

Evaluation of the Effect of L- arginine on Induction of Ovine Spermatogonial Stem Cells Colonization In-Vitro

Zahra Ghaderi Nazliani¹, Peyman Rahimi-Feyli^{1*}, Aliasghar Moghaddam¹, Samad Alimohammadi²

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

Received: April 13, 2022; Accepted: June 01, 2022

Abstract

Background and Aim: Spermatogonial stem cells have the ability to self-renewal and differentiation and can transmit genetic traits to the next generation. Therefore, establishing an appropriate culture medium for this cell line is important. The aim of this study was to determine the effect of different concentrations of L-arginine on sheep spermatogonial stem cells colony formation in-vitro.

Methods: An experimental study was conducted. Each treatment was replicated five times. Spermatogonial cells were isolated from prepubertal lamb's testis using two-step enzymatic digestion. The cells were cultured for ten days in six groups. In the control group, a simple culture of spermatogonial cells was performed in DMEM containing 1% antibiotics and 5% FBS. In the treatment groups 1, 2, 3, 4, and 5 different concentrations of L-arginine (50, 100, 200, 500, and 1000 $\mu\text{mol/L}$), was added to the culture medium, respectively. The culture media were changed every three days. Identification of cells was confirmed by immunocytochemical staining against PGP9.5 and PLZF antigens. Immediately after isolation, the percentage of cells viability, number, and surface area of colonies formed on the 4th, 7th, and 10th days after the culture, were assessed by an inverted microscope. Data were analyzed using one-way ANOVA test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The findings indicated that the viability rate of spermatogonial cells after isolation was $89.28 \pm 1.4\%$. Isolated cells expressed PGP9.5 and PLZF antigens. Also, on day 10 after culture and in treatment 4 (200 $\mu\text{mol/L}$ L- arginine); the number (160.8 ± 21.1) and surface area (5.4 ± 1.3) spermatogonial cells colonies had a significant increase compared to other groups ($P < 0.05$).

Conclusion: It seems that the addition of L- arginine at a dose of 200 $\mu\text{mol/L}$ has a positive effect on the induction of spermatogonial stem cells colonization and can provide an appropriate culture medium in vitro.

Keywords: Spermatogonial Stem Cells; Sheep; L-arginine; Cell Culture

Please cite this article as: Ghaderi Nazliani Z, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Evaluation of the Effect of L- arginine on Induction of Ovine Spermatogonial Stem Cells Colonization In-Vitro. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2022;46(4):15-25.

*Corresponding Author: Peyman Rahimi-Feyli; Email: peymanrahimi@razi.ac.ir

بررسی تأثیر آل- آرژنین بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه

زهرا قادری نازلیانی^۱، پیمان رحیمی فیلی^{۱*}، علی اصغر مقدم^۱، صمد علی محمدی^۲

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

۲- گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

خلاصه

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارای توانایی خودنوسازی و تمایز بوده و می‌توانند صفات ژنتیکی را به نسل بعدی منتقل کنند. بنابراین ایجاد محیط کشت مناسب برای این رده سلولی مهم است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف آل- آرژنین بر کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه بود.

روش کار: نوع مطالعه حاضر تجربی بود. پنج بار نمونه‌گیری و تکرار آزمایش انجام شد. سلول‌های اسپرماتوگونی طی دو مرحله هضم آنزیمی از بیضه بره‌های نابالغ جداسازی شدند. سلول‌ها به مدت ۱۰ روز در شش گروه آزمایشی کشت داده شدند. برای گروه کنترل، کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط DMEM حاوی یک درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS انجام شد. در گروه‌های تیمار ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نیز غلظت‌های مختلف آل- آرژنین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر) به ترتیب به محیط کشت اضافه شد. تعویض محیط‌های کشت هر سه روز یک‌بار انجام شد. ماهیت سلول‌ها با رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن‌های PGP9.5 و PLZF تأیید شد. بلافاصله پس از جداسازی، درصد زنده‌مانی سلول‌ها، تعداد و مساحت کلونی‌های تشکیل شده در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت، توسط میکروسکوپ معکوس ارزیابی شدند. داده‌ها توسط آزمون واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند. سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که میزان زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی پس از جداسازی $1/4 \pm 89/28$ درصد بود. سلول‌های استخراج‌شده آنتی‌ژن‌های PGP9.5 و PLZF را بیان کردند. همچنین در روز ۱۰ پس از کشت و در تیمار ۴ (۲۰۰ میکرومول بر لیتر آل- آرژنین)؛ تعداد ($21/1 \pm 160/8$) و مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی افزایش معناداری در مقایسه با سایر گروه‌ها داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد افزودن آل- آرژنین با دوز ۲۰۰ میکرومول بر لیتر تأثیر مثبتی بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد و می‌تواند محیط کشت مناسبی را در محیط آزمایشگاه فراهم کند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی؛ گوسفند؛ آل- آرژنین؛ کشت سلول

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Ghaderi Nazliani Z, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Evaluation of the Effect of L- arginine on Induction of Ovine Spermatogonial Stem Cells Colonization In-Vitro. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2022;46(4):15-25.

