Effect of vitamin C on colony formation of ovine spermatogonial stem cells in vitro

Bahrami M., Vet. MD [1], Rahimi-Feyli P., Vet. MD [2], Moghaddam A.A., Vet. MD [3]
1. Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran (Corresponding Author),Tel:+98-83-38320041, drp.rahimi@gmail.com
3. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

ABSTRACT

Background and Aim*:* The technology of using spermatogonial stem cells (SSCs) has been limited due to lack of an ideal culture system for growth and proliferation. The aim of this study was to investigate the effects of different doses of vitamin C on SSCs colony formation in vitro.

Materials and Methods*:* The cells were isolated from testes of prepubertal lambs by two enzymatic digestions, purified by differential platting, and then treated for 10 days by using 4 methods: Simple culture including SSCs in DMEM containing 1% antibiotic and 5% FBS as our control group and for the three other cultures we used the same culture medium as that in control group plus 20, 40 and 60 µg/ml of vitamin C respectively. Culture media were refreshed every 72h and colony numbers and diameters were determined on the 4^{th} , 7^{th} and 10^{th} days after the beginning of culture by using inverted microscope. Spermatogonial cells were identified by immunocytochemistry staining against PGP9.5. Using R software, the results obtained from 5 repeats were evaluated by ANOVA. $P<0.05$ was considered significant.

Results: On the 7^{th} day, we found a significant difference between the culture No. 2 (0.41 mm^2) and culture No. 3 (0.08 mm^2) in regard to spermatogonial colonies surface areas ($P<0.05$). Also, colonies surface areas on the 10^{th} day in the culture No. 2 was significantly greater than those in the other groups ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that vitamin C with a dose of 40 (µg/ml) was effective in increasing the surface area of spermatogonial colonies. But it had no effect on spermatogonial cell number.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Vitamin C, Cell culture.

Received: Dec 10, 2016 **Accepted:** Aug 12, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان /دوره بیست و دوم / آذر و دی ۱۳۹۶/۴۳-۳۲

تاثیر ویتامین ث بر القاء کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه

محیا بهرامی[۱]، پیمان رحیمی فیلی[۲]، علی اصغر مقدم[۳]

۱. دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۰۸۳-۳۸۳۲۰۰۴۱، drp.rahimi@gmail.com

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

چکیده:

زمینه و هدف: تکنولوژی استفاده از سلول‌های بنیادی به دلیل عدم وجود یک سیستم کشت ایده‌آل برای رشد و تکثیر این سلول‌ها محدود شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف ویتامین ث بر القاء کلونی‌زایی این سلول‌ها در محیط کشت است.

روش بررسی: سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه بره نابالغ طی دو مرحله هضم آنزیمی جدا و به روش حذف تمایزی خالص‌سازی شدند. این سلول‌ها به مدت ۱۰ روز به چهار روش تیمار شدند: گروه شاهد شامل کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS و تیمارهای ۱، ۲ و ۳ شامل محیط بالا و به ترتیب ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث بود. تعویض محیط کشت هر ۳ روز انجام شد و تعداد و قطر کلونی‌های تشکیل شده در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. شناسایی سلول‌ها با رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه PGP9.5 انجام شد. یافته‌های حاصل از پنج بار تکرار با استفاده از نرم افزار R و آزمون آماری آنالیز واریانس مورد بررسی قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ بعنوان سطح معنی‌داری تعیین گردید.

یافته ها: مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۷ در تیمار ۲ (۰/۴۱) اختلاف معنی‌داری با تیمار ۳ (۰/۰۸) داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین مساحت کلونی‌ها در روز ۱۰ کشت در تیمار ۲ با دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ویتامین ث در دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای تاثیر مثبت افزایشی بر مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی است ، اما روی تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی بی تاثیر است.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی اسپرماتوگونی، ویتامین ث، کشت سلول

وصول مقاله :۹۵/۹/۲۰ اصلاحیه نهایی:۹۶/۱/۲۳ پذیرش:۹۶/۵/۲۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

مقدمه

اسپرماتوژنز فرآیندی پایدار است که به واسطه خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط بسیار پیچیده لوله‌های منی ساز تداوم می‌یابد (۱). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به زیر مجموعه‌ای از سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته اطلاق می‌گردد که از سلول‌های زایای اولیه در دوره رشد و نمو جنینی منشاء می‌گیرند. (۲). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعنوان یک رده شناخته شده از سلول‌های بنیادی با توانایی خودنوسازی و تولید سلول‌های زایا مطرح می‌باشد(۳). در مطالعات اخیر مشاهده شده که دو جمعیت عملکردی اسپرماتوگونی در بیضه وجود دارد: سلول‌های بنیادی بالفعل که مسئول خودنوسازی هستند و سلول‌های بنیادی بالقوه که در شرایط سخت و خاص، توانایی خودنوسازی را از خود نشان می‌دهند (۴). هنگامی‌که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت شرایط نامطلوب به میزان زیادی از دست می‌روند (بعنوان مثال قرار گرفتن در معرض مواد سمی و یا مواد شیمیایی و اختلالات فیزیکی) سلول‌های پیش‌ساز مسئولِ تمایز ممکن است به عنوان سلول‌های بنیادی بالقوه عمل کرده و عمل خودنوسازی را از سر گیرند، در نتیجه‌ی خودنوسازی جمعیت کلی اسپرماتوگونی، به سمت تمایز سوق داده می‌شود که نتیجه نهایی این روند بازیابی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالفعل است (۴).

