



شناسایی و جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیل ماهی (*Huso huso*)

مهسا برهانی^۱، محمد رضا کلباسی^{۲*}، مارتین پشنیچکا^۳، بهرام فلاحتکار^۴، الکساندر دتمار کرافورد^۵

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

چکیده

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا (SSCs) سلول‌های منحصر به فردی هستند و می‌توانند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل کنند، از این رو در تولید ماهی کایمر و حفاظت از گونه‌های کمیاب نقش مهمی دارند. این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی ویژگی‌های ظاهری سلول‌های اسپرماتوگونیا با روش بافت‌شناسی و سپس جداسازی آنها با روش هضم آنزیمی از بافت بیضه فیل ماهی (*Huso huso*) اجرا شد. مطالعات بافت‌شناسی بیضه فیل ماهیان یک تا سه ساله نشان داد که دو نوع کلی سلول اسپرماتوگونیای تمایز نیافته (SSCs) و تمایز یافته وجود دارد. SSCs اغلب با اندازه بزرگ، پوشش هسته‌ای نامنظم، اجزای هسته‌ای مشخص و وجود یک تا دو هستک شناسایی شدند، به علاوه در ماهیان یک ساله فراوانی SSCs به صورت معنی‌داری بالاتر از ماهیان دو و سه ساله بود ($P < 0/05$). جداسازی سلول‌های بافت بیضه ماهیان یک ساله به وسیله هضم آنزیمی نشان داد استفاده از آنزیم تریپسین ۰/۱ درصد به همراه بافر فسفات به مدت ۲ تا ۳ ساعت در دمای ۱۶-۲۰ درجه سانتی‌گراد کارایی بالاتری از نظر تعداد و زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونیای فیل ماهی داشت ($P < 0/05$). این بررسی اطلاعات پایه‌ای را برای جداسازی SSCs فیل ماهی به منظور پیوند آن برای تولید ماهی کایمر فراهم آورده است.

واژگان کلیدی: SSCs بافت‌شناسی، هضم آنزیمی، فیل ماهی، ماهی کایمر.

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳- دانشیار بخش تحقیقاتی پرورش ماهی و هیدروبیولوژی، دانشکده شیلات و حفاظت از آب‌ها، دانشگاه سوت بوهمیا، چسکه بوداویسه، چک.

۴- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران.

۵- دانشیار گروه علوم بالینی و آسیب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم زیستی نروژ، اسلو، نروژ.

* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

(A undif) و اسپرماتوگونیای تمایز یافته (A diff) و نوع B شامل B early و B late است (Lacerda et al., 2014) که به صورت پایه‌ای و کلی این دو زیر جمعیت اسپرماتوگونیا نوع تمایز نیافته یا SSCs و اسپرماتوگونیای تمایز یافته در نظر گرفته می‌شوند (Okutsu et al., 2007). سلول‌های اسپرماتوگونیای نوع A از لحاظ ویژگی‌های ساختاری و ظاهری مانند چگالی اندک سیتوپلاسمی، هسته بیضی شکل با یک یا دو هستک کوچک نامنظم و ناواضح و واکوئل‌های هسته‌ای فراوان و نامنظم، دارای شباهت‌های زیادی با یکدیگر هستند. ویژگی‌هایی مانند تعداد سلول در سیست بیضه و اندازه سلول می‌تواند به منظور تفکیک اسپرماتوگونیای نوع A و B مورد استفاده قرار گیرد (Zhang et al., 2015).

استفاده کاربردی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا برای نخستین بار توسط Brinster و Avarbock (۱۹۹۴) بر روی موش ارائه شد که با پیوند تعلیق سلولی از موش هتروژنوس به لوله‌های منی‌ساز موش عقیم، منجر به اسپرم‌زایی در موش پذیرنده پیوند شد. موفقیت در پیوند سلول‌های اسپرماتوگونیا در جوندگان باعث شد که کاربرد آن در علوم دیگر

سلول‌های بنیادی زایا (Germ Stem Cells: GSCs) شامل سلول‌های زایای جنینی اولیه (Primordial Germ Cells: PGCs) و یا سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا (Oogonial Stem Cells: SSCs) و اووگونیا (Oogonial Stem Cells: OSCs) هستند که در مراحل قبل از تولید گامت حضور دارند (Psenicka and Saito, 2020). از میان سلول‌های زایا، SSCs به عنوان پایه و اساس فرآیند اسپرماتوژنز در ماهیان نر دارای پتانسیل ویژه خودنوزایی و تمایز به سلول‌های جنسی نر دیگر است و به دلایلی چون قابلیت تمایز به سمت گامت‌ها، قابلیت تمایز به اووگونیا و اسپرماتوگونیا در میزبان بعد از انجام پیوند (Lacerda et al., 2016; Robles et al., 2014) و قابلیت حضور در بالغین به عنوان تنها سلول‌های بنیادی، برای مطالعات پایه‌ای و کاربردی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و برخی از پژوهشگران معتقد هستند این سلول‌ها می‌توانند جایگزین سلول‌های زایای اولیه شوند (Shang et al., 2016; Robles et al., 2015). دو زیرجمعیت از اسپرماتوگونیا شامل نوع A و B (به ترتیب اسپرماتوگونیای اولیه و ثانویه) وجود دارد. نوع A شامل اسپرماتوگونیای تمایز نیافته