*نویسنده مسئول مکاتبات: پیمان رحیمی فیلی؛ آدرس پست الکترونیکی: peymanrahimi@razi.ac.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) سلول‌های بنیادی بافتی در بیضه هستند که برای تداوم اسپرماتوژنز و باروری جنس نر ضروری هستند (۱). SSCs در غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز قرار گرفته و دارای خواصی از قبیل خودنوسازی به‌منظور حفظ مخزن سلول‌های بنیادی و تمایز به‌منظور تولید مداوم اسپرم پس از سن بلوغ هستند (۲). درک چگونگی عملکرد SSCs برای یافتن دلیل موارد خاص ناباروری و گشودن درهای جدیدی در خصوص پژوهش در زمینه اسپرماتوژنز مهم است (۳). جمعیت کم SSCs و نبود نشانگرهای اختصاصی برای شناسایی آنها، توانایی ما را در درک بیولوژی این سلول‌ها محدود کرده است (۴ و ۵). تکثیر و غنی‌سازی SSCs در محیط کشت منبع باارزشی را برای انجماد و درمان ناباروری فراهم می‌کند (۶ و ۷). بنابراین تا کنون مطالعات مختلفی با هدف ارزیابی تأثیر عوامل مختلف و شرایط متفاوت بر القای کلونی‌زایی SSCs در انسان و سایر گونه‌های حیوانی در محیط آزمایشگاه انجام گرفته است (۸-۱۳).

ال- آرژنین (L- arginine) یک اسید آمینه ضروری در پستانداران بالغ محسوب می‌شود که برای پستانداران جوان در حال رشد نیز حیاتی است (۱۴). متابولیسم ال- آرژنین برای درک مفاهیم گسترده آن برای سلامت، بیماری و کاربردهای بالینی ضروری است. ال- آرژنین از گلوتامین، گلوتامات و پرولین از طریق محور روده-کلیه در انسان و اکثر پستانداران دیگر (از جمله گوسفند، خوک و رت) سنتز می‌شود (۱۵). ال- آرژنین به عنوان پیش‌ساز ضروری برای سنتز پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های دارای اهمیت بیولوژیکی زیاد (از جمله نیتریک اکسید، اوره، اورنیتین، پرولین، پلی‌آمین‌ها، گلوتامات و کراتین) است که نقش مهمی در سیگنالینگ سلولی و چرخه سلولی ایفا کرده و تکثیر سلولی را تحریک می‌کنند (۱۶-۱۸). ال- آرژنین از طریق عملکرد آنزیم نیتریک اکسید سنتاز به نیتریک اکسید (NO) تبدیل می‌شود. گزارش شده است که آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در سلول‌های لیدینگ و سرتولی مردان فعالیت می‌کند (۱۹ و ۲۰). بسیاری از مسیرهای متابولیکی که برای

تولید مثل، رشد و سلامتی مهم هستند، توسط ال- آرژنین تنظیم می‌شوند (۱۵). تا کنون مطالعات زیادی با هدف ارزیابی تأثیر تأثیر ال- آرژنین بر رده‌های مختلف سلولی از قبیل سلول‌های آندومتر انسان (۲۱)، فیبروپلاست‌ها (۲۲) و آدیپوسیت‌ها (۲۳) انجام شده است. نتایج مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که ال- آرژنین نقش مهمی در افزایش تکثیر و نیز میزان زنده‌ماندن این سلول‌ها داشته و سبب مهار آپاپتوز سلول‌ها می‌شود.

در مورد کشت و تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و تأثیر ال- آرژنین اطلاعات بسیار محدودی در دسترس است و تاکنون در مورد تأثیر ال- آرژنین بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و بخصوص گونه دامی گوسفند با توجه به اهمیت آن در تولید داروهای نو ترکیب پزشکی، تولید حیوانات تراریخته و حیوانات مدل مطالعه‌ای انجام نشده است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ال- آرژنین بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه است. مطالعه حاضر در باره زمانی تیر ماه تا شهریور ماه سال ۱۳۹۹ انجام شد. نمونه‌گیری از کشتارگاه صنعتی بیستون و کشت سلول‌ها نیز در آزمایشگاه مرکزی کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام گرفت.

روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی: مطالعه حاضر تجربی است. برای انجام این مطالعه، نمونه‌های بیضه بره‌های نابالغ با سن ۳-۲ ماهه از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان کرمانشاه تهیه شد. بیضه‌ها در کنار یخ و در کمتر از دو ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی منتقل شدند. باید خاطر نشان کرد که در این مطالعه موازین اخلاقی کار با حیوانات که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی است (IR.RAZI.REC.1399.048)، هنگام کار با حیوانات رعایت شد. در آزمایشگاه، بیضه از اسکروتوم خارج و متعاقب جدا کردن اپیدیدیم با استفاده از پنس و تیغ جراحی استریل، چند بار توسط الکل ۷۰ درصد و تنتورید شست‌وشو داده شد. سپس ۱۰

میلی‌لیتر) و دزوکسی‌ریبونوکلاز (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به نمونه‌ها اضافه و پتری دیش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. شایان ذکر است که برای جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقی‌مانده، لوله‌های فالدون به مدت پنج دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفیوژ شدند. برای توقف هضم آنزیمی از محلول FBS (Sigma, USA) استفاده شد. تعلیق حاصل حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و میوئید بود. در مرحله بعد برای حذف سلول‌های میوئید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی استریل (Sartorius, Germany) با اندازه ۵۵ میکرومتر عبور داده شد. در تعلیق حاصل که سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی شناور بودند، پس از سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه با دور ۸۰۰ سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شدند. در نهایت، این سلول‌ها برای کشت استفاده شدند.