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نه تنها برخی مشخصه‌های مشترک با سایر سلول‌های بنیادی را دارند بلکه ویژگی‌های متمایز خود را نیز حفظ می‌کنند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های بنیادی بالغ بسیار منحصر به فردی هستند که می‌توانند اطلاعات ژنتیکی را از والدین به نتاج منتقل کنند (۵). لذا این سلول‌ها ابزاری ویژه در ژنتیک حیوانات، پرورش و تولیدمثل محسوب می‌شوند. در مورد این *سلول‌ها انتقال* ژن و پیوند همولوگ به منظور تولید حیوانات تراریخته در جهت بهبود تولیدات دارویی نوترکیب به کار می‌رود. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از خاصیت خودنوزایی خود در محیط آزمایشگاه توانایی تقسیم شدن را حفظ می‌کنند (۶). کشت و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه می‌تواند اطلاعات ارزنده‌ای از عملکرد این سلول‌ها و به عبارت دیگر فرآیند اسپرماتوژنز در اختیار ما قرار دهد. علاوه بر این، دستکاری این سلول‌ها منجر به دستیابی به اطلاعات ارزشمندی در خصوص آزمایش‌های زیستی، فناوری دامی، اصلاح نژاد و پژوهش‌های پزشکی بالاخص درمان ناباروری می‌شود(۷). با کشت طولانی مدت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه مشاهده شده که این سلول‌ها پس از دو سال کشت و تحت شرایط مناسب زنده مانده‌اند و هیچ گونه تغییر ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی یا کاهش پتانسیل زایشی در آن‌ها دیده نشده است (۸). کشت آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک ابزار مهم برای بسط و دستکاری این جمعیت سلولی نادر محسوب می‌شود و کشت طولانی مدت این سلول‌ها به عنوان پیش‌نیازی برای دستیابی به اکتشافات مربوط به خودنوسازی و تمایز سلول-های بنیادی اسپرماتوگونی به حساب می‌آید. امروزه دانشمندان موفق به کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش، رت و همستر شده‌اند (۱۱-۹). از طرفی، اگرچه محققان در جهت کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات اهلی تلاش بسیاری کرده‌اند، قدرت تقسیم و کلونی‌زایی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه تنها برای مدت کوتاهی (کمتر از دو ماه) حفظ می‌شود (۱۵-۱۲).همانند سایر سلول‌های بنیادی، یکی از مشکلات اصلی استفاده از این سلول‌ها کم تعداد بودن آن‌ها است به طوری که این سلول‌ها تنها ۰/۰۳ درصد کل سلول‌های زایای موش بالغ را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، با توجه به نبودن نشانگرهای سلولی اختصاصی برای جداسازی این سلول‌ها، استفاده از روش‌هایی که بتوان این سلول‌ها را به صورت خالص و به میزان زیاد تهیه کرد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعات زیادی در مورد تأثیر عوامل مختلف و شرایط متفاوت روی سلول‌های اسپرماتوگونی موش (۱۹-

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

۱۶) ،رت (۲۱،۲۰) ،خوک (۲۲) و گاو (۱۲) صورت گرفته ولی این مطالعات در مورد گوسفند علی رغم اهمیت آن در تولید دام تراریخته و طراحی مدلهای آزمایشگاهی بسیار محدود هستند. ویتامین ث (اسید آسکوربیک)، یک ریزمغذی محلول در آب است که برای انجام فعالیت‌های بیولوژیکی ضروری است. ارتباط مستقیمی بین این ویتامین و باروری وجود دارد (۲۳). این ویتامین در بدن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و سلول‌ها را در برابر تاثیرات مضر رادیکال‌های آزاد و آلودگی‌ها محافظت می‌کند (۲۵و۲۴) و در فرآیند تولیدمثل برخی گونه‌های پستانداران نیز دارای اهمیت است. کاهش سطح و یا عدم وجود آسکوربات در انسان سبب کاهش تعداد اسپرم، افزایش تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی، کاهش باروری و تاخیر در التیام زخم می‌شود (۲۶). در مطالعات قبلی تاثیر مثبت تزریق زیرجلدی آسکوربیک اسید روی باروری گاوهای کم بارور نر (۲۷) و ماده (۲۸) و اسب نر (۲۹) گزارش شده است. تجویز آسکوربیک اسید در گاوهای نر کم بارور سبب افزایش غلظت مایع منی می‌شود (۲۲). Augustine و همکاران نشان دادند که ویتامین ث با انتشار غیرفعال یا انتقال تسهیل شده می‌تواند از سلول‌های سرتولی عبور کرده و به فضای مجاور لومنی برسد (۳۰). در نتیجه ویتامین ث به این سلول‌ها توانایی متابولیزه کردن ویتامین و تنظیم تحویل این مولکول را به سلول‌های زایا در بخش مجاور لومنی می‌دهد. مطالعات انجام شده نشان داده است که ویتامین ث به زنده مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه کمک می‌کند و این عمل را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و تاثیر بر مسیر داخلی آپوپتوز انجام می‌دهد (۲۵). همچنین مشاهده شده که تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به واسطه ویتامین ث افزایش می‌یابد (۳۱). تاکنون مطالعه ای در زمینه تاثیر ویتامین ث بر القاء کلونی زایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند انجام نگرفته است.

