مقاله پژوهشی

تأثیر ویتامین E بر القاء کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه

فاطمه صالحی[۱]، علی‌اصغر مقدم[۲*]، پیمان رحیمی فیلی[۲]

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های زایای غیر متمایزی هستند که در طی مرحله پس از بلوغ با حفظ تعادل بین خود نوسازی و تمایز، سبب حفظ اسپرماتوژنز در طول حیات موجود می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ویتامین E روی کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه‌ی بره‌ی نابالغ طی دو مرحله هضم آنزیمی جدا و به روش حذف تمایزی تخلیص شدند. این سلول‌ها به چهار گروه تقسیم و به مدت ۱۰ روز تحت تیمارهای مختلف قرار گرفتند. گروه شاهد (کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS که هیچ‌گونه تیماری را دریافت نکرد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ که علاوه بر محیط بالا به ترتیب تحت تیمار با ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین E قرار گرفتند. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت انجام شد و تعداد و قطر کلونی‌های تشکیل‌شده در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت به‌وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. شناسایی کلونی‌ها با استفاده از ایمنوسیتوشیمی آنتی‌ژن PGP9.5 تائید گردید.

نتایج: میانگین تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای مختلف کشت در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. میانگین مساحت کلونی‌ها در روز دهم به‌طور معنی‌داری بیشتر از روز چهارم بود ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که افزودن ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان احتمالاً نقش چشمگیری در القا کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در کشت کوتاه‌مدت در محیط آزمایشگاه ندارد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی اسپرماتوگونی، ویتامین E، محیط آزمایشگاه

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells) سلول‌های منفردی هستند که بر روی غشای پایه بافت پوششی لوله‌های منی ساز بیضه قرارگرفته‌اند. این سلول‌ها برای تولید مداوم اسپرم پس از بلوغ جنسی و انتقال اطلاعات ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر تخصص‌یافته‌اند (۱). این سلول‌ها اهمیتی ویژه در انجام آزمایش‌های بیولوژیکی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری تولیدمثل و اصلاح ژنتیکی از طریق سلول زاینده جنس نر دارند (۲). لذا حفظ و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت امری بسیار ضروری است. یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها جهت رسیدن به این هدف، استفاده از سیستم کشت مناسب است که بتواند حمایت لازم را از این سلول‌ها فراهم نماید تا به‌صورت تمایز نیافته باقی بمانند. در تمامی بافت‌ها، تعداد سلول‌های بنیادی کمتر از سلول‌های تمایزیافته است.

حتی نسبت بین سلول‌های بنیادی به سلول‌های تمایزیافته در کل بافت بیضه در مقایسه با سایر بافت‌ها بسیار کمتر است، به‌طوری‌که به ازای هر سه یا چهار هزار سلول تمایزیافته، فقط یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه موجود بالغ وجود دارد؛ بنابراین یکی از مشکلات اصلی استفاده از سلول‌های بنیادی، کم بودن تعداد آن‌هاست (۳). علاوه بر این، با توجه به فقدان نشانگرهای سلولی اختصاصی برای جداسازی این سلول‌ها، دستیابی به روش‌هایی که بتوان این سلول‌ها را به‌صورت خالص

*نویسنده مسئول: **علی اصغر مقدم**، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
Email: moghaddam@razi.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-9882-542X

