Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2025; Vol. 48; No. 4

The Effect of L-Arginine on Growth of Frozen- Thawed Caprine Spermatogonial Stem Cells in Short- Term Culture

Fatemeh Najafi[1], Peyman Rahimi-Feyli[1*], Ali-Aasghar Moghaddam[1], Tayebe Mohammadi[2]

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

Received: May 25, 2024; Accepted: December 23, 2025

Abstract

Background and Aim: Developing culture and cryopreservation methods for spermatogonial stem cells (SSCs) is essential for genetic studies, regenerative medicine, transgenic animal production and recombinant drug development. Establishing an optimal culture system for these cells is crucial. This study aimed to investigate the in vitro effects of different concentrations of L-arginine on the proliferation of frozen-thawed caprine SSCs.

Methods: This experimental study was repeated five times. Isolated spermatogonial cells were frozen- thawed and cultured in six groups with a basal culture medium (DMEM containing 1% antibiotics and 5% FBS) supplemented with different concentrations of L-arginine (0, 50, 100, 200, 500 and 1000 µmol/L). All experimental groups were cultured for 10 days. The number and surface area of colonies formed were assessed on days 4, 7, and 10. Expression of spermatogonial genes (*ID4, BCL6, PGP9.5, VASA, PLZF and OCT4*) was determined by RT-PCR.

Results: The viability rates of fresh cells before and after the addition of a cryoprotectant agent were 87.14 ± 2.6% and 80.72 ± 1.21%, respectively, which decreased to 65.38 ± 1.26% after thawing. The number and surface area of spermatogonial colonies in the fourth treatment group (200 µmol/L L-arginine) were significantly higher compared to other experimental groups ($P < 0.05$). Finally, the isolated cells expressed SSC surface markers.

Conclusion: The addition of 200 µmol/L L-arginine likely enhances the colonization of frozen-thawed goat SSCs in short- term culture.

Keywords: spermatogonia stem cells; cryopreservation; cell Culture; caprine; L- Arginine

Please cite this article as: Najafi F, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Mohammadi T. The Effect of L-Arginine on Growth of Frozen- Thawed Caprine Spermatogonial Stem Cells in Short- Term Culture. Pejouhesh dar Pezeshki. 2025;48(4):14-25.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

*Corresponding Author: Peyman Rahimi-Feyli; **Email:** peymanrahimi@razi.ac.ir
Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicin, Razi University, Kermanshah, Iran.

فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۴، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۱۴ تا ۲۵

ارزیابی آثار غلظت‌های مختلف ال- آرژنین بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد- ذوب‌شده بز در کشت کوتاه‌مدت

فاطمه نجفی[۱]، پیمان رحیمی فیلی[۱*]، علی‌اصغر مقدم[۱]، طیبه محمدی[۲]

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۳

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت توسعه روش‌های کشت و انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به عنوان اساس مطالعه‌های ژنتیکی، طب بازساختی، طراحی حیوانات تراریخته و داروهای نوترکیب، تلاش برای ایجاد یک سیستم کشت مناسب اهمیت فراوانی دارد. هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی آثار غلظت‌های مختلف اسیدآمینه ال- آرژنین بر تکثیر اسپرماتوگونی‌های منجمد- ذوب شده بز در شرایط آزمایشگاه است.

روش کار: مطالعه حاضر تجربی است و پنج بار تکرار انجام شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از روش هضم آنزیمی دو مرحله‌ای از بیضه‌های بزغاله‌های نابالغ استخراج و با حذف تمایزی تخلیص شد. پس از انجماد- یخ‌گشایی در یک دوره کشت ۱۰ روزه در شش گروه آزمایشی شامل گروه شاهد (کشت سلول‌ها در محیط پایه DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد سرم جنینی گاو) و تیمارهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب شامل محیط پایه به اضافه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر ال- آرژنین، کشت داده شدند. تعداد و مساحت کلونی‌های تشکیل شده در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ بررسی شد. داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی در سطح ۵ درصد با نرم‌افزار آماری Minitab 16 آنالیز شدند. برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی از آزمون RT- PCR نشانگرهای ID4، BCL6، PGP9.5، PLZF، VASA و OCT-4 استفاده شد.

یافته‌ها: درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی و افزودن محلول انجماد به ترتیب ۲/۶ ± ۸۷/۱۴ و ۱/۲۱ ± ۸۰/۷۲ بود که پس از یخ‌گشایی به ۱/۲۶ ± ۶۵/۳۸ رسید ($P < ۰/۰۵$). تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی تشکیل شده در تیمار چهار (غلظت ۲۰۰ میکرومول ال- آرژنین) با دیگر گروه‌های آزمایشی از نظر آماری تفاوت معناداری داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین سلول‌های جدا شده نشانگرهای سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی را بیان کردند.

نتیجه‌گیری: احتمالاً افزودن غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر ال- آرژنین به محیط کشت آثار مطلوبی بر القای کلونی‌زایی سلول‌های منجمد- ذوب‌شده اسپرماتوگونی بز به صورت کشت کوتاه‌مدت و در شرایط آزمایشگاهی دارد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی اسپرماتوگونی؛ انجماد؛ کشت سلول؛ ال- آرژنین؛ بز

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Najafi F, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Mohammadi T. The Effect of L-Arginine on Growth of Frozen- Thawed Caprine Spermatogonial Stem Cells in Short- Term Culture. Pejouhesh dar Pezeshki. 2025;48(4):14-25.