روش بررسی

نمونه‌های لازم از بره‌های ۲-۳ ماهه کشتار شده در کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان کرمانشاه تهیه شد. این بیضه‌ها در کنار یخ و در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی منتقل شد.

جداسازی سلول های بنیادی

پس از جدا سازی بیضه از اسکروتوم و اپیدیدیم، حدود ده گرم از بافت پارانشیم بیضه را با استفاده از پنس و قیچی استریل جدا کرده و به لوله فالکون (SPL, South Korea) منتقل و سپس حدود ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, UK) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی-سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) به آن اضافه شد. سپس لوله به مدت یک دقیقه و با دور ۱۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد (Hettach, Germany). شستشوی بافت پارانشیم بیضه ۳ بار و به منظور کاهش بار میکروبی انجام شد. سپس هضم مکانیکی با استفاده از قیچی استریل تا زمانی که بافت پارانشیم بیضه کاملاً خرد شد، ادامه پیدا کرد. به منظور هضم آنزیمی مرحله اول به بافت خرد شده پارانشیم بیضه، کلاژناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم تریپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma, USA) اضافه گردید. سپس پتری دیش‌های حاوی بافت به‌مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد. به منظور افزایش بازدهی تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانشیم بیضه هر ۱۰ دقیقه یکبار عمل پیپتاژ صورت گرفت. هدف از هضم آنزیمی مرحله اول جدا کردن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر بود. در ادامه به‌منظور حذف و از بین بردن بافت‌های هضم شده حاصل از جدا شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

محتویات هریک از پتری دیش‌ها به داخل لوله‌های فالکون منتقل شد و در دور ۱۴۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ و سپس رسوب که حاوی لوله‌های منی‌ساز است نگه داشته شده و مایع رویی دور ریخته شد. پس از انجام مرحله اول هضم آنزیمی، محتویات لوله فالکون به داخل پتری دیش‌های استریل منتقل شده و به منظور هضم لوله‌های منی‌ساز و آزادسازی سلول‌های موجود در این لوله‌ها به هر یک از پتری دیش‌ها آنزیم کلاژناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دزوکسی ریبونوکلئاز (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر) اضافه گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس محتویات پتری دیش‌ها به داخل لوله‌های فالکون استریل منتقل و به‌منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقیمانده به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتریفوژ شد. به‌منظور توقف هضم آنزیمی از محلول FBS استفاده شد. سپس مایع رویی داخل فالکون که حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و میوید است برداشت شده و درون فالکون دیگری ریخته شد. به‌منظور حذف سلول‌های میوید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری استریل عبور داده شد، سپس به منظور رسوب دادن سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی و تعلیق حاصل در لوله‌های فالکون جمع آوری و هر کدام از لوله‌ها به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفوژ شد. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، رسوب موجود در لوله‌های فالکون برای کشت مورد استفاده قرار گرفت.

شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها

درصد سلول‌های اسپرماتوگونی زنده با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK) و میکروسکوپ نوری (OLYMPUS, JAPAN) تعیین شد. با شمارش یکصد سلول به‌طور تصادفی تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین و بر این اساس درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

انتقال سلول‌ها به پلیت و افزودن ویتامین ث

سلول‌های موجود در لوله فالکون به پلیت‌های مخصوص کشت چهار خانه‌ای (TPP، سوئیس) منتقل شد. ۵۰۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی (که حاوی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی است) که در محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد سرم جنین گوساله و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک حل شده بود به داخل هر چاهک ریخته شد. در نهایت محلول ویتامین ث (Batch No.: 224, Darou Pakhsh – iran, Vitamin C 500 mg/5 ml) به شرح زیر به هر یک از خانه‌ها اضافه شد

گروه شاهد (خانه شماره۱): ویتامین ث به محیط کشت اضافه نشد.

تیمار۱ (خانه شماره۲): ویتامین ث با دوز۲۰میکرومول بر میلی‌لیتر.

تیمار۲ (خانه شماره۳): ویتامین ث با دوز ۴۰ میکرومول بر میلی‌لیتر.

تیمار۳ (خانه شماره۴): ویتامین ث با دوز ۶۰ میکرومول بر میلی‌لیتر.