از جمله آبی‌پروری مورد توجه قرار گیرد (Okutsu et al., 2007; Lacerda et al., 2010)، به طوری که امروزه این سلول‌ها منبع ارزشمندی برای مطالعات زیست‌شناسی فرآیند اسپرماتوزنز، حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های کمیاب و تولید جانوران تراریخته از طریق دستکاری ژنتیکی سلول‌های زاینده محسوب می‌شوند (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Tonelli et al., 2016; Higaki et al., 2017; Poursaeid et al., 2020). یکی از راه‌های حفظ ذخایر ژنتیکی تولید رده زایای کایمر (Chimera) با استفاده از شناسایی، جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا گونه‌های در معرض خطر و ارزشمند و سپس پیوند آنها به گونه‌ای نزدیک است که دارای تکنیک تکثیر و پرورش توسعه یافته، چرخه تولیدمثلی کوتاه، پتانسل تولید نتایج بالا و قابلیت عقیم شدن هستند (Robles et al., 2016; Poursaeid et al., 2020; Psenicka and Saito, 2020). اولین گام در تولید ماهی کایمر، جداسازی SSCs از بافت بیضه ماهی در معرض خطر است که پیش‌نیاز این گام دستیابی به ماهی در زمانی است که SSCs در بافت بیضه دارای فراوانی بالایی باشد (Robles et al., 2016). با توجه به این که فراوانی SSCs با رشد و توسعه گنادی ماهی تغییر می‌کند، از این رو انجام مطالعات با هدف شناسایی SSCs و سپس دستیابی به مرحله رسیدگی جنسی و سنی که در آن فراوانی این سلول‌ها بالا است، دارای اهمیت زیادی بویژه در گونه‌های در معرض خطر است. از آنجایی که یک چالش بسیار بزرگ در شناسایی این سلول‌ها کمبود نشانگرهای ملکولی است که قابلیت اثبات ظرفیت بنیادی بودن این سلول‌ها را داشته باشد (Lacerda et al., 2014)، ویژگی‌های ظاهری شرح داده شده می‌تواند در زمینه شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا راه حل مناسبی باشد که از طریق مطالعات بافت‌شناسی بافت بیضه امکان پذیر است (Zhang et al., 2015). سپس گام اصلی، جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا از بافت بیضه است که شامل برش‌های مکانیکی و خرد کردن بافت گناد و در نهایت جداسازی سلول‌ها به وسیله هضم آنزیمی مبتنی بر آنزیم‌هایی مانند تریپسین و کلاژناز است که به صورت وسیعی در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۳؛ Robles et al., 2016). عواملی چون نوع گونه و جنسیت ماهی در انتخاب نوع آنزیم و غلظت آن و همچنین مدت زمان قرارگیری در معرض آنزیم به منظور جداسازی سلول‌های زایای نر موثر

صورت گرفته است، اما همچنان با مشکلاتی مواجه است. یکی از چالش‌های بزرگ در تاس‌ماهیان عدم وجود صفت ثانویه جنسی است که منجر به استفاده از طیف وسیعی از روش‌ها مانند تکه‌برداری از گناده، اندازه‌گیری صفات مورفومتریک و تصویربرداری از سوراخ تناسلی و همچنین استفاده از الگوی هورمون‌های استروئیدی جنسی و دیگر شاخص‌های بیوشیمیایی خون و نیز سونوگرافی برای تفکیک جنسیت، شده است. به علاوه، روش‌های مختلف ژنتیکی مانند استفاده از نشانگرهای اختصاصی برای تفکیک جنسیت فاقد کارایی لازم در این ماهیان است (امامی لنگرودی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Falahatkar et al., 2011, 2013 Falahatkar and Poursaeid, 2013). از دیگر چالش‌های تاس‌ماهیان می‌توان به مشکلات در زمینه پرورش و نگهداری این ماهیان (اندازه بزرگ که در برخی گونه‌ها به بیش از ۷ متر می‌رسد و از این لحاظ نیاز به فضا، امکانات و نیروی زیاد برای نگهداری ماهیان دارد)، سن بلوغ بالا (در برخی از گونه‌ها اولین تولیدمثل در سن بیشتر از ۲۰ سالگی رخ می‌دهد و از این لحاظ به نگهداری طولانی مدت تحت شرایط پرورشی به منظور استحصال گامت نیاز است)، تخم‌ریزی چند سال

است. هضم آنزیمی ناکارآمد ممکن است سبب ایجاد ذخیره اندک از سلول‌های منفرد شود. از سوی دیگر هضم آنزیمی با قدرت بالا نیز ممکن است سبب آسیب رساندن به سلول‌ها شود (Xie et al., 2020).