در مطالعه حاضر، ارزیابی درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از جداسازی توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد (UK, Trypan blue) و میکروسکوپ نوری انجام گرفت. برای این منظور، تعلیق سلولی با تریپان بلو ۰/۴ درصد به نسبت ۱:۱ مخلوط شد. سپس با شمارش ۱۰۰ سلول به‌طور تصادفی و با استفاده از هموسیتمتر، تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین و درصد زنده‌مانی محاسبه شد.

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:

به‌منظور کشت، سلول‌های درون لوله فالدون به پلیت کشت (TPP, Switzerland) منتقل شدند. هر پلیت حاوی شش‌گوده است که گوده یک به‌عنوان گروه کنترل و گوده‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به‌ترتیب برای تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ اختصاص یافت. ۱۰۰۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی (حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی) به محیط کشت DMEM حاوی یک درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS به داخل هر یک از گوده‌ها ریخته شد. سپس ال-آرژنین (Merck, Germany) به گوده‌ها اضافه شد. گروه‌بندی تیمارهای مختلف استفاده شده در آزمایش در جدول ۱ ذکر شده است.

گرم از بافت پارانیشیم بیضه با استفاده از قیچی استریل جدا و به داخل لوله فالدون (SPL, South Korea) منتقل شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Bio-Idea, Iran) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Paisley, UK, Gibco) به آن اضافه شد. هر کدام از لوله‌ها سه نوبت و هر بار به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettach, Germany) شدند. برای جداسازی و استخراج سلول‌های لوله‌های منی‌ساز از بافت پارانیشیم بیضه، از روش van Pelt و همکاران (۲۴) و Zandi و همکاران (۲۵) استفاده شد. برای هضم مکانیکی، بافت پارانیشیم بیضه پس از شست‌وشو به داخل پتری دیش منتقل و توسط پنس و قیچی استریل به طور کامل قطعه‌قطعه شد. در ادامه وارد مرحله هضم آنزیمی شد. در مرحله اول هضم آنزیمی، غلظت‌های یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، هیالورونیداز تیپ ۲ و تریپسین (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) به پتری دیش‌های حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه اضافه شد و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شدند. برای افزایش بازدهی تأثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانیشیم بیضه، هر ۱۰ دقیقه یک بار عمل پیپتاژ انجام شد. همچنین برای ارزیابی هضم آنزیمی و روند بازشدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، هر ۱۰ دقیقه یک بار بافت پارانیشیم بیضه توسط میکروسکوپ معکوس (IX71[®] inverted microscope, Olympus) بررسی شد. برای حذف بافت‌های هضم‌شده حاصل از جداسازی لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، محتویات هریک از پتری دیش‌ها به داخل لوله‌های فالدون منتقل شد و به مدت دو دقیقه با دور ۱۴۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محتویات زیر لوله‌های فالدون که حاوی لوله‌های منی‌ساز بود، برداشته شد و به داخل پتری دیش‌های استریل منتقل و وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شد. در این مرحله برای هضم لوله‌های منی‌ساز و آزادسازی سلول‌های موجود در آنها، آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (یک میلی‌گرم بر

جدول ۱- گروه‌بندی تیمارهای مختلف استفاده شده در آزمایش

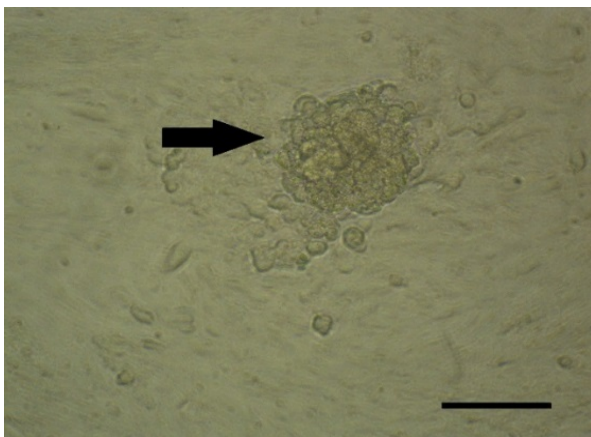
گوده شماره ۱ (گروه کنترل)	محیط کشت DMEM بدون افزودن ال-آرژنین
گوده شماره ۲ (گروه تیمار ۱)	محیط کشت DMEM حاوی ال-آرژنین با غلظت ۵۰ میکرومول بر لیتر
گوده شماره ۳ (گروه تیمار ۲)	محیط کشت DMEM حاوی ال-آرژنین با غلظت ۱۰۰ میکرومول بر لیتر
گوده شماره ۴ (گروه تیمار ۳)	محیط کشت DMEM حاوی ال-آرژنین با غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر
گوده شماره ۵ (گروه تیمار ۴)	محیط کشت DMEM حاوی ال-آرژنین با غلظت ۵۰۰ میکرومول بر لیتر
گوده شماره ۶ (گروه تیمار ۵)	محیط کشت DMEM حاوی ال-آرژنین با غلظت ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر

پنج دقیقه)، مقطع به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق در معرض آنتی‌بادی ثانویه (biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna Research Institute, Iran) قرار گرفت و دوباره با TBS/BSA شست‌وشو شد. در ادامه مقطع به مدت ۳۰ دقیقه در تماس با HPR- conjugted streptavidin (Biosource, USA) با رقت ۱:۲۵۰ قرار داده شد و با TBS/BSA شست‌وشو شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی آمینو بنزیدین (Roche, Germany) به مقطع به مدت ۱۰ دقیقه، رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید به طور کامل در آب مقطر تمیز شد و دوباره با هریس هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی و دوباره با آب مقطر شست‌وشو داده شد. در ادامه، اسلاید با الکل آبگیری و با گزلبول شفاف و با انتنال (Merck, Germany) پوشانده و زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

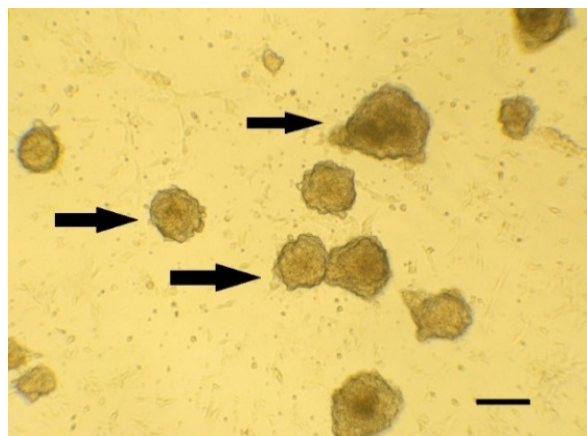
برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از نشانگر PLZF از روش Somashekar و همکاران (۲۸) به شرح زیر استفاده شد: ابتدا سلول‌ها بر روی لام‌های شیشه‌ای شفاف پوشیده شده با پلی-ال-لیزین آغشته شدند. سپس اسمیر با پارافرمالدهید چهار درصد به مدت ۱۰ دقیقه ثابت شده و با TBST (TBS با ۰/۰۵ درصد Tween 20) شست‌وشو داده شد. سپس لام‌ها در تریتون ایکس (Triton-X) ۰/۰۱ درصد انکوبه شدند و با TBS شست‌وشو داده شدند. به منظور بازیابی آنتی‌ژن، لام‌ها در TBS حاوی ۰/۶ درصد پراکسید هیدروژن (H₂O₂) به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با محلول سه درصد BSA در TBST و در دمای اتاق و به مدت ۳۰ دقیقه بلوکه شدند. اسمیرها به مدت یک‌شب با آنتی‌بادی اولیه (rabbit polyclonal IgG: PLZF, 1:100 dilution, sc-22839, Santa Cruz

در نهایت، پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن پنج درصد قرار داده شده و به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند. تعویض محیط‌های کشت هر سه روز یک‌بار انجام شد. برای ارزیابی تعداد و مساحت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی چشمی مدرج استفاده شد. برای محاسبه مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر حسب میلی‌متر مربع از نرم‌افزار Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) استفاده شد. شایان ذکر است که انتخاب دوزهای ال-آرژنین در این مطالعه برای ارزیابی روند کلونی‌زایی براساس مطالعات قبلی انجام گرفت (۲۳).

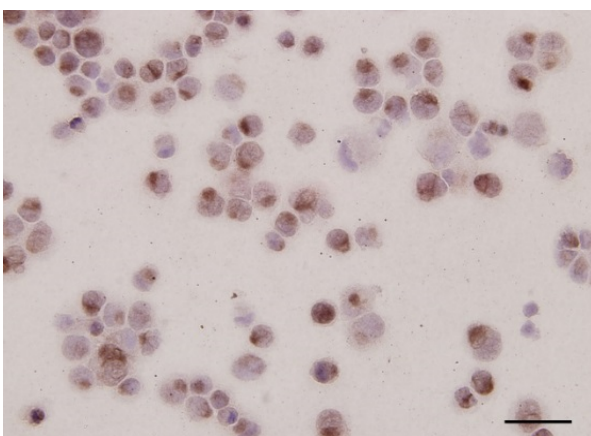
شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن‌های PGP9.5 و PLZF: برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 از روش Heidari و همکاران (۲۶) همچنین Rodriguez-Sosa و همکاران (۲۷) به شرح زیر استفاده شد: پس از ۱۰ روز کشت، سلول‌ها در گروه کنترل و گروه‌های تیمار تریپسینه شدند. بلوک کردن اولین مکان غیراختصاصی به وسیله avidin / biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قراردادن اسلاید در PBS حاوی پنج درصد سرم گوسفند به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش علیه نشانگر PGP9.5 (Dako, Carpinteria, CA, USA) با رقت ۱:۴۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از سه بار شست‌وشو با PBS (هر بار



شکل ۱- کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روز ۷ پس از کشت (نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)



شکل ۲- کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روز ۱۰ پس از کشت (نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)



شکل ۳- رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی علیه آنتی‌ژن PGP9.5. سیتوپلاسم سلول‌های اسپرماتوگونی به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شوند. (نوار مقیاس: ۵۰ میکرومتر).