در نهایت پلیت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد به مدت ۱۰ روز کشت داده شد. تعویض محیط کشت هر ۳ روز یک‌بار انجام شد.

تعویض محیط و شمارش

تعویض محیط و شمارش کلونی‌ها در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت صورت پذیرفت. شمارش تعداد کلونی و قطر آنها با استفاده از میکروسکوپ معکوس(Olympus, IX71® inverted microscope) مجهز به عدسی مدرج انجام شد (شکل شماره۱). برای محاسبه مجموع مساحت کلونی‌ها که در این مطالعه واحد آن به میلی‌متر مربع می‌باشد از نرم افزار Image J (version 1.240; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) استفاده شد.

شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از آزمایشات

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

ایمنوسیتوشیمی

جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانت علیه آنتی‌ژن PGP9.5 استفاده شد. بمنظور شناسایی PGP9.5 پس از ترپسینه کردن سلول‌ها در روز آخر کشت، اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش (Dako, Carpinteria, CA, USA) و FITC کنژوگه بز رنگ‌آمیزی شد. بمنظور رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های اسپرماتوگونی از رنگ آمیزی DAPI طبق روش پناهی و همکاران استفاده شد (۳۲).

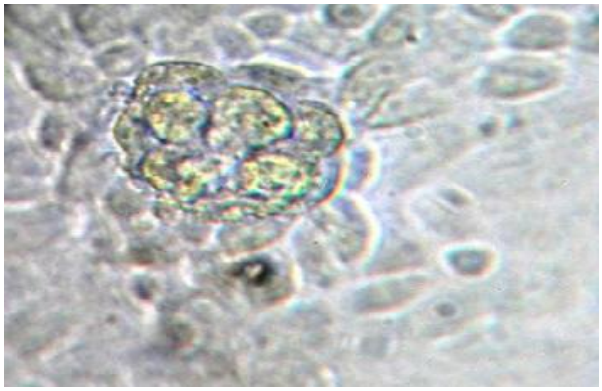
روش تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده‌های جمع‌آوری شده از لحاظ نرمال بودن ارزیابی شدند. پس از نرمال کردن داده‌ها آزمون آنالیز واریانس انجام شده و اثرات متقابل غلظت‌های مختلف ویتامین ث و طول مدت کشت بر تعداد و مساحت کلونی با استفاده از نرم‌افزار آماری R مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها در تیمارهای مختلف با آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنی‌دار $P< ۰/۰۵$ صورت پذیرفت. ولی با توجه به وجود اثر متقابل زمان و غلظت بر مساحت کلونی‌ها، مقایسه میانگین مساحت کلونی‌ها در تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف با استفاده از آزمون آماری دانکن و Repeated measure صورت پذیرفت.

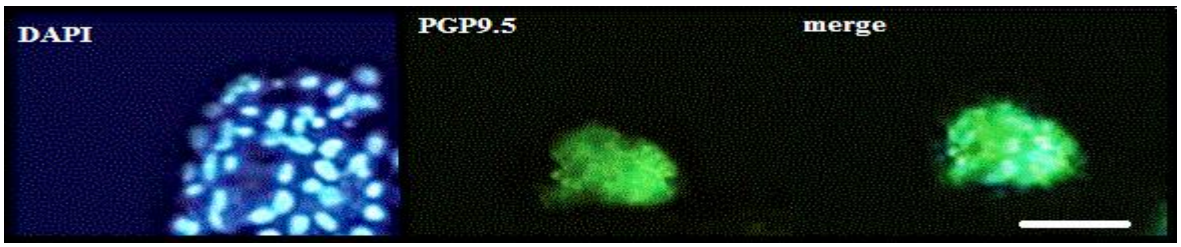
یافته‌ها

درصد حیات سلول‌ها

درصد حیات سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی ۸۳/۲±۱/۶۲ درصد بود. همچنین این سلول‌ها پس از گذراندن یک دوره کشت ۱۰ روزه آنتی‌ژن PGP9.5 را بیان کردند (شکل شماره ۱و۲).



شکل ۱- کلونی تمشکی شکل اسپرماتوگونی در روز دهم کشت (بزرگنمایی: **X**۱۰۰۰)



شکل ۲- رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانت بر علیه آنتی ژن PGP9.5، هسته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI رنگ‌آمیزی شده‌اند. میله: ۸۰میکرومتر

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

در جدول ۱ تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی بین تیمارهای مختلف (ستون) و بین روزهای مختلف کشت (ردیف) مقایسه شده است. در تمام روزهای پس از کشت (روزهای ۴، ۷ و ۱۰) از نظر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی بین هیچ یک از گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). میانگین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام روزهای کشت در گروه شاهد مشابه تیمارهای ۱، ۲ و ۳ بود و اختلاف معنی داری بین آن‌ها مشاهده نشد.