*نویسنده مسئول مکاتبات: پیمان رحیمی فیلی؛ آدرس پست الکترونیکی: peymanrahimi@razi.ac.ir
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

CC BY NC

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به سبب قابلیت همزمان خودنوزایی و تمایز، تداوم اسپرماتوژنز را در طول عمر فرد ممکن می‌سازند (۱). این سلول‌ها توانایی منحصر به فردی دارند چراکه تنها سلول بنیادی بالغ در بدن است که با تقسیم خود می‌تواند ژن‌ها را به سلول‌های نتاج منتقل کند. درنتیجه این سلول‌ها، منبع ارزشمند برای آزمایش‌های بیولوژیکی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری دامی و اصلاح ژنتیکی از طریق دستورزی سلول زایای نر است (۴-۲). به دلیل کم تعداد بودن جمعیت این سلول‌ها در میان باقی سلول‌های بیضه‌ها و همچنین فقدان روش‌های شناسایی بیوشیمیایی، سرولوژیکی و ریخت‌شناسی کارآمد، این سلول‌ها فقط بر اساس عملکردشان قابل شناسایی هستند که این موضوع سبب دشواری مطالعه آنها می‌شود (۵). کشت و انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه اهمیت زیادی در مطالعه‌های زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی، مهندسی ژنتیک و ناباروری دارد. بنابراین فراهم کردن شرایط مناسب کشت برای تکثیر بهینه آنها در محیط آزمایشگاه ضروری است (۴). برای مطالعه خواص بیوشیمیایی و کلونی‌زایی SSCs، باید جمعیت‌های کافی و بزرگی از این سلول‌ها در دسترس باشد. تلاش‌های زیادی برای رسیدن به این امر مهم انجام شده است (۶). انجماد یکی از بهترین روش‌های نگهداری از این سلول‌ها به صورت طولانی مدت در شرایط آزمایشگاه است. انجماد و پیوند یکی از جدیدترین راهکارهای بازیابی باروری در بیماران تحت رادیوتراپی یا شیمی درمانی است. انجماد به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) که امری اجتناب‌ناپذیر است احتمالاً آثار سوء بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌جای می‌گذارد از این رو نقش موادی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان محافظ این سلول‌ها اهمیت پیدا می‌کند (۷، ۸). آرژنین در بیماران مبتلا به آسیب‌های کبدی از طریق افزایش بیان ژن Bcl-2 و نیز تولید نیتریک اکساید، به عنوان یک عامل ضد نکروز و آپوپتوز عمل می‌کند (۹). بر اساس نتایج حاصل از مطالعه‌هایی که روی اثر آرژنین بر رشد رده‌های سلول‌های توموری مختلف در محیط آزمایشگاه انجام شده است، آرژنین برای رشد این رده‌های سلولی کاملا ضروری است و استفاده از آنزیم‌هایی مانند آرژنین دآمیناز، با مصرف ذخیره آرژنین سبب توقف رشد این سلول‌ها در محیط کشت می‌شوند (۱۰). در مطالعه‌هایی که روی نقش آنزیم آرژنین دآمیناز بر روی رشد سلول‌های مختلف در محیط کشت انجام شده است، مشخص شد این آنزیم در غلظت‌های پایین سبب توقف تقسیم سلولی در مرحله G1 یا S می‌شود. همچنین غلظت‌های بالای این آنزیم با القای آپوپتوز، سبب مهار رشد سلول‌ها می‌شود (۱۰، ۱۱). بر اساس یافته‌های حاصل از یک مطالعه برون‌تنی روی اثر آرژنین در تحریک تکثیر سلولی و پیشگیری از مرگ سلولی القا شده توسط لیپو پلی‌ساکاریدها، اضافه کردن غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۵۰ میکرومول آرژنین به محیط کشت DMEM سبب محافظت از سلول‌های روده‌ای خوک در برابر مرگ القا شده توسط لیپوپلی‌ساکاریدها می‌شود (۱۲). بر اساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش Green و همکاران، اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرومول بر لیترآرژنین به محیط کشت سلول‌های اندومتریال RL95-2 سبب کاهش آپوپتوز القا شده ناشی از فسفوریلاسیون پروتئین‌های BAD می‌شود (۱۳). همچنین تأثیر مثبت ال- آرژنین بر کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دیده شده است. ال- آرژنین به‌عنوان یک اسید آمینه آنتی‌اکسیدان با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید غشاء سلول نقش محافظتی خود را اعمال می‌کند (۱۴، ۱۵). این نتایج بیانگر نقش مهم آرژنین در رشد سلولی و پیشگیری از آپوپتوز است. بنابراین مطالعه روی اثر آرژنین بر رشد، زنده‌مانی و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد بز، با توجه به آنچه پیش‌تر گفته شد، می‌تواند نتایج مفیدی به دنبال داشته باشد. با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مطالعه‌های مهندسی ژنتیک (حفظ ذخایر ژنتیکی)، درمان ناباروری و سرطان و به‌طور خاص اهمیت گونه دامی بز در طراحی مدل‌های حیوانی برای درک بهتر بیماری‌های انسان از جمله ناباروری، مشکلات مفاصل، دیسک‌های بین مهره، استئوآرتریت و کندروژنز بسیار اهمیت دارد. علاوه بر این، بز در طراحی دام‌های تراریخته و درمان‌های به واسطه آنتی‌بادی‌های منوکلنال و داروهای نوترکیب ازجمله پروترومبین، فاکتور

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

انعقادی شماره ۸، انسولین و آلبومین مترشحه از شیر بزهای تراریخته و همچنین کاربرد این دام در مهندسی بافت و طب بازساختی اهمیت انجماد و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این گونه دامی بیش از پیش بر همگان عیان خواهد شد. مطالعه حاضر در نیمه اول سال ۱۴۰۰ انجام شد. نمونه‌گیری و جمع‌آوری بیضه‌های بزغاله از کشتارگاه صنعتی بیستون و کشت و انجماد سلول در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی انجام شد.