انکوباسیون، لام‌ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با TBST شست‌وشو داده شدند و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti-rabbit IgG- HRP, GeNei, India) انکوبه شدند. به‌منظور گسترش رنگ قهوه‌ای لام‌ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با TBST شست‌وشو داده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با سوبسترا DAB انکوبه شدند. برای گروه‌های کنترل منفی، اسمیرها بدون آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند. سلول‌ها با همتاکسیلین رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus, Japan) ارزیابی شدند.

روش تجزیه و تحلیل آماری:

نتایج حاصل از پنج بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری‌شده از نظر نرمال بودن ارزیابی شدند. مقایسه میانگین تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف و روزهای متفاوت کشت با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون تکمیلی Tukey در نرم‌افزار Minitab 16 و در سطح معناداری ($P < 0.05$) انجام شد.

یافته‌ها

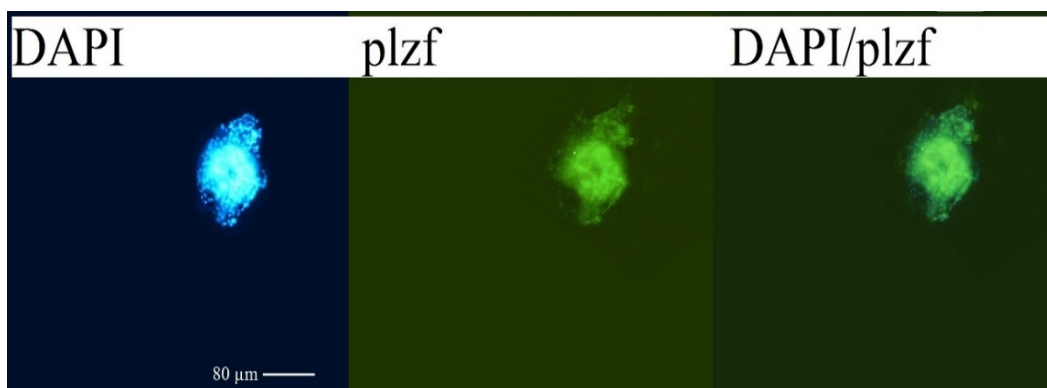
میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:

در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلافاصله پس از جداسازی $28/4 \pm 89/1$ درصد بود.

تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و بیان

نشانگر سطح سلول‌ها:

با گذشت زمان، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موجود در داخل پلیت، کلونی تشکیل دادند و با رشد آنها بر تعداد و اندازه کلونی‌ها افزوده شد. در شکل‌های ۱ و ۲، کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای ۷ و ۱۰ پس از کشت نشان داده شده است. پس از پایان دوره کشت، سلول‌های استخراج‌شده آنتی‌ژن‌های PGP9.5 و PLZF را بیان کردند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۴- رنگ آمیزی / ایمونو فلورسنت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی علیه آنتی‌ژن PLZF. هسته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ آمیزی DAPI مشخص شده است (نوار مقیاس: ۸۰ میکرومتر).

تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:

در جدول ۲ تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای مختلف کشت (ردیف) و در تیمارهای مختلف (ستون) مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت و در تیمارهای مختلف اختلاف معناداری دارند ($P < 0.05$). علاوه بر این، بیشترین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۱۰ پس از کشت و در تیمار ۴ (۲۰۰ میکرومول بر لیتر آل-آرژنین) ($160/8 \pm 21/1$) بوده و کمترین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۴ پس از کشت و در گروه کنترل ($51/7 \pm 9/8$) است ($P < 0.05$).

(ستون) مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت و در تیمارهای مختلف اختلاف معناداری دارند ($P < 0.05$). علاوه بر این، بیشترین مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۱۰ پس از کشت و در تیمار ۴ (۲۰۰ میکرومول بر لیتر آل-آرژنین) ($5/4 \pm 1/3$) بوده و کمترین مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۴ پس از کشت و در گروه کنترل ($0/6 \pm 0/3$) است ($P < 0.05$).

