice.*Reproduction Fertility and Development*. 28(12):1916-1925.

Qin, Y., Liu, L., He, Y., Wang, C., Liang, M., Chen, X.,Hao, H., Qin, T., Zhao, X. and Wang, D. (2016). Testicular busulfan injection in mice to prepare recipients for spermatogonial stem cell transplantation is safe and non-toxic. *PLoS ONE*. 11(2):1-15.

Rasouli, M.H., Zandi, M., Sadeghi, A.A, Emamjomeh-Kashan, N. (2020). Spermatogonial stem cell survival in ram lambs following busulfan treatment. *Animal Reproduction*.17:e20200001.

Rocha, D.R., Martins, J.A., van Tilburg, M.F., Oliveira, R.V., Moreno, F.B.,Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Araujo, A.A. and Moura, A.A. (2015). Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram.*Theriogenology*. 84:1291-1305.

Rockett, J.C., Mapp, F.L.,Garges, J.B.,Luft, J.C., Mori, C. and Dix, D.J. (2001).Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice.*Biology of Reproduction*. 65:229–239.

Rodriguez-Sosa, J.R., Dobson, H. and Hahnel, A. (2006).Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep.*Theriogenology*. 66: 2091–2103.

Setchell, B.P. (1998). The parkes lecture. Heat and the testis.*Journal of Reproductionand Fertility*. 114:179–194.

Thanh, T.N., Van, P.D., Cong, T.D., Minh, T.L., Vu, Q.H.N. (2020). Assessment of testis histopathological changes and spermatogenesis in male mice exposed to chronic scrotal heat stress. *J Anim Behav Biometeorol.*8:174-180.

van Pelt, A.M.M., Morena, A.R., van Dissel-Emiliani, F.M.F.,Boitani, C.,Gaemers, I.C., de Rooij, D.G. andStefanini, M. (1996). Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A- deficient rat testes.*Biology of Reproduction*. 55:439-44.