روش کار

ماهیت این مطالعه تجربی بوده و پنج بار تکرار آزمایش انجام شد. بیضه بزغاله‌های کشتاری نابالغ ۳-۲ ماهه از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۳۰ کیلومتری شهر کرمانشاه تهیه و سریعاً در محیط انتقالی (PBS حاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین) و در مجاورت یخ و ظرف مدت کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی انتقال داده شد. ماهیت این آزمایش تجربی و تعداد تکرار آن پنج مرتبه بود. تمامی موازین اخلاقی کار با حیوانات و حقوق حیوانات در این پایان‌نامه رعایت شده است. استخراج سلول‌ها با استفاده از روش قادری و همکاران (۱۶) با اندکی تغییر به شرح ذیل انجام شد. برای کاهش بار میکروبی احتمالی پس از شست‌وشوی سطح بیضه با الکل ۷۰ درصد و تنتورید ۵۰ گرم از بافت پارانشیم بیضه به داخل لوله فالکون (SLP, South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Bio-Idea, Iran) تجاری و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و سپس سه مرتبه سانتریفیوژ (Hettach, Germany) (۱۵۰۰ دور در دقیقه) انجام شد. در این مرحله پارانشیم بافت بیضه متعاقب شست‌وشو به‌وسیله قیچی استریل کاملاً خرد شد تا بافت آن حالت شیرابه‌ای پیدا کند. سپس با اضافه‌کردن آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ و آنزیم تریپسین هرکدام به غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma, Germany) مرحله اول هضم آنزیمی آغاز شد و پتری دیش به‌مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور قرار داده شد متعاقباً تعلیق حاصله با دور ۱۰۰۰ به‌مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. با چک کردن تعلیق زیر میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope)، میزان پیشرفت درباز شدن کلاف لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده و مرحله دوم هضم آنزیمی آغاز شد. به این صورت که آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و دزوکسی ریبونوکلئاز با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به تعلیق سلولی اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور (۲۰۰ دور در دقیقه) قرار داده شد. برای توقف هضم آنزیمی FBS با نصف غلظت محلول به تعلیق سلولی اضافه شد و سپس به‌مدت دو دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. نهایتاً به‌منظور حذف سلول‌های میوئید از تعلیق سلولی (سلول اسپرماتوگونی، سرتولی و میوئید) از فیلتر نایلونی ۴۵ میکرونی (Germany, sartorius) عبور داده شد. سپس تعلیق سلولی حاصل به مدت پنج دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفیوژ شد. به منظور خلوص بیشتر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از روش حذف تمایزی استفاده شد. به این صورت که تعلیق سلولی به‌مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت به فلاسک کشت منتقل شد، پس از طی این مدت سلول‌های سرتولی به کف چسبیدند و برای عملیات انجماد از سلول‌های شناور که بیشتر حاوی اسپرماتوگونی بودند، استفاده شد.

انجماد بر اساس روش‌های احمدی و همکاران (۱۷) با کمی تغییر انجام شد به این صورت که سوسپانسیون سلولی از قبل در حجم‌های ۵/۰ میلی‌لیتر الیکوت و آماده شد. سپس محلول مادر انجماد که متشکل از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine serum)، ۱/۴ مول دی متیل سولفوکسید (DMSO, Sigma Aldrich, Germany) و ۰/۰۷ مولار سوکروز که با غلظت دو برابر مهیا شده بود، به آرامی و طی ۱۰ دقیقه به تعلیق سلولی اضافه شد و به لوله‌های انجماد یک میلی‌لیتری (Cryovial, TPP,Switzerland) منتقل شد. سپس لوله‌ها به

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

صورت خیلی آرام تکان داده شد تا محیط با سلول‌ها مخلوط شود. سپس لوله انجماد حاوی سلول‌ها به مدت یک ساعت در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد، ۱ تا ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در نهایت به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت به تانک ازت مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. برای یخ‌گشایی تعلیق سلولی منجمد، لوله انجماد از تانک خارج شد و به مدت دو دقیقه در بن ماری ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آرام آرام روی تعلیق سلولی محیط DMEM ریخته شد و به مدت پنج دقیقه با دور ۳۲۰۰ سانتریفیوژ شد و پلیت سلولی برای ادامه عملیات کشت سلولی استفاده شد.

ارزیابی درصد حیات سلول‌ها

بلافاصله پس از اتمام مراحل جداسازی سلول‌ها، پس از افزودن ماده محافظ انجماد و پس از یخ‌گشایی درصد حیات سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد (Trypan Blue, UK) و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و لام هموسیاومتر محاسبه شد. به این صورت که تعلیق سلولی و رنگ تریپان بلو با نسبت ۱:۱ مخلوط و با شمارش تصادفی ۱۰۰ سلول و نسبت سلول‌های زنده به کل سلول‌ها درصد زنده‌مانی محاسبه شد.

در نهایت پس از شمارش تعداد ۲۰,۰۰۰ سلول در هر گوده از پلیت ۶ خانه‌ای (Switzerland, TPP) کشت داده شد. هر پلیت که حاوی ۶ گوده است به ترتیب گوده یک به عنوان گروه شاهد و گوده‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب به تیمارهای ۱، ۲ ، ۳، ۴ و ۵ اختصاص یافت. در نهایت ال- آرژنین (Merck1.01544.0100,Germany) به شرح زیر به هر یک از گوده‌ها افزوده شد.

گروه شاهد: محیط کشت پایه بدون افزودن ال- آرژنین

تیمار ۱: محیط کشت پایه حاوی ال- آرژنین با غلظت ۵۰ میکرومول بر لیتر

تیمار ۲: محیط کشت پایه حاوی ال- آرژنین با غلظت ۱۰۰ میکرومول بر لیتر

تیمار ۳: محیط کشت پایه حاوی ال- آرژنین با غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر

تیمار ۴: محیط کشت پایه حاوی ال- آرژنین با غلظت ۵۰۰ میکرومول بر لیتر

تیمار ۵: محیط کشت پایه حاوی ال- آرژنین با غلظت ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر

محیط کشت پایه شامل DMEM، حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین- استرپتومایسین)، ۵ درصد FBS، ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF(Sigma- Aldrich, Germany)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر LIF(Sigma- Aldrich, Germany) و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر EGF(Sigma- Aldrich, Germany) است. سپس پلیت به انکوباتور (Memmert, Germany) ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۱۰ روز کشت داده شد و هر سه روز یک‌بار محیط کشت تعویض شد و با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج تعداد کلونی‌ها شمارش و قطر کلونی‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۱و ۲)، سپس با نرم‌افزار Image J (version ; National Institutes of Health , ,Bethesda , MD, US) مساحت کلونی‌ها بر حسب میلی‌متر مربع محاسبه شد.