جدول ۲- میزان کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف آزمایشی و در روزهای متفاوت پس از کشت

گروه	روز		
	۱۰	۷	۴
۱	$79/0 \pm 9/8^b$	$71/5 \pm 11/0^b$	$51/7 \pm 9/8^a$
۲	$97/0 \pm 26/8^b$	$106/0 \pm 13/3^{ab}$	$79/3 \pm 14/9^a$
۳	$92/8 \pm 22/0^b$	$66/5 \pm 13/7^b$	$83/3 \pm 21/3^a$
۴	$160/8 \pm 21/1^a$	$139/5 \pm 25/8^a$	$97/8 \pm 29/8^a$
۵	$90/5 \pm 27/2^b$	$102/0 \pm 22/6^{ab}$	$82/0 \pm 18/4^a$
۶	$95/8 \pm 14/2^b$	$90/0 \pm 20/1^{ab}$	$64/3 \pm 11/3^a$

مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:

در جدول ۳ مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای مختلف کشت (ردیف) و در تیمارهای مختلف

جدول ۳- مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (mm^2) در گروه‌های مختلف آزمایشی و در روزهای متفاوت پس از کشت

گروه	روز		
	۱۰	۷	۴
۱	$1/1 \pm 0/3^b$	$1/07 \pm 0/1^b$	$0/6 \pm 0/03^b$
۲	$2/01 \pm 0/4^b$	$1/9 \pm 0/2^b$	$1/3 \pm 0/3^{ab}$
۳	$1/9 \pm 0/6^b$	$1/2 \pm 0/4^b$	$1/6 \pm 0/6^{ab}$
۴	$5/4 \pm 1/3^a$	$4/2 \pm 1/2^a$	$2/8 \pm 1/02^a$
۵	$2/2 \pm 0/6^b$	$2/01 \pm 0/4^b$	$1/2 \pm 0/2^{ab}$
۶	$2/7 \pm 0/5^b$	$1/9 \pm 0/2^b$	$0/9 \pm 0/3^b$

بحث

انجام تحقیقات آزمایشگاهی بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حیوانات اهلی، امکان استفاده از آنها برای حفظ باروری، اصلاح نژاد و تولید حیوانات تراریخته را فراهم آورده است (۲۹). انتخاب یک مدل حیوانی مناسب در دستیابی به

وابسته به دوز بود، به این صورت که پارامترهای مذکور در گروه‌های دریافت‌کننده آل-آرژنین با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر افزایش پیدا کرد که بهترین تأثیر در غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر آل-آرژنین مشاهده شد. اما افزایش غلظت آل-آرژنین نقش مثبتی در تکثیر کلونی‌های کشت شده نداشت و در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر آل-آرژنین تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی روند کاهشی داشت.

آل-آرژنین به عنوان یک اسید آمینه ضروری در پستانداران بالغ و پستانداران جوان در حال رشد است که نقش مهمی در رشد بافت و بقای آن دارد (۱۴ و ۳۸). شواهد ارزشمندی نشان می‌دهند که آل-آرژنین نقش مهمی در تولید مثل، رشد در دوران جنینی و پس از تولد، بهبود زخم، عملکرد سیستم ایمنی، یکپارچگی بافت و همچنین پیشگیری و درمان بیماری‌ها ایفا می‌کند (۱۵ و ۳۹). تا کنون مطالعات متعددی در خصوص تأثیر آل-آرژنین بر رده‌های مختلف سلولی انجام گرفته است. برای نمونه؛ مطالعه Greene و همکاران نشان داد آل-آرژنین در محیط کشت در غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر از آپاپتوز به‌واسطه میتوکندری در سلول‌های رده RL95-2 آندومتر جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، آل-آرژنین به‌واسطه مکانیسم‌های بیوسنتز نیتریک اکسید و پلی‌آمین، سبب افزایش تکثیر سلول‌های رده RL95-2 آندومتر می‌شود که هر دو تأثیر مثبت در تکثیر سلولی دارند (۲۱).

Ma و همکاران به بررسی اثرات غلظت‌های مختلف آل-آرژنین بر روی سنتز پروتئین و رشد سلول‌های پیش‌ساز چربی قهوه‌ای در بره‌های جنین پرداختند. آنها گزارش کردند که افزایش غلظت آل-آرژنین از ۵۰ به ۲۰۰ میکرومول بر لیتر به روش وابسته به دوز و معنادار سبب افزایش سنتز پروتئین، مهار پروتئولیز و رشد سلول‌ها می‌شود که این عمل را از طریق فعال کردن پروتئین کیناز و فسفریله‌شدن پروتئین‌ها و نیز تحریک بیشتر مسیر سیگنالینگ سلولی mTOR انجام می‌دهد در حالی که آل-آرژنین در غلظت‌های ۲۰۰-۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر تکثیر سلولی را مهار کرد. این یافته‌ها نشان دادند که آل-آرژنین در

اهداف هر مطالعه‌ای که هدف آن گسترش یا تعمیم نتایج برای پیش‌بینی نتایج بالقوه در انسان یا هر گونه دیگری است، حایز اهمیت است (۳۰). گوسفند از گونه‌های با ارزش دام است که برای تولید گوشت، شیر و سایر فرآورده‌های جانبی پرورش یافته است. گوسفند به دلیل جثه مناسب، دوره بارداری کوتاه و ترشح فراوان شیر، به الگوی مهمی در تحقیقات کشاورزی، دارویی و زیست پزشکی تبدیل شده است. تاکنون مطالعات زیادی در خصوص افزودن فاکتورهای مختلف به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان، جوندگان و دام‌های مختلف انجام شده است، ولی این مطالعات در مورد گوسفند در مقایسه با سایر حیوانات بسیار کمتر است (۳۱).