جدول ۱- تعداد کلونی اسپرماتوگونی میانگین ± (خطای استاندارد) در گروه‌های مختلف آزمایشی در روزهای متفاوت

روز	گروه *های آزمایش*			
	شاهد	۱	۲	۳
۴	۳۵۴ ± ۱۵۷	۴۳۹ ± ۱۶۹	۵۷۰ ± ۲۰۰	۲۶۷ ± ۹۹
۷	۴۱۳ ± ۱۴۵	۵۱۸ ± ۱۹۱	۷۱۹ ± ۲۲۶	۲۵۹ ± ۹۰
۱۰	۴۷۷ ± ۱۵۱	۶۱۰ ± ۲۲۳	۸۴۹ ± ۲۷۸	۲۴۹ ± ۸۶

مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

در جدول شماره ۲ اثرات غلظت‌های مختلف ویتامین ث بر حسب میلی‌لیتر در محیط کشت (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکروگرم) و طول مدت کشت (۴، ۷ و ۱۰ روز) و همچنین اثرات متقابل آن‌ها روی مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی (mm^2) نشان داده شده است. غلظت‌های مختلف ویتامین ث بر حسب میلی‌لیتر در محیط کشت (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکروگرم) و طول مدت کشت (۴، ۷ و ۱۰ روز) روی مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی (mm^2) اثرات معنی‌دار داشتند ($P<۰/۰۵$). همچنین اثرات متقابل غلظت-های مختلف ویتامین ث × طول مدت کشت روی مساحت کلونی نیز معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- آنالیز واریانس اثرات غلظت‌های مختلف ویتامین ث، طول مدت کشت و همچنین اثرات متقابل آن‌ها روی مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی($\mathbf{mm^2}$)

متغیر	درجه آزادی	مجموع مربعات	مجموع میانگین مربعات	F value	P value
غلظت‌ویتامین ث	۳	۱/۰۱۹۲	۰/۳۳۹۷	۲۸/۲	$P<۰/۰۰۱$
طول مدت کشت	۲	۰/۲۰۸۵	۰/۱۰۴۳	۸/۶	$P<۰/۰۰۱$
غلظت ویتامین ث× طول مدت کشت	۶	۰/۲۳۴۸	۰/۰۳۹۱	۳/۲	$P<۰/۰۱$

در جدول شماره ۳ مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی(mm^2) بین گروه‌های مختلف آزمایش (ستون) و در روزهای مختلف پس از کشت (ردیف) مقایسه شده است. در روز ۴ پس از کشت هیچ اختلاف معنی داری بین مساحت کلونی‌ها درگروه‌های مختلف مشاهده نشد. در روز ۷ پس از کشت مساحت کلونی‌ها در تیمار۲ با تیمار۳ دارای اختلاف معنی‌دار بود اما هیچ یک از این دو گروه با گروه شاهد و تیمار۱ اختلاف معنی‌داری نداشتند. در روز ۱۰ پس از کشت تیمار۲ با گروه شاهد، تیمار۱ و تیمار۳ اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$). مساحت کلونی‌ها بین روز چهارم و دهم در داخل گروه تیمار ۲ از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) .

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

جدول ۳- مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی میانگین ± (خطای استاندارد) گروه‌های آزمایشی مختلف در روز های مختلف پس از کشت(mm^2)

روز	گروه های آزمایشی			
	شاهد	۱	۲	۳
۴	^{c}۰/۱۳ ± ۰/۰۵	^{bc}۰/۱۷ ± ۰/۰۶	^{bc}۰/۲۵ ± ۰/۰۹	^{c}۰/۰۹ ± ۰/۰۲
۷	^{bc}۰/۱۶ ± ۰/۰۵	^{bc}۰/۲۲ ± ۰/۰۷	^{ab}۰/۴۱ ± ۰/۱۲	^{c}۰/۲۱ ± ۰/۰۸
۱۰	^{bc}۰/۲۱ ± ۰/۰۶	^{bc}۰/۲۹ ± ۰/۱	^{a}۰/۶۵ ± ۰/۱۸	^{c}۰/۰۷ ± ۰/۰۲

مقادیر متفاوت در داخل هر ردیف (گروه‌های آزمایش) که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<$۰/۰۵).

مقادیر متفاوت در داخل هر ستون (روزهای آزمایش) که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<$۰/۰۵).

بحث

هدف از این مطالعه، کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه بره نابالغ و بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ویتامین ث روی القاء کلونی‌زایی این سلول‌ها در محیط کشت بود. غلظت‌های متفاوت ویتامین ث (۰، ۲۰، ۴۰، و ۶۰ µg/mL) به محیط کشت اضافه شد، و تاثیر آن روی مساحت و تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مطالعه گردید.

نتایج نشان داد که در روز دهم در گروه‌های غنی شده با غلظت‌های مختلف ویتامین ث سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کلونی‌های متراکمی تشکیل داده و دارای لبه‌های ناواضحی هستند. غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث دارای اثر مطلوب بر تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که این افزایش در مورد مساحت معنی‌دار است و محیط کشت‌هایی که با این دوز از ویتامین ث تیمار شدند میزان رشد بیشتری را از خود نشان دادند.