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به روش RT- PCR

برای ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های حاصل از کلونی اسپرماتوگونی (THY-1، VASA، UCHL-1(PGP9.5)، plzf، OCT-4 و GAPDH) از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR-RT) استفاده شد و بیان ژن در سطح mRNA بررسی شد. طراحی پرایمر طبق مطالعه‌های پیشین انجام شد. (۱۸). در روز دهم کشت برای استخراج RNA، پس از ترپسینه کردن و شمارش تعداد یک میلیون سلول برای انجام آزمایش برداشت شد. RNA با استفاده از کیت تجاری (RNA-SPIN^{TM}, INTRON, Korea) استخراج شد. عملیات استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه UV اسپکتروفتومتری غلظت نمونه‌ها بررسی شد. RT- PCR با استفاده از کیت (VeTek^{TM}, One Step Premix

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

Kit, INTRON, South Korea) و طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از ترموسیکلر (BIORAD. USA) انجام شد. برای آشکارشدن بیان ژن‌ها از ژل آگاروز با غلظت ۱/۵ درصد در بافر TAE۱ x استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از رنگ Gel Red™ (Biotium Inc, Hayward CA, USA) انجام شد.

در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول حاوی RNA به درون چاهک منتقل شد. مدت زمان الکتروفورز ژن به‌طور متوسط ۴۵ دقیقه بود. سپس، ژل با دستگاه ترانس لومینوت (France ,UVP) ارزیابی شد.

جدول ۱- نام و مشخصات پرایمر ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مطالعه شده

نام ژن	Forward primer	Reverse primer	جفت باز(bp)	دمای ذوب (C°)
PGP9.5	TTCAGGCAGCCCACGATG	AAGGCATCCGTCCATCAAG	۱۲۶	۵۸
BCl6	GCCACCACCTTTAATTTCTCAC	GAAATCAGGCTTCCAGTCTC	۱۶۲	۵۸
ID4	TGTCACTGAGTTTCATGTCTG	AGAAAGTGTTCATTGCCAAGAG	۱۰۲	۵۶
VASA	TCTTGGAGATTTCCGCTG	GGCTGTGCTAACTGGCTA	۲۱۹	۵۳/۵
PLZF	GCAACAGCCAGCACTATACTC	TACAGCAGGTCATCCAGGTC	۱۱۸	۵۸
GAPDH	TGCCGCCTGGAGAAACC	TGAAGTCGCAGGAGACAACC	۱۲۱	۵۹
OCT-4	GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC	ACACTCGGACCACGTCCTTC	۳۱۴	۵۸

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده‌های جمع‌آوری شده از نظر نرمال بودن ارزیابی شدند. به دلیل عدم توزیع نرمال داده‌های مربوط به تعداد و مساحت کلونی‌ها، داده‌ها با استفاده از تست جانسون (Johnson Transformation) با نرم افزار Minitab16 نرمال شدند. سپس روی داده‌ها آزمون آنالیز واریانس انجام شد و آثار غلظت‌های مختلف ال- آرژنین، طول مدت کشت و آثار متقابل ال- آرژنین × مدت زمان و همچنین مقایسه میانگین تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف کشت و نیز مقایسه میانگین تعداد کل و مساحت کل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به کمک مدل آماری General Linear Model و با آزمون ANOVA (به همراه آزمون‌های تکمیلی Tukey and Fisher) در سطح ۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 انجام شد.

یافته‌ها

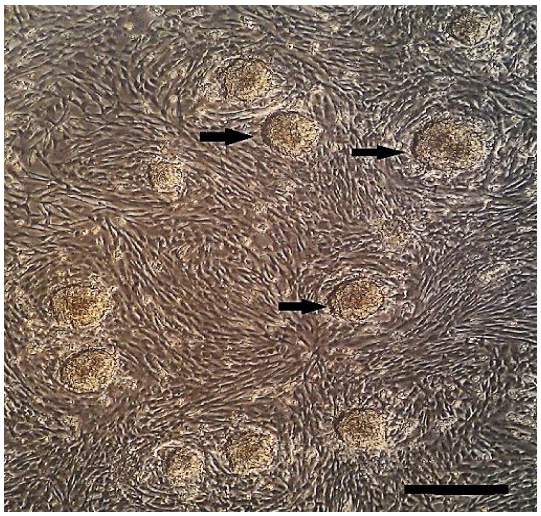
درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از جداسازی ۲/۶ ± ۸۷/۱۴ درصد بود که پس از افزودن محلول انجماد و قبل از سرد کردن (تست سمیت محلول انجماد به ۱/۲۱ ± ۸۰/۷۲ درصد رسید ($P = ۰/۰۷$). پس از یخ‌گشایی این میزان به ۱/۲۶ ± ۶۵/۳۸ رسید که با درصد حیات سلول‌ها پیش و پس از اضافه کردن محلول انجماد تفاوت معناداری دارد ($P = ۰/۰۲۱$). نتایج آثار روزهای مختلف کشت بدون در نظر گرفتن دوزهای مختلف آرژنین بر تعداد و مساحت سطح سلول‌های اسپرماتوگونی بز در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری بین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای مختلف کشت وجود دارد ($P = ۰/۰۳۱$). با توجه به نتایج به دست آمده، تعداد کلونی‌ها در روز دهم کشت بیشینه و در روز چهارم در کمترین میزان خود قرار داشتند (۱۰۹/۰۴ به ۷۸/۷۹). همچنین مساحت سطح کلونی‌های اسپرماتوگونی تحت تأثیر روزهای مختلف کشت قرار گرفت ($P = ۰/۰۱۹$). بیشترین مساحت سطح در روز دهم با ۲/۶۶ و کمترین مساحت سطح با ۱/۴۸ در روز چهارم کشت مشاهده شد که این امر در کشت‌هایی که تمامی عوامل آن به درستی عمل می‌کند طبیعی و قابل انتظار است و نشان‌دهنده سلامت وضعیت سیستم کشت است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