و به میزان زیاد تهیه کرد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴). کشت طولانی‌مدت در محیط آزمایشگاه، انجماد و پیوند ازجمله راهکارهای حفظ این سلول‌ها هستند (۵). تاکنون مطالعات زیادی درزمینه کشت، انجماد و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان (۶) و گونه‌های مختلف حیوانی ازجمله گاو (۷)، موش (۸)، رت (۹) و حتی ماهی (۱۰) صورت گرفته است. مطالعات انجام‌گرفته روی کشت طولانی‌مدت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه نشان داده است که این سلول‌ها حتی پس از دو سال کشت و تحت شرایط مناسب، زنده ماندند و هیچ‌گونه تغییر ژنتیکی یا کاهش پتانسیل زایشی در آن‌ها دیده نشده است (۱۱). تجمع متابولیت‌های سمی سلول و ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو به‌واسطه تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در محیط کشت سبب آسیب به ساختار غشاء سلولی و اسیدهای نوکلئیک و درنتیجه کاهش فعالیت خود نوزایی سلول‌ها می‌شود (۱۲). آنتی‌اکسیدان‌ها با قطع زنجیره واکنش در غشاء میتوکندری می‌تواند به مبارزه با رادیکال‌های آزاد بپردازد و مولکول‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت نماید (۱۳). ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم در مهار آسیب غشاء سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن شناخته‌شده است. همچنین این ویتامین با جلوگیری از پراکسیداسیون چربی‌های غیراشباع و محافظت از فسفولیپیدهای درون‌سلولی تمامیت غشاء سلول را حفظ می‌کند (۱۴). به‌طور سنتی، ویتامین E به نام ویتامین ضد نازایی شناخته می‌شود و با عملکرد طبیعی سیستم تناسلی مردان مرتبط است، این ویتامین نقش محافظتی مهم در برابر استرس اکسیداتیو با کاهش سطح مالون دی آلدئید (رادیکال آزاد) ایفا می‌کند که موجب بهبود فعالیت سیستم دفاعی سلول‌های بیضه می‌شود (۱۵). تاکنون مطالعات بسیار محدودی در مورد شرایط کشت و تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر تکثیر سلول‌های بنیادی دام‌های اهلی، علیرغم نقش مهم آن‌ها در تولید حیوانات مدل، تراریخته و داروهای نوترکیب انسانی در محیط آزمایشگاه صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

با توجه به اینکه کار بر روی حیوان زنده انجام‌نشده است و نمونه اخذشده مربوط به بیضه پس از کشتار است کمیته اخلاق پژوهشی و کار با حیوانات این طرح پژوهشی را از اخذ کد معاف نمود.

تمامی آنزیم‌ها و محلول‌های مورداستفاده در این آزمایش ساخت شرکت GIBCO انگلیس است. در موارد غیرازاین، شرکت سازنده ذکر می‌گردد.

نمونه‌گیری

برای اخذ نمونه بیضه به کشتارگاه مراجعه و بیضه در کنار یخ و ظرف مدت یک ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه بلافاصله بیضه از اسکروتوم خارج گردید و متعاقباً ۱۰ گرم بافت پارانشیم بیضه به کمک قیچی استریل از بیضه جدا و به داخل لوله فالکون (SPL, South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌متر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) تجاری و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انتقال داده شد به‌منظور کاهش بار میکروبی، سه مرتبه و هر بار با دور ۱۵۰۰ و به مدت یک دقیقه سانتریفوژ (Hettach, Germany) انجام شد. به‌منظور هضم مکانیکی، بافت پارانشیم بیضه پس از شستشو به داخل پتری دیش منتقل و با استفاده از قیچی استریل به‌طور کامل قطعه‌قطعه شد. این عمل تا جایی ادامه یافت که بافت بیضه کاملاً حالت نرم و شیرابه‌ای پیدا کرد. هضم آنزیمی در دو مرحله و با استفاده از آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲، آنزیم ترپسین هرکدام با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آنزیم DNase با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم صورت گرفت. به‌منظور افزایش بازدهی تأثیر آنزیم‌ها در هر مرحله، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در شِیکر انکوباتور (WiseCube, South Korea) ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. جهت ارزیابی هضم آنزیمی و روند باز شدن لوله‌های منی ساز از یکدیگر و درنهایت استخراج سلول‌های منفرد، بافت پارانشیم بیضه هر ۱۰ دقیقه زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope) موردبررسی قرار گرفت.