در این مطالعه میانگین درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی زنده بلافاصله بعد از جداسازی ۱/۶۲±۸۳/۲ درصد بود. در مطالعات دیگر درصد حیات سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی را ۱/۲±۸۵/۳ ، ۳/۵±۸۶ و ۳/۶۳±۸۶/۷۷ درصد گزارش کردند (۳۵-۳۳). نتایج مطالعه حاضر از نظر درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با نتایج مطالعات فوق هم‌خوانی دارد که خود بیانگر تکنیک صحیح جداسازی و انتخاب دوز صحیح آنزیم‌ها می‌باشد.

در مطالعه حاضر برای تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 استفاده شد و مشاهده گردید که سلول‌های جدا شده از بیضه این نشانگر پروتئینی را بیان کردند، لذا می‌توان از این نشانگر برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند بهره جست. در چندین مطالعه از آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 به‌منظور شناسایی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A در گونه‌های مختلف از جمله ، گوساله (۳۶)، گوسفند (۳۷)، موش (۳۸) بز (۳۹) و انسان (۴۰) استفاده شده است.

با گذشت زمان انتظار می‌رود که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تقسیم انجام داده و کلونی‌های تشکیل شده رشد کنند. در مطالعه انجام شده با گذشت زمان و افزایش طول مدت کشت، تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی (به استثناء گروه تیمار شده با دوز ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث) افزایش یافت. در مطالعات گذشته نیز که روی کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت انجام شده بود با گذشت زمان تعداد و مساحت کلونی‌ها افزایش یافته است (۴۳-۴۱). همچنین در مطالعه زندی (۳۶) و سلگی (۴۴) روی سلول-های اسپرماتوگونی بره، با گذشت زمان رشد کلونی‌ها افزایش یافت.

Tajik و همکاران نشان دادند تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند و مجموع مساحت کلنی‌ها در محیط آزمایشگاه با گذشت زمان به طور معنی‌داری افزایش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

می‌یابد (۴۵). افزایش تعداد سلول‌ها با افزودن فاکتورهای رشد می‌تواند به دلیل بهبود سطح خودنوزایی، و کاهش تعداد می‌تواند نشان‌دهنده‌ی مرگ سلول‌های بنیادی و یا تمایز آن‌ها باشد (۴۳). نتایج ما نشان داد که دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث دارای تأثیر مثبت روی افزایش مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی بره است که با نتایج حاصل از مطالعات Huang و همکاران (۴۶)، Hu و همکاران (۴۳)، Osiecki و همکاران (۴۲) و Chepda و همکاران (۴۱) که در آن‌ها افزایش مساحت معنی‌دار بود، توافق دارد. در مطالعه ای که توسط Wang و همکاران صورت گرفت تاثیر ویتامین ث روی رشد و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز بررسی شد؛ این تحقیق نشان داد که کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با افزودن ویتامین ث به محیط کشت، راهکار مناسب‌تری جهت تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می‌باشد و همچنین رشد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وابسته به دوز بوده و دوز مطلوب برای رشد آن‌ها۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که با نتایج حاصل از مطالعات ما موافق است (۸). با اینکه دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث اثر مطلوب برافزایش تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی داشت اما این افزایش معنی دار نبود که این نتایج با نتایج به‌دست آمده از مطالعاتHuang و همکاران، Hu و همکاران، Osiecki و همکاران، Chepda و همکاران و Wang و همکاران که در آن‌ها افزایش تعداد معنی‌دار بود، موافق نیست (۴۶و ۴۳و ۴۲و ۸). اگرچه مکانیسم دقیق تولید گونه-های فعال اکسیژن هنوز به روشنی مشخص نشده است اماگونه‌های فعال اکسیژن به عنوان پیامبرهای ثانویه به کار گرفته می‌شوند و طیف وسیعی از فعالیت‌ها را از جمله تکثیر، رشد، توقف پیری و مرگ سلولی را شامل می‌شوند (۴۸و۴۷). در مطالعه Wang و همکاران بیان ژن آنتی آپوپتوز Bcl-2 و ژن‌های آپوپتوزی P53 و Bax با کمک روش‌های RT-PCR و qRT-PCR آنالیز شدند. نتایج نشان داد که این ژن‌ها به تغییرات وابسته به گونه های فعال اکسیژن حساس هستند و با افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن فعال می‌شوند (۸). همچنین در مطالعه مذکور که بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز نشان داده شد که سطح گونه‌های فعال اکسیژن در محیط کشتی که حاوی دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث بود، در حداقل میزان خود قرار داشت و کلونی‌های این گروه در مقایسه با سایر گروه‌ها رشد بیشتری داشتند (۸). بنابراین، در توافق با نتایج گزارش شده، افزودن دوز مطلوب ویتامین ث به محیط کشت می‌تواند از سلول در برابر آثار تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کرده و رشد و توسعه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را بهبود ببخشد (۴۹و۴۳). در مطالعه‌ای که توسط Hu و همکاران و Esteban همچنین و همکاران انجام شد، میزان گونه‌های فعال اکسیژن در محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیمار شده با غلظت‌های مختلف ویتامین ث بررسی شد و مشاهده شد که در دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این میزان در حداقل خود قرار دارد (۴۹و۴۳). همچنین دیده شده که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث دارای رابطه‌ای سهمی‌وار از کمترین به سمت بیشترین غلظت است (۴۲). Chepda و همکاران مشاهده کردند که کمترین و بیشترین غلظت ویتامین ث منجر به تولید رادیکال‌های آزاد و تاثیرات پرواکسیداتیو می‌شود (۴۱). بنابر نتایج حاصل این مطالعه دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ویتامین ث دوز مطلوب برای افزایش رشد کلونی-های اسپرماتوگونی می‌باشد. با گذشت زمان طولانی، سطوح گونه های فعال اکسیژن داخل سلولی برای هر گروه از ویتامین ث، به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. تکثیر سلول می‌تواند میزان فراوانی ویتامین ث مصرف کند، از این رو، اثر مهاری ویتامین ث روی گونه های فعال اکسیژن ضعیف می‌شود (۸). افزودن ویتامین ث در غلظت‌های مختلف روی سلول‌های مختلف دارای تاثیرات متغیری می-باشد (۴۲). زمانی‌که ویتامین ث در یک غلظت خاص به محیط کشت اضافه می‌شود، به‌عنوان یک محرک رشد عمل می‌کند و تکثیر سلولی و سنتز DNA را افزایش می‌دهد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