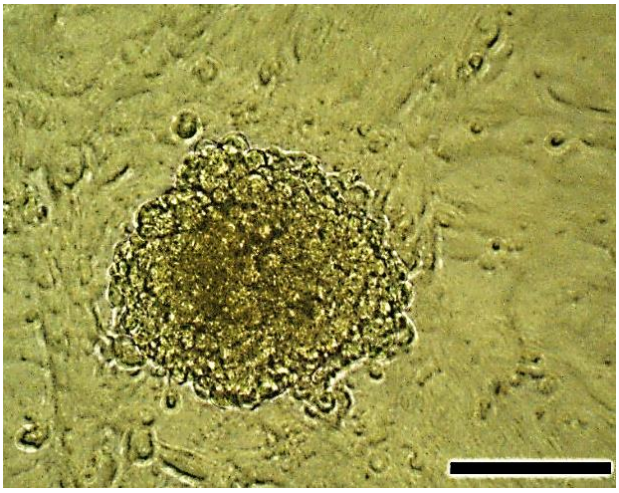
جدول ۲- آثار روزهای مختلف نمونه‌برداری بر تعداد و مساحت سطح سلول‌های اسپرماتوگونی بز

روز	تعداد کلنی	سطح کلنی
۴	۷۸/۷۹[c]	۱/۴۸[c]
۷	۹۸/۴۶[b]	۲/۰۸[b]
۱۰	۱۰۹/۰۴[a]	۲/۶۶[a]

a-b، حروف غیر مشترک در هر ستون نشان‌دهنده معناداری است.



شکل ۱- کلنی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که با پیکان مشخص شده‌اند در روز هفتم کشت سلولی در میان سلول‌های سرتولی احاطه شده‌اند. (نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)



شکل ۲- کلونی تمشکی شکل سلول بنیادی اسپرماتوگونی در روز دهم کشت. (نوار مقیاس: ۵۰ میکرومتر)

تعداد کلونی‌ها

مقایسه میانگین تعداد کلنی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف در روز ۴، ۷ و ۱۰ در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین تعداد کلونی در گروه تیمار۳ (۲۰۰ میکرومول بر لیتر ال- آرژنین) مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۳- مقایسه میزان (میانگین ± انحراف معیار) تعداد کلنی‌های اسپرماتوگونی تحت غلظت‌های مختلف ال- آرژنین در روزهای مختلف کشت

غلظت (میکرومول بر لیتر)	روز ۴	روز ۷	روز ۱۰	تعداد کل
۰	[d]۵۴ ± ۱۸/۸	[e]۷۴/۲۵ ± ۱۸/۸	[e]۸۱/۵ ± ۱۸/۸	[e]۶۹/۹۲
۵۰	[b]۸۱/۷۵ ± ۱۸/۸	[c]۱۰۹/۰ ± ۱۸/۸	[c]۹۹/۵ ± ۱۸/۸	[c]۹۸/۷۵
۱۰۰	[b]۸۵/۷۵ ± ۱۸/۸	[b]۱۲۸ ± ۱۸/۸	[b]۱۰۵/۲۵ ± ۱۸/۸	[b]۱۰۶/۳
۲۰۰	[a]۹۹/۷۵ ± ۱۸/۸	[a]۱۴۲ ± ۱۸/۸	[a]۱۸۷/۰ ± ۱۸/۸	[a]۱۴۲/۹۲
۵۰۰	[b]۸۴/۵ ± ۱۸/۸	[c]۱۰۴/۲۵ ± ۱۸/۸	[c]۹۸/۷۵ ± ۱۸/۸	[c]۹۵/۸۳
۱۰۰۰	[c]۶۴/۰ ± ۱۸/۸	[d]۹۲/۲۵ ± ۱۸/۸	[d]۸۹/۲۵ ± ۱۸/۸	[d]۸۱/۸۳

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان‌دهنده معناداری است.

همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، در روز ۴، ۷ و ۱۰ بالاترین مساحت کلنی در غلظت ۲۰۰ میکرو مول بر لیتر ال- آرژنین مشاهده شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ال- آرژنین تا میزان ۲۰۰ میکرومول بر لیتر، مساحت کلنی افزایش و در دوزهای بالاتر از آن (۵۰۰ و ۱۰۰۰) کاهش یافت.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

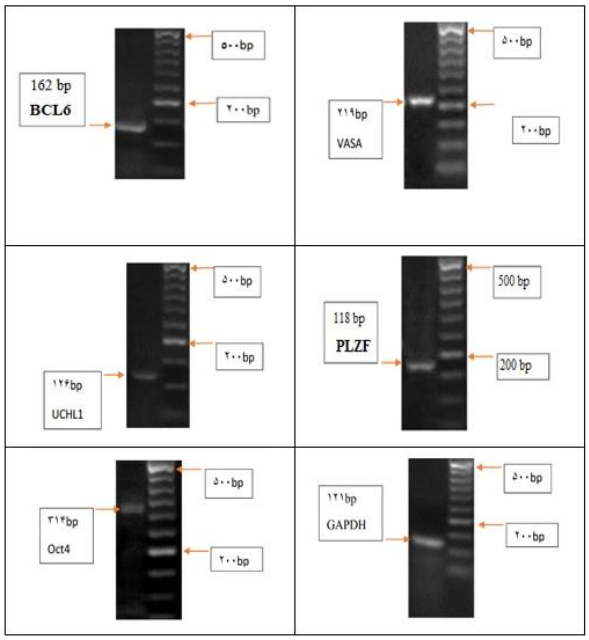
جدول ۴- مقایسه میزان(میانگین ± انحراف معیار) مساحت کلنی‌های اسپرماتوگونی تحت غلظت‌های مختلف ال- آرژنین در روزهای مختلف (میکرومتر مربع)