با مشاهده سلول‌های منفرد در زیر میکروسکوپ به‌منظور توقف هضم آنزیمی از FBS(Fetal bovine serum, Gibci, UK) استفاده شد. سپس محلول با دور ۸۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی برداشت شد. به‌منظور حذف سلول‌های مایوئید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری استریل عبور داده و مواد حاصل در لوله‌های فالکون جمع‌آوری و

هرکدام از لوله‌ها به مدت ۲ دقیقه در دور ۲۰۰۰ به‌منظور رسوب دادن سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی سانتریفوژ شدند. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، رسوب موجود در لوله فالکون برای کشت در پلیت چهارخانه (TPP، سوئیس) مورداستفاده قرار گرفت. پس از شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها بارنگ تریپان بلو، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع در هر گوده کشت داده شد. به‌تمامی گوده‌ها ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر GDNF (Sigma, USA) اضافه شد. سپس پلیت در انکوباتور (Memmert, Germany) ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۱۰ روز کشت داده شد. تعویض محیط هر ۳ روز یک‌بار انجام شد. برای ارزیابی تعداد و قطر کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ کشت، از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج استفاده شد. مساحت کلونی با استفاده از نرم‌افزار Image J (nersion 1.240; national Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) و برحسب میلی‌متر مربع محاسبه شد.

گروه‌های مورد آزمایش عبارت‌اند از:

گروه شاهد: کشت تعلیق سلولی در محیط DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک، ۵ درصد FBS (محیط پایه)

تیمار ۱: ویتامین E (Sigma, USA) با دوز ۲۰ میکرومول بر میلی‌لیتر به محیط پایه افزوده شد.

تیمار ۲: ویتامین E با دوز ۴۰ میکرومول بر میلی‌لیتر به محیط پایه افزوده شد.

تیمار ۳: ویتامین E با دوز ۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر به محیط پایه افزوده شد.

تعیین هویت کلونی‌ها

جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانت علیه آنتی‌ژن PGP9.5 استفاده شد. به‌منظور شناسایی PGP9.5 پس از ترپسینه کردن سلول‌ها در آخرین روز کشت، اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکنژوگه خرگوش (Dako, Carpinteria, CA, USA) و FluoroTag™ FITC (Conjugation Kit,Sigma-Aldrich,USA FITC کنژوگه بز رنگ‌آمیزی شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های اسپرماتوگونی از رنگ‌آمیزی DAPI (Sigma-Aldrich, USA) طبق روش پناهی و همکاران استفاده شد (۱۶).

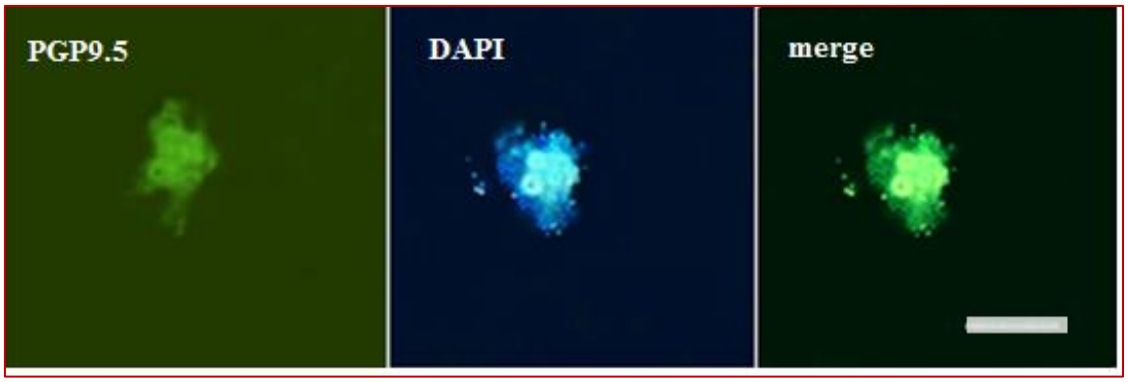
روش تجزیه‌وتحلیل آماری

نتایج حاصل از ۴ بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد. داده‌ها ازلحاظ نرمال بودن ارزیابی شدند. مقایسه میانگین تعداد و مساحت کلونی‌ها در تیمارهای مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی دانکن در نرم‌افزار Minitab16 و در سطح معنی‌دار ($P<0.05$) صورت پذیرفت.