در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلافاصله بعد از جداسازی $28/4 \pm 89/1$ درصد بود که با نتایج مطالعات قبلی انجام‌شده از نظر درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گاو (۳۲)، گوسفند (۲۵)، بز (۱۳) و موش (۳۳) همخوانی دارد که بیانگر روش درست جداسازی و کنترل صحیح فرآیند و نیز انتخاب دوز مناسب آنزیم‌های مورد استفاده است. در این پژوهش به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن‌های PGP9.5 و PLZF استفاده و مشاهده شد که سلول‌های جدا شده از بیضه این نشانگرها را بیان کردند. بنابراین می‌توان از این نشانگرها برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی در گوسفند بهره برد. در چندین مطالعه نیز از این نشانگرها جهت شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف از جمله انسان (۳۴)، موش (۳۵)، گاو (۳۶)، گوسفند (۳۷)، بز (۲۶) استفاده شده است.

همچنین در مطالعه حاضر، تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تمام گروه‌های آزمایشی با گذشت زمان و افزایش طول مدت کشت از روز ۴ تا روز ۱۰ افزایش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل عملکرد مناسب محیط کشت انتخابی و شرایط آزمایشگاه در طی مدت کشت باشد. از یافته‌های دیگر مطالعه حاضر این بود که تأثیر آل-آرژنین بر تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اثر آل-آرژنین در تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وابسته به دوز بود. به نظر می‌رسد افزودن آل-آرژنین با دوز ۲۰۰ میکرومول بر لیتر تاثیر مثبتی بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد و می‌تواند محیط کشت مناسبی را در محیط آزمایشگاه فراهم کند. اثر وابسته به دوز آل-آرژنین بر افزایش یا کاهش تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی احتمالاً می‌تواند از طریق مکانیسم‌های ذکر شده واسطه‌گری شود که به تفصیل مورد بحث قرار گرفت. در این راستا، انجام مطالعات بیشتر برای آشکارسازی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراج شده از پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه رازی است. به این‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه رازی (به دلیل حمایت‌های مالی) تشکر و قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه موازین اخلاقی کار با حیوانات که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی است (IR.RAZI.REC.1399.048)، هنگام کار با حیوانات رعایت شد.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر برای رشد و توسعه حداکثری سلول‌ها حیاتی است (۲۳). یکی از مهم‌ترین عللی که در خصوص اثر کاهش آل-آرژنین در محیط کشت بیان شده این است که افزایش غلظت آل-آرژنین به بالاتر از ۲۰۰ میکرومول بر لیتر منجر به کاهش فراوانی پروتئین‌های فسفریله به روشی وابسته به دوز می‌شود. این نتایج با یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر از نظر تأثیر غلظت‌های آل-آرژنین بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مطابقت دارد.

در این راستا، نتایج یافته‌های Kim و همکاران نشان داد که آل-آرژنین می‌تواند هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های تروفکتودرم گوسفند را تحریک کند. علاوه بر این، آل-آرژنین تولید نیتریک اکسید و پلی‌آمین‌ها را افزایش می‌دهد و مسیر سیگنالینگ mTOR را برای تحریک تکثیر سلول‌های تروفکتودرم گوسفند فعال می‌کند (۱۷). در مطالعه Zhang و همکاران مشاهده شد که آل-آرژنین نقش محافظتی داشته و می‌تواند آپاپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو را در سلول‌های اپی‌تلیال روده گوسفند کاهش دهد که این عمل را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش بیان Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax, Fas و Bcl-2 انجام می‌دهد و در نتیجه سبب افزایش زنده‌مانی سلول‌های اپی‌تلیال می‌شود (۴۰). همچنین، در مطالعه دیگری تحریک سنتز پروتئین عضله در میوبلاست‌های تمایز یافته C2C12 موش در شرایط آزمایشگاهی در گروه درمانی با آل-آرژنین گزارش شد. نتایج نشان دادند که آل-آرژنین از طریق مسیر سیگنالینگ mTOR / p70S6K (Thr 2446) به روشی وابسته به نیتریک اکسید با تنظیم رشد عضلانی مرتبط است (۴۱).

از جمله محدودیت‌های استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) می‌توان تعداد بسیار کم این سلول‌ها در بیضه، نبود مارکرهای بیوشیمیایی اختصاصی برای شناسایی این سلول‌ها، محدود بودن تقسیمات این سلول‌ها و نبود تمایز بین سلول‌های بنیادی و تمایز یافته در بیضه و سختی در جداسازی و کنترل مراحل کشت این سلول‌ها را ذکر کرد (۴۲ و ۴۳).