غلظت (میکرومول بر لیتر)	روز			تعداد کل
	۴	۷	۱۰	
۰	^{e}۰/۷۱۵ ± ۰/۶۱	^{d}۱/۰۹ ± ۰/۶۱	^{e}۱/۷۲ ± ۰/۶۱	^{d}۱/۱۸
۵۰	^{c}۱/۳۸ ± ۰/۶۱	^{c}۱/۹۲ ± ۰/۶۱	^{c}۲/۶۳ ± ۰/۶۱	^{bc}۱/۹۸
۱۰۰	^{b}۱/۶۴ ± ۰/۶۱	^{b}۲/۳۰ ± ۰/۶۱	^{b}۳/۹۲ ± ۰/۶۱	^{b}۲/۶۲
۲۰۰	^{a}۲/۹۰ ± ۰/۶۱	^{a}۴/۲۲ ± ۰/۶۱	^{a}۵/۸۱ ± ۰/۶۱	^{a}۴/۳۱
۵۰۰	^{c}۱/۲۵ ± ۰/۶۱	^{bc}۲/۰۴ ± ۰/۶۱	^{c}۲/۸۲ ± ۰/۶۱	^{bc}۲/۰۴
۱۰۰۰	^{d}۱/۰۲ ± ۰/۶۱	^{c}۱/۹۲ ± ۰/۶۱	^{d}۲/۲۶ ± ۰/۶۱	^{c}۱/۷۳

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان‌دهنده معناداری است.

بررسی بیان ژن با استفاده از RT- PCR

با استفاد از تکنیک RT- PCR بیان ژن‌های شاخص سلول‌های اسپرماتوگونی در سطح mRNA بررسی شد که نتایج حاکی از بیان ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی پس از ده روز کشت بود که در سکل ۳ نشان داده شده است. در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار برای بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شد.



شکل ۳- بیان ژن‌های ID4، BCL6، PGP9.5، PLZF، VASA و OCT-4 اسپرماتوگونی بز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد (راست: Ladder، چپ: گروه آزمون)

بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف ال- آرژنین بر القا کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد ذوب شده بز نابالغ در شرایط آزمایشگاه است.

در مطالعه حاضر با ارزیابی تعداد و مساحت کلنی‌های تشکیل شده در محیط کشت مشاهده شد که افزودن ال- آرژنین به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده بز می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز (تا دوز ۲۰۰میکرومول بر لیتر) تا حدودی سبب بهبود رشد و القای کلنی‌زایی این سلول‌ها می‌شود و در دوزهای بسیار بالا (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر) این اثر عکس می‌شود و اثر سوء به جای می‌گذارد. پروتکل انجماد به دلیل تولید رادیکال آزاد در طی آن و آسیب به غشاء سلولی سبب کاهش درصد حیات می‌شود نتایج قسمت انجماد سلول‌ها در این مطالعه تا حدود زیادی شبیه مطالعه‌های پیشین است (۱۷، ۱۹). در حوزه مطالعه‌های کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز، مطالعه‌های مختلفی در خصوص آثار افزودن فاکتورهای رشد سلولی و سیتوکین‌ها به محیط کشت انجام شده است (۲۰، ۲۱) ولی در خصوص اثر ال- آرژنین روی این سلول‌های اسپرماتوگونی بز کاری انجام نشده است. آرژنین ممکن است به عنوان پیش‌ساز پلی‌آمین‌ها و نیتریک اکساید که نقش مهمی در فرآیند تکثیر سلولی ایفا می‌کنند و نیز با فراهم کردن پیش‌ماده سنتز پروتئین‌ها سبب بهبود تکثیر لمفوسیت‌ها

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

شود (۲۲). طبق گزارش Green و همکاران در سال ۲۰۱۳، آرژنین به عنوان پیش‌ساز پلی‌آمین‌ها و نیتریک اکساید و همچنین آثار مهار آپوپتوز سلولی با واسطه فسفوریلاسیون پروتئین‌های BAD که مانع از اتصال آنها به BCL2 و در نتیجه آسیب به غشای میتوکندری می‌شود، سبب بهبود تکثیر سلول‌های رده اندومتریال RL95-2 انسان می‌شود (۲۳). علاوه بر این نشان داده شده که آرژنین از طریق مهار مسیرهای پیام‌رسانی ERK1/2، PI3K/Akt، CAMP-PKA و GPRC6A در پیشگیری از آپوپتوز نقش خود را ایفا می‌کند (۲۴).

همچنین نقش آرژنین در کاهش بیان ژن‌های پیش آپوپتوز در سلول‌های اپیتلیوم روده گوسفند نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کند (۲۵).

Zhang و همکاران (۲۰۲۰) اثر محافظتی ال- آرژنین بر آپوپتوز القا شده توسط T-2 toxin در سلول‌های لیدیگ موش و مکانسیم‌های مؤثر در این روند را مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که افزودن ال- آرژنین به طور وابسته به دوز سبب افزایش بیان ژن *Bcl-2* و کاهش بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوزی شد (۲۶).

Suschek و همکاران (۲۰۰۳) آثار آرژنین به عنوان پیش‌ماده آنزیم iNOS در پیشگیری از آپوپتوز القا شده توسط H_2O_2 در سلول‌های اندوتلیال آئورت (AECs) رت بررسی شد. در این مطالعه بیشترین فعالیت آنزیم iNOS در غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر آرژنین مشاهده شد. طبق گزارش این محققان، آرژنین از طریق مهار پراکسیداسیون چربی در سلول‌های اندوتلیال و نیز افزایش بیان ژن‌های مقابله کننده با استرس از این سلول‌ها محافظت می‌کند (۲۷).