(۴۲). در دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان گونه‌های فعال اکسیژن در حداقل خود قرار دارد تولید گونه‌های فعال اکسیژن سرکوب شده و همچنین گونه‌های فعال اکسیژن به عنوان پیامبر ثانویه برای تنظیم مسیر سیگنالینگ آپوپتوز به کار گرفته می‌شود (۵۰) اما در غلظت‌های پایین‌تر از دوز ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، گونه‌های فعال اکسیژن با آسیب به غشای سلولی و قطعه قطعه کردن DNA سبب مرگ سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می‌شود (۸)، از سوی دیگر افزایش قابل توجه غلظت ویتامین ث در دوزهای بیشتر از ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتوتوکسیک می‌باشد و می‌تواند منجر به مهار تکثیر و القاء آپوپتوز شود (۴۹، ۴۶و ۴۳). در نتیجه سطوح مطلوب ویتامین ث به عنوان یک تنظیم کننده مثبت قوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی عمل می‌کند و به حفظ سطح فیزیولوژیکی مناسبی از گونه‌های فعال اکسیژن کمک می‌کند، بنابراین گونه‌های فعال اکسیژن در مسیر تنظیمی آپوپتوز به کار گرفته می‌شود وباعث بیان ژن آنتی-آپوپتوزی Bcl-2 و سرکوب بیان ژن‌های پروآپوپتوزی P53 و Bax می‌شود و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند را در محیط آزمایشگاه افزایش می-دهد (۸).

نتیجه گیری

برخلاف مطالعات انجام شده افزایش تعداد کلونی در این پژوهش معنی‌دار نبود که این اختلاف ممکن است به این دلیل باشد که تاثیر ویتامین ث روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند تاکنون بررسی نشده است و این مطالعه اولین تحقیق انجام شده روی گونه گوسفند است، بنابراین یکی از دلایل تفاوت در نتایج ممکن است ناشی از تفاوت‌های ناشناخته در گونه حیوان باشد. همچنین در مطالعات دیگری که روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انجام شده است، این سلول‌ها با سلول‌های سرتولی هم‌کشتی داده شده‌اند اما در این مطالعه هم‌کشتی صورت نگرفت، از این رو یکی دیگر از دلایل تفاوت در نتایج ممکن است این عامل باشد.

تشکر و قدردانی

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

Reference

1.Liu ML, Wang JL, Wei J, Xu LL, Yu M, Liu XM, et al. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of rat spermatogonial stem cells. Reproduction 2015; 149: 163–70.
2.Franca LR, Silva VA Jr, Chiarini-Garcia H, Garcia SK, Debeljuk L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. Biol Reprod 2000; 63; 1629–36.
3.Su-Ren C, Tang J, Cheng J, Li J, Jin C, Li X, et al. Loss of Gata4 in Sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling. Oncotarget 2015; 6: 37012-27.
4.Yoshida S. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. Reproduction 2012; 144: 293–302.
5.Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2002; 99: 931-6.
6.Kanatsu‐Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. Cells 2004; 119: 1001–12.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