نتایج

درصد حیات سلول‌ها در این مطالعه بلافاصله پس از جداسازی ۱/۸±۸۵/۰۵ برآورد گردید. همچنین پس از پایان دوره کشت با استفاده از آزمون ایمنوفلورسانت بیان آنتی‌ژن PGP9.5 در کلونی‌های تشکیل‌شده تائید گردید (شکل ۱).

باگذشت زمان، سلول‌های اسپرماتوگونی در داخل پلیت، تشکیل کلونی می‌دهند و تعداد و اندازه کلونی‌های حاصل از رشد

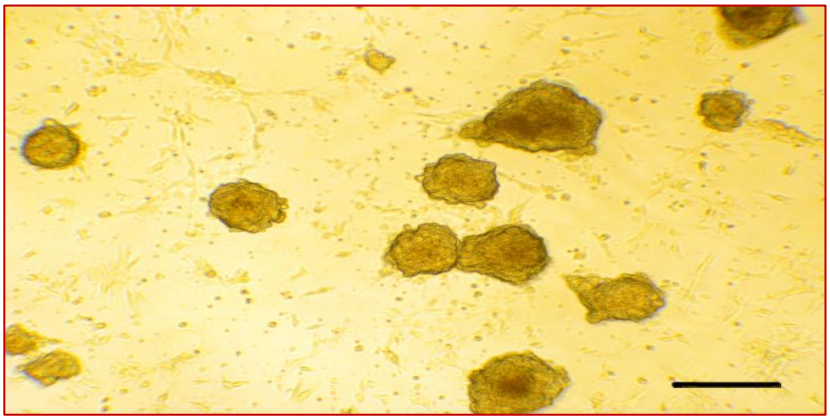


شکل ۱- رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت کلونی‌های اسپرماتوگونی. پس از پایان دوره کشت کلونی‌های اسپرماتوگونی آنتی‌ژن PGP9.5 را بیان کردند. هسته سلول‌ها با رنگ‌آمیزی DAPI تائید گردید. میله: ۸۰ میکرومتر.

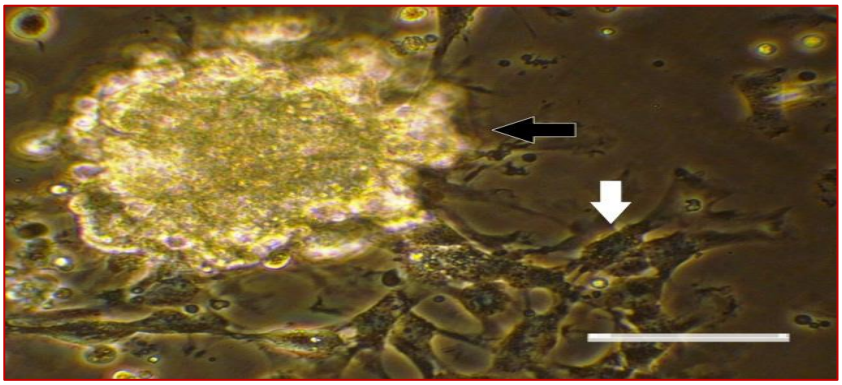
آن‌ها افزایش می‌یابد و به‌مرور برخی از آن‌ها از طریق پل‌های بین سلولی به یکدیگر متصل می‌شوند (شکل ۲ و ۳).

تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در تمام‌روزهای پس از کشت (روزهای ۴، ۷ و ۱۰) ازنظر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه شاهد و تیمارهای ۱، ۲ و ۳ و نیز بین تمامی تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه‌های شاهد و تیمارهای ۱، ۲ و ۳ در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند.