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر با گزارش‌های بررسی شده در بالا مبنی بر آثار مثبت غلظت ۲۰۰ میکرومول بر لیتر آرژنین بر رشد دیگر رده‌های سلولی در محیط کشت مطابقت دارد. با توجه به نقش آرژنین در تحریک مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی، پیشگیری از بیان ژن‌های مسئول آپوپتوز سلولی (Bcl، BAX و ...) و کاهش آثار استرس اکسیداتیو و نیز نقش آن به عنوان پیش‌ساز مولکول‌های مؤثر در فرآیندهای تکثیر سلولی مانند نیتریک اکسید و پلی‌آمین‌ها که در مطالعه‌های فوق به آنها اشاره شد، آرژنین احتمالاً از طریق مکانیسم‌های مذکور می‌تواند سبب القا و تداوم رشد و کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در محیط آزمایشگاه شود. آثار سوء دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ احتمالاً ناشی از down regulation گیرنده‌های سلولی و اشباع گیرنده‌ها است.

همچنین افزایش تعداد و مساحت کلنی‌ها با گذشت زمان در این مطالعه با گزارش‌های پیشین نیز تطابق داشت که بیانگر آثار مطلوب ال- آرژنین بر شرایط محیط کشت و تداوم رشد کلنی‌ها با گذشت زمان است. در مطالعه دیگر، آثار ال- آرژنین بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند دوز ۲۰۰ میکرولیتر به عنوان بهترین دوز پیشنهاد شد که نتیجه مطالعه ما همسو با آن است. البته لازم به ذکر است که تفاوت پژوهش ذکر شده با مطالعه حاضر استفاده از سلول‌های منجمد- ذوب‌شده به جای سلول تازه در مطالعه ما است، انجماد به صورت بالقوه با تولید رادیکال آزاد و آسیب به غشاء برای سلول روندی آسیب‌زاست. همچنین تفاوت گونه حیوانی و طبیعتاً فیزیولوژی متفاوت نیز قابل ذکر است (۱۵).

تاکنون مارکرهای بیوشیمیایی یا مرفولوژیک کاملاً اختصاصی برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کشف نشده است، با این حال استفاده ترکیبی تعدادی از این مارکرها قطعاً اطلاعات مهمی در خصوص چند و چون، وضعیت و ماهیت سلول‌های جدا شده ارائه می‌دهد. در مطالعه حاضر برای تأیید وجود سلول اسپرماتوگونی در عملیات کشت سلولی و ماهیت بنیادینگی آن از نشانگرهای تقریباً اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی (ID4، VASA،BCL6، PGP9.5، PLZF و OCT-4) با استفاده از تکنیک RT- PCR استفاده شد.

OCT4 را می‌توان تقریباً به عنوان نشانگر عمومی سلول‌های بنیادی در نظر گرفت که در سلول‌های اسپرماتوگونی موش و سایر حیوانات و حتی در بیضه جنینی نیز بیان می‌شود (۲۸). همچنین پیش از این بیان ژن‌های ID4 و BCL6 به عنوان نشانگری تقریباً قابل اعتماد در سلول‌های زایای بز به اثبات رسیده است (۲۸).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

Plzf به عنوان یک نشانگر اختصاصی اسپرماتوگونی در انسان و برخی از دام ها از جمله بز پذیرفته شده است (۲۹). بیان ژن VASA و PLZF در سلول‌های اسپرماتوگونی بز به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در تداوم رشد سلول‌های تمایزنیافته اسپرماتوگونی به اثبات رسانده‌اند (۳۰). بیان نشانگر سلولی PGP9.5 نیز در بسیاری از پستانداران به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه حاضر بسیار شبیه این مطالعه‌هاست (۳۱).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه و مطالعه‌های مشابه، افزودن ال- آرژنین به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده می‌تواند تا حدودی سبب بهبود رشد و کلنی‌زایی این سلول‌ها می‌شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های بعدی به‌صورت جزئی‌تر تمرکز روی ژن‌های مسئول آپوپتوز و تکثیر سلولی در این رده سلولی هم صورت پذیرد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشگاه رازی بررسی و با کد اخلاق IR.RAZI.REC.1400.051 ثبت شده است. تمامی موازین اخلاقی کار با حیوانات و حقوق حیوانات در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم فاطمه نجفی برای دریافت درجه دکتری عمومی دامپزشکی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی بود.

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه رازی انجام شده است.

تعارض منافع

در پژوهش حاضر نویسندگان هیچ تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

References

1. Yong, K.W.; Laouar, L.; Elliott, J.A.W.; Jomha, N.M. Review of Non-Permeating Cryoprotectants as Supplements for Vitrification of Mammalian Tissues. *Cryobiology* 2020, 96, 1–11.

2. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir
D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1998; 13(1):1-8.

3. Nabulindo NW, Nguhiu-Mwangi J, Kipyegon AN, Ogugo M, Muteti C, Christian T, Oatley MJ, Oatley JM and Kemp S. Culture of Kenyan Goat (Capra hircus) Undifferentiated Spermatogonia in Feeder-Free Conditions. *Front Vet. Sci* 2022; 19(9):894075.

4. Sharma P, Sharma N, Choudhary S, Luhach P, Choudhary RK. Understanding, Status, and Therapeutic Potentials of Stem Cells in Goat. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2023;18(7):947-957.

5. Takashima, S.; Shinohara, T. Culture and Transplantation of Spermatogonial Stem Cells. *Stem Cell Res*. 2018; 29, 46–55.

6. Khanehzad, M.; Nourashrafeddin, S.M.; Abolhassani, F.; Kazemzadeh, S.; Madadi, S.; Shiri, E.; Khanlari, P.; Khosravizadeh, Z.; Hedayatpour, A. MicroRNA-30a-5p Promotes Differentiation in Neonatal Mouse Spermatogonial Stem Cells (SSCs). *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19, 1–14.