7.Mulder CL, Zheng Y, Jan SZ, Struijk RB, Repping S, Hamer G, et al. Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. Hum Reprod Update 2016; 22: 561-73.
8.Wang J, Cao H, Xue X, Fan C, Fang F, Zhou J, et al. Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. Theriogenology 2014; 81: 545–55.
9.Kubota, H., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2004; 71: 722−31.
10.Kanatsu‐Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A. Long‐term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biol Reprod 2003; 69: 612–16.
11.Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Lin CC, Chang LJ, Avarbock MR, et al. Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. J Androl 2006; 28: 353-60.
12.Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. Theriogenology 2006; 65: 1828–47.
13.Goel S, Sugimoto M, Minami N, Yamada M, Kume S, Imai H. Identification, isolation, and in vitro culture of porcine gonocytes. Biol Reprod 2007;77: 127–37.
14.Kuijk EW, Colenbrander B, Roelen BA. The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. Reproduction 2009; 138: 721–31.
15.Xie B, Qin Z, Huang B, Xie T, Yao H, Wei Y, et al. In vitro culture and differentiation of buffalo (Bubalus bubalis) spermatogonia. Reprod Domest Anim 2010; 45: 275–82.
16.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.
17.Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. Biol Reprod 2003; 68: 2207–14.
18.Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla J. In vitro effects of epidermal growth factor., follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. Reprod Fertil Dev 2006; 18: 709-20 .
19.Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem 1990; 265:7709-12.
20.Amjad AI, Soder O, Sultana T. Role of testicular IL- I alpha in testicular physiology and disease. J Coll Physicians Surg Pak 2006; 16: 55- 60.
21.Olof S, Peter B, Aida W, Martti P. Insulin- Like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. Endocrinology 1992; 131: 2344- 50.
22.Lve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol 1977; 74: 68–85.
23.Millar, J. Vitamin C- the primate fertility factor?. Med Hypotheses 1992; 38: 292-5.
24.Brzozowski T, Kwiecien S, Konturek PC, Konturek SJ, Mitismusiol M, Duda A, et al. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. Med Sci Monit 2001; 7: 592-99.
25.Guaiquil VH, Vera JC, Golde DW. Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione depleted HL-60 cells. J Biol Chem 2001; 276: 955-61.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

26.Wilson, L. Sperm agglutination in human serum and blood. Proc Soc Exp Biol Med 1954; 85:652-5.
27.Phillips PH, Lardy HA, Heizer EE, Rupel IW. Sperm stimulation in the bull through the subcutaneous administration of ascorbic acid. J Dairy Sci 1940; 23: 873-8.
28.Phillips PH, Lardy HA, Boyer PD, Warner GM. The relationship of ascorbic acid to reproduction in the cow. J Dairy Sci 1941; 24:153-8.
29.Ralston SL, Barbacini S, Squires EL, Nockels, CF. Ascorbic acid supplementation in stallions. J Equine Vet Sci 1988; 52: 234-6.
30.Augustine LM, Markelewizcz RJ JR, Boekelheide K, Cherrington NJ .Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. Drug Metab Dispo 2005; 33: 182-9.
31.Fazeli, P. Effects of vitamin C on testicular and seminal characteristics of Markhoz goats. IJVR 2010; 11: 32-5.
32.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: 149-53.
33.Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2011; 108: 12740-5.
34.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: 85–94.
35.Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro. Feyz 2016; 20: 205-13. [In Persian]
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: 418-30.
37.Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenology 2006; 66: 2091-103.
38.Kon Y, Endoh D, Iwanaga T. 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: 333-41.
39.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: 1029-38.
40.Von Kopylow K, Kirchhoff C, Jezek D, Schulze W, Feig C, Primig M, et al. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. Hum Reprod 2010; 25: 1104-12.
41.Chepda T, Cadau M, Girin P, Frey J, Chamson A. Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture: effect on cell growth. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2001; 37: 26–30.
42.Osiecki M, Ghanavi P, Atkinson K, Nielsen LK, Doran MR. The ascorbic acid paradox. Biochem Biophysi Res Commun 2010; 400: 466–70.
43.Hu J, Cheng D, Gao X, Bao J, Ma X, Wang H. Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. Reprod Domest Anim 2012; 47: 873–9.
44.Solgi M, Rahimi-Feyli P, Nikousefat Z, Moghaddam A. Effect of insulin-like growth factor (IGF-1) on proliferation of lamb spermatogonia stem cells. Onl J Vet Res 2016; 20: 327-34.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]

45.Tajik P, Narenji-Sani R, Moezifar M, Yousefi MH, Movahedian M, Qasemi-Panahi B, et al. Effect of follicle-stimulating hormone and testosterone on colony formation of bovine spermatogonial stem cell. Comp Clin Path 2014; 23: 901-6.
46.Huang Y, Tang X, Xie W, Zhou Y, Li D, Zhou Y, et al. Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. Biochem Biophys Res Commun 2011; 411: 397–401.
47.Terada LS. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally,act locally. J Cell Biol 2006; 174: 615–23.
48.Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. Oncogene 2007; 26: 1101–9.
49.Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2010; 6: 71–9.
50.Moreira da Silva F, Marques A, Chaveiro A. Reactive oxygen species:a double-edged sword in reproduction. Open J Vet Med 2010; 4: 127–133.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.32]