شکل ۲- کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز هفتم کشت. بزرگنمایی: ۴۰ برابر



شکل ۳- کلونی تمشکی شکل اسپرماتوگونی (پیکان مشکی) در روز دهم کشت که بر روی سلول‌های سرتولی (پیکان سفید) قرارگرفته است. سلول‌های سرتولی با ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های مختلف به رشد کلونی‌های اسپرماتوگونی کمک می‌نماید. بزرگنمایی: ۱۰۰ برابر

جدول ۱- تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی (میانگین±خطای استاندارد) بین گروه‌های مختلف آزمایش در روزهای مختلف کشت

گروه‌های آزمایشی					
روز	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	میانگین روز
۴	۱۳۶/۸±۵۶/۵	۱۴۶/۸±۵۸/۹	۱۷۱/۸±۶۱/۶	۱۸۹/۵±۶۲/۸	۱۶۱/۲±۲۷/۴
۷	۱۵۵/۳±۵۱/۴	۱۶۵/۵±۵۱/۱	۱۹۱/۳±۵۱/۱	۲۲۶/۵±۵۸/۵	۱۸۴/۶±۲۴/۸
۱۰	۱۹۹/۳±۳۷/۲	۲۱۵/۵±۴۲/۲	۲۳۹/۳±۴۹/۷	۲۶۴/۳±۰/۵۴	۲۲۹/۶±۲۱/۶
میانگین گروه	۱۶۳/۸±۲۶/۸	۱۷۵/۹±۲۸/۱	۲۰۰/۸±۲۹/۷	۲۲۵/۴±۰/۳۲	

مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در تمام‌روزهای پس از کشت (روزهای چهارم، هفتم و دهم) ازنظر مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه شاهد و بقیه گروه‌ها و همچنین بین تیمارهای مختلف در هر یک از روزهای ۴، ۷ و ۱۰ بعد از کشت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$). میانگین مساحت کل کلونی‌ها در روزهای ۴ و ۱۰ ازنظر آماری معنی‌دار است ($p<0.05$).

در مطالعه حاضر کلونی‌های اسپرماتوگونی کشت‌شده قادر به بیان ژن PGP9.5 بودند. این ژن نشانگر اختصاصی سلول بنیادی اسپرماتوگونی است (۱۸). همچنین درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی ۱/۸±۸۵/۰۵ برآورد گردید که در مقایسه با مطالعات دیگر این میزان قابل‌قبول است (۱۹) و نشان‌دهنده استفاده از دوز صحیح آنزیم‌ها و شرایط مناسب جداسازی سلول است.

در مطالعه‌ی حاضر اثرات مقادیر ۱۰، ۲۰، ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E بر تغییرات تعداد و مساحت کلونی‌های

جدول ۲- مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی (میانگین±خطای استاندارد) برحسب میلی‌متر مربع بین گروه‌های آزمایشی در روزهای مختلف کشت

گروه‌های آزمایشی					
روز	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	میانگین روز
۴	۱/۲۹۶ ± ۰/۵۲	۱/۵۶۳ ± ۰/۵۷	۱/۷۱ ± ۰/۶۲	۲/۰۱۶ ± ۰/۶۸	۱/۶۴۶ ± ۰/۲۸[b]
۷	۱/۷۷۴ ± ۰/۴۷	۱/۸۹۳ ± ۰/۴۲	۲/۱۴۹ ± ۰/۳۸	۲/۶۸۱ ± ۰/۶۸	۲/۱۲۴ ± ۰/۲۱ [ab]
۱۰	۲/۴۴۲ ± ۰/۳۹	۲/۵۷۶ ± ۰/۴۴	۲/۶۸۳ ± ۰/۴۳	۳/۲۶۶ ± ۰/۲۷	۲/۷۴۲ ± ۰/۲۱[a]
میانگین گروه	۱/۸۳۷ ± ۰/۲۸	۲/۰۱۱ ± ۰/۲۸	۲/۱۸۰ ± ۰/۲۸	۲/۶۵۶ ± ۰/۳۲	

a و b: مقادیر متفاوت در هر ستون با حروف مختلف ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند ($P<0.05$)

بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تأثیر ویتامین E بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه است. این‌گونه دامی دارای اهمیت و جایگاهی ویژه در طراحی حیوانات تراریخته و داروهای نوترکیب دارد که می‌تواند در درمان برخی بیماران خاص استفاده شود.

استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه بره‌ی نابالغ آسان‌تر است زیرا در بافت پوششی لوله‌های منی ساز بیضه قبل از بلوغ دو نوع سلول اسپرماتوگونی تیپ A و سلول‌های سرتولی وجود دارد. وجود تعداد اندکی سلول‌های سرتولی در محیط کشت می‌تواند از طریق ترشح سایتوکاین و فاکتورهای رشد موردنیاز برای تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی مفید واقع شود، هرچند وجود تعداد زیاد این سلول‌ها در محیط کشت می‌تواند اسپرماتوگونی را به سمت تمایز پیش ببرد؛ بنابراین مناسب‌ترین سن برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه‌ی گوسفند، پیش از بلوغ است (۱۷).

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در یک دوره ده‌روزه کشت بررسی شد. تعداد کلونی‌ها در تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف کشت اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). هرچند با افزایش دوز تعداد کلونی‌ها افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود. میانگین مساحت کلونی‌ها در روز دهم به‌طور معنی‌داری بیشتر از روز چهارم بود ($P<0.05$).

شبانی و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که اثر غلظت‌های مختلف ویتامین E (۵، ۱۲ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) ویتامین C در محیط انجماد، قابلیت زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از یخ گشایی را در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌دهد. سپس اثرات سینرژیک غلظت‌های مؤثر با استفاده از آزمون MTT و بیان ژن‌های آنتی آپوپتوز موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی در حضور غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

ویتامین E و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C می‌تواند منجر به افزایش زنده ماندن سلول‌ها و بیان ژن‌های آنتی آپپتوز شود (۲۰).

علی‌اکبری و همکاران در یک مطالعه نشان دادند که افزودن آلفاتوکوفرول (یکی از اشکال ویتامین E) به محیط انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی موش سبب بهبود زنده‌مانی سلول‌ها در طی فرآیند انجماد و افزایش تعداد و قطر کلونی‌های حاصل از آن یک ماه پس از انجماد می‌شود. احتمالاً آنتی‌اکسیدان‌ها آب‌اکسیژنه را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کنند و سبب از بین بردن اثرات سمی احتمالی گونه‌های اکسیژن فعال بر سلول در فرآیند کشت و انجماد می‌شود (۱۴).

در مطالعه حاضر نیز تعداد و مساحت کلونی در تمامی روزهای آزمایش در گروه‌هایی که ویتامین E به محیط کشت اضافه شد نسبت به گروه شاهد بیشتر بود هرچند این افزایش معنی‌دار نبود. اگرچه طول دوره کشت در مطالعه حاضر ۱۰ روزه و در مطالعات دیگر یک‌ماهه است و چه‌بسا با افزایش طول دوره کشت اختلاف بین گروه‌های شاهد و تیمار معنی‌دار شود.

مشخص‌شده است که ویتامین E قادر است موجب افزایش اپی تلیوم ژرمینال و همچنین افزایش تعداد اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌ها شود. ازآنجاکه ویتامین E به‌طور سنتی به‌عنوان یک ویتامین ضد ناباروری مطرح است، بنابراین این احتمال وجود دارد که این ویتامین با ارتقا فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز نقش خود را در افزایش قابلیت تحرک و حیات اسپرم اعمال نموده باشد (۲۱).