7. Pramod, R. Kumar[1]; Varughese, Deepthi[2]; Jameel, A. Javed[3]; Panda, Bhisma Narayan[4]; Goswami, Soma[5]; Mitra, Abhijit[6]. Cryopreserved ovine spermatogonial stem cells maintain stemness and colony forming ability in vitro. *Asian Pac J Reprod* 2023; 12(6):273-280.

8. Bashghareh A, Rastegar T, Modarresi P, Kazemzadeh S, Salem M, Hedayatpour A. Recovering Spermatogenesis By Protected Cryopreservation Using Metformin and Transplanting Spermatogonial Stem Cells Into Testis in an Azoospermia Mouse Model. *Biopreserv Biobank*. 2024; 22(1):68-81.

9. Chatterjee A, Chattopadhyay D, Chakrabarti G. MiR-16 targets Bcl-2 in paclitaxel-resistant lung cancer cells and overexpression of miR-16 along with miR-17 causes unprecedented sensitivity by simultaneously modulating autophagy and apoptosis. *Cell Signal*. 2015; 27(2):189-203.

10. Caso G, McNurlan MA, McMillan ND, Eremin O, Garlick PJ. Tumour cell growth in culture: dependence on arginine. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 107(4):371-9.

11. Gong, H., Zölzer, F., Von Recklinghausen, G., Havers, W., & Schweigerer, L. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia*. 2000;14(5), 826-829.

12. Tan, B., Yin, Y., Kong, X. et al. L-Arginine stimulates proliferation and prevents endotoxin-induced death of intestinal cells. *Amino Acids* 2010; 38, 1227–1235.

13. Greene, J. M., Feugang, J. M., Pfeiffer, K. E., Stokes, J. V., Bowers, S. D., & Ryan, P. L. L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reprod Biol Endo*, 2013; 11, 1-11.

14. Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E. and Govil, G. Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 2000; 32(2):127–35.

15. Zahra Ghaderi Nazliani, Peyman Rahimi-Feyli, AliAsghar Moghaddam, Samad Alimohammadi. Evaluation of the Effect of L-arginine on Induction of Ovine Spermatogonial Stem Cells Colonization In-Vitro, *J Res Med Sci.* 2023; 46(4), 15-25.

16. Jamshidi H, Rahimi P, Moghaddam A. Effect of melatonin on SSCs colony formation in vitro. Res Med 2020; 44 (4):580-586

17. Ahmadi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, 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) :714-723.

18. Sharma A, Shah SM, Tiwari M, Roshan M, Singh MK, Singla SK, Palta P, Manik RS, Chauhan MS. Propagation of goat putative spermatogonial stem cells under growth factors defined serum-free culture conditions. *Cytotechnology*. 2020;72(3):489-497.

19. Kumar, R & □, Pramod & Varughese, Deepthi & Jameel, Javed & Panda, Bhisma & Goswami, Soma & Mitra, Abhijit. Cryopreserved ovine spermatogonial stem cells maintain stemness and colony forming ability in vitro. *Asian Pac J Reprod*. 2023;12(6):273-280.

20. Wang, J., Cao, H., Xue, X., Fan, C., Fang, F., Zhou, J., … & Zhang, Xa. Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. *Theriogenology*, 2014; 81(4):545-555.

21. Ren, F., Fang, Q., Xi, H., Feng, T., Wang, L., & Hu, J. Platelet-derived growth factor-BB and

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]

epidermal growth factor promote dairy goat spermatogonial stem cells proliferation via Ras/ ERK1/2 signaling pathway. Theriogenology, 2020; 155: 205-212.

22. Ochoa, J. B., Strange, J., Kearney, P., Gellin, G., Endean, E., & Fitzpatrick, E. Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *J Parenter Enteral* Nutr, 2001; 25(1), 23-29.

23. 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; 26;11:15.

24. Fujiwara, T., Kanazawa, S., Ichibori, R., Tanigawa, T., Magome, T., Shingaki, K., & Hosokawa, K. L-Arginine Stimulates Fibroblast Proliferation through the GPRC6A-ERK1/2 and PI3K/Akt Pathway. 2014;9(3), e92168.

25. 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):1683-1690.

26. Zhang YF, Yang JY, Meng XP, Nie N, Tang MC, Yang XL. L-Arginine protects mouse Leydig cells against T-2 toxin-induced apoptosis *in vitro*. Toxicol Ind Health. 2020; 36(12):1031-1038.

27. Suschek, C. v., Schnorr, O., Hemmrich, K., Aust, O., Klotz, LO., Sies, H., Kolb-Bachofen, V. (2003). Critical Role of L Arginine in Endothelial Cell Survival During Oxidative Stress . *Circulation*, 2003;107, 2607-2614.

28. Carlo, A. Q., Pathak, D., Choudhary, R. K., Singh, O., & Bansal, N. Analysis of OCT4 and PGP9.5 gene expression in prenatal and postnatal buffalo (Bubalus bubalis) testes. Anim Biotech, 2024;35(1).

29. Yang D, Zhang M, Chen W, Lu Q, Wan S, Du X, Li Y, Li B, Wu W, Wang C, Li N, Peng S, Tang H, Hua J. UCHL1 maintains microenvironmental homeostasis in goat germline stem cells. *FASEB J*. 2023;37(12)

30. Nabulindo NW, Nguhiu-Mwangi J, Kipyegon AN, Ogugo M, Muteti C, Christian T, Oatley MJ, Oatley JM, Kemp S. Culture of Kenyan Goat (Capra hircus) Undifferentiated Spermatogonia in Feeder-Free Conditions. *Front Vet Sci*. 2022;19;9:894075.

31. Choi Y, Jung Y, Kim S, Kim J, Jung H, Yoon M. Stage-Dependent Expression of Protein Gene Product 9.5 in Donkey Testes. Animals (Basel). 2020; 20;10(11):2169.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-06]