References

- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1546):1663-78.
- De Rooij DG. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development.* 2017;144(17):3022-30.
- De Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2000;21(6):776-98.
- Tagelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F₁ hybrid mouse. *Mutat Res.* 1993;290(2):193-200.
- Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(24):11303-7.
- Lopes F, Tholeti P, Adiga SK, Anderson RA, Mitchell RT, Spears N. Chemotherapy induced damage to spermatogonial stem cells in prepubertal mouse in vitro impairs long-term spermatogenesis. *Toxicol Rep.* 2021;8:114-23.
- Ahmadi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA, Alimohammadi S. Assessment of the cryoprotective effects of fetal bovine serum (FBS) and trehalose on the viability rate of caprine spermatogonial stem cells (SSCs). *Feyz.* 2021;25(1):714-23. (Full Text in Persian).
- Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction.* 2008;136(5):543-57.
- Hamra FK, Richie CT, Harvey BK. Long Evans rat spermatogonial lines are effective germline vectors for transgenic rat production. *Transgenic Res.* 2017;26(4):477-89.
- Oatley MJ, Kaucher AV, Yang QE, Waqas MS, Oatley JM. Conditions for long-term culture of cattle undifferentiated spermatogonia. *Biol Reprod.* 2016;95(1):1-10.
- Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *Jama.* 2009;302(19):2127-34.
- Jamshidi-Seykevandi H, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. Effect of different concentrations of melatonin on SSCs colony formation (In vitro). *Research in Medicine.* 2020;44(4):580-86. (Full Text in Persian).
- Kadivarian H, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Evaluation of the Effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) on Survival and Colonization of Caprine Spermatogonial Stem Cells during in Vitro Culture. *Qom Univ Med Sci J.* 2020;13(12):1-12. (Full Text in Persian).
- Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(9):427-38.
- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids.* 2009;37(1):153-68.
- Hu X, Washington S, Verderame MF, Manni A. Interaction between polyamines and the mitogen-activated protein kinase pathway in the regulation of cell cycle variables in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):11026-33.
- Kim JY, Burghardt RC, Wu G, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VIII. Arginine stimulates proliferation of ovine trophoblast cells through MTOR-RPS6K-RPS6 signaling cascade and synthesis of nitric oxide and polyamines. *Biol Reprod.* 2011;84(1):70-8.
- Zheng M, Ekmekcioglu S, Walch ET, Tang CH, Grimm EA. Inhibition of nuclear factor- κ B and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. *Melanoma Res.* 2004;14(3):165-71.
- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF. Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol.* 1995;58(1):17-30.
- Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod.* 1996;55(5):935-41.
- Greene JM, Feugang JM, Pfeiffer KE, Stokes JV, Bowers SD, Ryan PL. L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11(1):1-11.
- Fujiwara T, Kanazawa S, Ichibori R, Tanigawa T, Magome T, Shingaki K, et al. L-arginine stimulates

- fibroblast proliferation through the GPRC6A-ERK1/2 and PI3K/Akt pathway. *Plos one*. 2014;9(3):e92168.
23. Ma X, Han M, Li D, Hu S, Gilbreath KR, Bazer FW, et al. L-Arginine promotes protein synthesis and cell growth in brown adipocyte precursor cells via the mTOR signal pathway. *Amino Acids*. 2017;49(5):957-64.
 24. 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.
 25. Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA, Nikousefat Z. Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro. *Feyz*. 2016;20(3):205-13. (Full Text in Persian).
 26. Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Shirazi A, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(10):1029-38.
 27. Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*. 2006;66(9):2091-103.
 28. Somashekar L, Selvaraju S, Parthipan S, Patil SK, Binsila BK, Venkataswamy MM, et al. Comparative sperm protein profiling in bulls differing in fertility and identification of phosphatidylethanolamine-binding protein 4, a potential fertility marker. *Andrology*. 2017;5(5):1032-51.
 29. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2015;7(4):669-80.
 30. Ibtisham F, Awang-Junaidi AH, Honaramooz A. The study and manipulation of spermatogonial stem cells using animal models. *Cell Tissue Res*. 2020;380(2):393-414.
 31. Kalds P, Zhou S, Cai B, Liu J, Wang Y, Petersen B, et al. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. *Front Genet*. 2019;10:750.
 32. Tajik P, Narenji Sani R, Moezifar M, Yousefi MH, Movahedin M, Qasemi-Panahi B, et al. Effect of follicle-stimulating hormone and testosterone on colony formation of bovine spermatogonial stem cell. *Comp Clin Path*. 2013;23(4):901-6.
 33. Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4563-76.
 34. 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(5):1104-12.
 35. 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(4):333-41.
 36. Giassetti MI, Goissis MD, Moreira PV, de Barros FR, Assumpção ME, Visintin JA. Effect of age on expression of spermatogonial markers in bovine testis and isolated cells. *Anim Reprod Sci*. 2016;170:68-74.
 37. Binsila KB, Selvaraju S, Ghosh SK, Parthipan S, Archana SS, Arangasamy A, et al. Isolation and enrichment of putative spermatogonial stem cells from ram (*Ovis aries*) testis. *Anim Reprod Sci*. 2018;196:9-18.
 38. Seifter E, Rettura G, Barbul A, Levenson SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery*. 1978;84(2):224-30.
 39. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*. 2004;134(9):2169-72.
 40. Zhang H, Peng A, Yu Y, Guo S, Wang M, Wang H. L-arginine protects ovine intestinal epithelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis through alleviating oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 2019;67(6):1683-90.
 41. Wang R, Jiao H, Zhao J, Wang X, Lin H. L-arginine enhances protein synthesis by phosphorylating mtor (thr 2446) in a nitric oxide-dependent manner in C2C12 cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
 42. Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells*. 2007;25(9):2330-8.
 43. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res Part C: Embryo Today: Reviews*. 2009;87(1):27-34.