یک مولکول توکوفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شکننده زنجیره می‌تواند دو رادیکال پروکسیل لیپید و درنتیجه دو واکنش بالقوه زنجیرهای پراکسیداسیون را مهار کند. همچنین اثبات‌شده که استفاده از آلفاتوکوفرول باعث کاهش نرخ آپوپتوز در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شده است (۵).

کشت طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به دلایل مختلف بسیار دشوار است. یکی از دلایل این است که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در هفته اول دچار آپوپتوزیس می‌شوند و به‌شدت تعداد آن‌ها کاهش می‌یابد. به این صورت که پس از یک هفته کشت، سیگنال‌های متفاوتی در درون سلول‌ها فعال‌شده و اکسیژن به‌عنوان فعال‌کننده این سیگنال‌های درون‌سلولی موجب ایجاد استرس اکسیداتیو و از بین بردن سلول‌ها می‌شود. در رابطه با مکانیسم از بین رفتن سلول‌ها، مرگ سلولی آپوپتوزیس از طریق خنثی کردن عمل آنتی‌اکسیدان‌ها سلول‌های آسیب‌دیده را حذف می‌کند، البته بعضی از سلول‌ها همانند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دلایل دیگر مثل در معرض قرار گرفتن در برابر عوامل خارجی همانند نور و گرما حساسیت بیشتری به اکسیژن فعال دارند و بیشتر در معرض آپوپتوز هستند (۲۲). درنتیجه آنتی‌اکسیدان‌های اضافه‌شده به محیط کشت و انجماد با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن و از بین بردن اثرات سمی گونه‌های فعال اکسیژن و با حفظ تمامیت غشای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی سبب بهبود شرایط کشت می‌شود (۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده از آنتی‌اکسیدان ازجمله ویتامین E خیلی ضروری به نظر نمی‌رسد هرچند استفاده آن اثر سوء ندارد. احتمالاً آنتی‌اکسیدان‌ها ازجمله همین ویتامین تأثیرات مثبت خود را در کشت طولانی‌مدت نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه رازی کرمانشاه، به خاطر حمایت مالی در اجرای این مطالعه تشکر نمایند. نتایج این مقاله بخشی از پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی دکترای عمومی دامپزشکی بوده است. این پایان‌نامه با کد ۲۴۲۸۸۹۸ در پایگاه اطلاعاتی ایرانداک ثبت‌شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Desjardins C, Ewing LL. Cell and molecular biology of the testis.1st ed. New York: Oxford University Press; 1993. P.266-294.
2. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human compar. Birth Defects Res C Embryo Today. 2009; 87(1): 27-34.
3. Mohammadi S. A Comparison between the Colony Formation of adult Mouse Spermatogonial Stem Cells in Co cultures with Sertoli and STO (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line). Cell J. 2010; 12(2):231-240.
4. Goossens E, Frederickx V, De Block G, Van Steirteghem AC, Tournaye H. Reproductivecapacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model. Hum Reprod. 2003; 18(9): 1874-1880.
5. Aliakbari F, Sedighi Gilani MA, Amidi F, Baazm M, Korouji M, Izadyar F, Yazdekhasti H and Abbasi M. mproving the Efficacy of Cryopreservation of Spermatogonia Stem Cells by Antioxidant Supplements. Cell Reprogram. 2016; 18(2): 87-95.
6. Sun M, Yuan Q, Niu M, Wang H, Wen L, Yao C, et al. Efficient generation of functional haploid spermatids from human germline stem cells by three-dimensional-induced system.Cell Death Differ. 2018; 25(4): 747-764.
7. Oatley MJ, Kaucher AV, Yang QE, Waqas MS, Oately JM. Condition for long-term culture of cattle undifferentiated spermatogonia. Biol Reprod. 2016: 95(1):14.
8. Helsel AR, Oatley MJ, Oatley JM.Glycolysis optimized enhance maintenance of regenerative integrity in mouse spermatogonial stem cells during long term culture.stem cells reports. 2017: 8(5):1430-1441.
9. Rye BY, Orwing KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Phenotypic and functional haracteristics of spermatogonial stem cells in rats. Dev Biol. 2004: 274(1): 158-170.
10. Santos Nassif Lacerda SM, Costa GM, da Silva Mde A, Campos-Junior PH, Segatelli TM, Peixoto MT, Resende RR, de França LR. Phenotipic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (Oreochromis niloticus) spermatogonial stem cells. Gen Comp Endocrinol. 2013; 1(192): 95-106.
11. Kanatsu Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. Biol Reprod. 2005; 72(4):985-991.
12. Kofman AE, McGraw MR and Payne CJ. Rapamycin increases oxidative stress response gene expression in adult stem cells Aging. 2012; 4(4): 279-289.
13. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian J Exp Biol. 2010; 48(5): 425–435.
14. Aliakbari F, Gilani MAS, Yazdekhasti H, Koruji M, Asgari MR, Baazm M, Izadyar F, Nejad EK, Khanezad M, Abbasi M. Effects of antioxidants, catalase and a-tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017; 45(1): 63-68.
15. Momeni HR, Oryan S, Eskandari N. Effects of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rets. Reprod Biol. 2012: 12(2): 171-181.
16. Qasemi Panahi B, Tajik P, Movahedin M, Moghaddam G, Barzgar Y, Heidari Vala H. Differentiation of bovine spermatogonial stem cells into osteoblasts. Avicenna J Med Biotechnol. 2011; 3(3): 149-153.
17. Rodriguez Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenology. 2006; 66(9): 2091-2103.
18. 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): 1029-1038.
19. Zandi A, Rahimi Feyli P, Moghaddam AA. Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro. Feyz. 2016; 20(3): 205-13. [In Persian]
20. Shabani H, Zandi M, Ofoghi H, Sanjabi MR, Hoseini Pajooh KH. The effect of combining vitamin E and C on the viability improvement of transfected ovine spermatogonial stem cells after cryopreservation and thawing. Turk J Vet Anim Sci. 2017; 41: 1701-1738.
21. Mehranjani MS, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH. Stereological study of the effectsof vitamin E on testis structure in rats treated withpara-nonylphenol. Asian J Androl. 2009; 11(4): 508-516.
22. Izadyar F, Wong J, Maki C, Pacchiarotti J. Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. Hum Reprod. 2011; 26(6): 1296-1306.

Original Article

Effect of Vitamin E on Induction of Colonization of Spermatogonial Stem Cells in Vitro

Salehi F[1], Moghaddam A[2]*, Rahimi-Feyli P[2]

1. Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 14 Jan 2019 Accepted: 14 Jul 2019

Abstract

Background & Objective: Spermatogonial stem cells (SSCs) are undifferentiated germ cells that maintain spermatogenesis during lifetime by balancing between self-renewal and differentiation. The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of vitamin E on spermatogonial stem cells colony formation.

Materials & Methods: SSCs were isolated from testes of prepubertal lamb by two step enzymatic digestions then purified by differential plating. The cells were cultured for 10 days in 4 groups. Control group: Basic media (DMEM environment which contains 1% antibiotic and 5% FBS) and treatment groups were treated with 20, 40 and 80 µmol/ml vitamin E added to basic media respectively. Changing of culture media was performed every 72h. Colony number and diameter assay was done by inverted microscope. Identification of SSCs was performed by immunocytochemistry assay against PGP9.5.

Results: There were no significant difference in colony number and surface area between treatment groups and between treatment and control groups in days 4, 7and 10. Colony surface area significantly increased at day 10 compared to day 4 ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that vitamin E as an antioxidant does not have any significant effect on colony induction of SSCs in short term culture in vitro.

Keywords: Spermatogonial Stem cell, Vitamin E, In-Vitro

***Corresponding Author: Moghaddam Ali-Asghar,** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
Email: moghaddam@razi.ac.ir
https://orcid.org/0000-0001-9882-542X

Journal of Fasa University of Medical Sciences 9 (2019): 1613-1620