فیل‌ماهی (*Huso huso*) یا بلوگا از تاس‌ماهیان بومی دریای خزر، دریای سیاه و دریای آزوف است که به عنوان بزرگ‌ترین ماهی خاویاری و بزرگ‌ترین ماهی آب شیرین اوراسیا معروف است (Falahatkar and Poursaeid, 2013; Falahatkar et al., 2013). ذخایر تاس‌ماهیان به دلایل فعالیت‌های انسانی شامل صید بیش از حد و صید قاچاق به منظور به دست آوردن خاویار، احداث سدها که منجر به عدم مهاجرت تولیدمثلی آنها می‌شود، تخریب زیستگاه‌های طبیعی و آلودگی‌های محیطی به شدت کاهش یافته است. در حال حاضر ۲۵ گونه از ۲۷ گونه خانواده تاس‌ماهیان در لیست قرمز اتحادیه حفاظت از محیط طبیعی (International Union for Conservation of Nature: IUCN) قرار دارند که از این تعداد ۱۶ گونه به عنوان ماهیان به شدت در معرض خطر انقراض شناخته می‌شوند (Psenicka and Saito, 2020). تاکنون تلاش‌های بسیار زیادی به منظور حفاظت از این ماهیان ارزشمند

در مرحله شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونیاز، کل فیل ماهیان تهیه شده در درون جعبه‌های مملو از یخ به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور) منتقل شد. به علت مشخص نبودن جنسیت، ماهیان نر و ماده با استفاده از روش بافت‌شناسی تفکیک شدند و سپس ماهیان نر، مورد بررسی‌های مرتبط با شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونیاز قرار گرفتند. در مرحله جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیاز از بافت بیضه، فیل ماهیان مورد نظر در یک سیستم مدار بسته با وان‌های فایبرگلاس به حجم ۱۰۰۰ لیتر مجهز به فیلتراسیون زیستی با ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. دامنه نوسانات مشخصات کیفی آب در طول مدت زمان انجام آزمایش برای دما ۱۸-۱۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۷-۴/۸ میلی‌گرم در لیتر و pH ۸-۷ بوده است.

بافت‌شناسی بیضه فیل ماهی در سنین مختلف

مطالعات بافت‌شناسی در فیل ماهیان نر با حداقل بررسی ۶ قطعه ماهی در هر یک از سنین یک تا سه سال انجام گرفت. زیست‌سنجی ماهیان با ترازو دیجیتال (با دقت ۰/۰۱ گرم برای ماهیان کوچک و ۱ گرم برای ماهیان بزرگ) و خط کش (با دقت ۱ میلی‌متر) انجام شد. ماهیان

یک بار، عدم امکان انجماد تخم و جنین و از دست رفتن مواد ژنتیکی مادری در زمان انجماد اسپرم اشاره کرد (Psenicka and Saito, 2020). این چالش‌ها سبب شده است که امروزه استفاده از تکنولوژی سلول‌های بنیادی و تولید رده زایای کایمر بتواند به عنوان روشی موثر برای حفاظت و بازسازی ذخایر این ماهی ارزشمند و در معرض خطر محسوب شود (اسماعیلی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Psenicka et al., 2015؛ Robles et al., 2016). از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های ظاهری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیاز و تعیین بهترین مرحله رسیدگی جنسی و همچنین سن برای دستیابی به بالاترین فراوانی از این سلول‌ها به عنوان گام مقدماتی و سپس جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیاز از بافت بیضه به عنوان گام اصلی، در زمینه تولید رده زایای کایمر در فیل ماهی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری گونه مورد مطالعه

در این پژوهش، فیل ماهیان مورد نیاز از مرکز تکثیر و پرورش آرام خاویار واقع در منطقه سنگر استان گیلان و پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر در منطقه فرح آباد ساری تهیه شد.

یک ساله در محدود وزنی ۲۹۰۰-۶۱۲/۵ گرم، ماهیان دو ساله در محدود وزنی ۵۹۵۰-۳۱۰۰ گرم و ماهیان سه ساله در محدود وزنی ۶۲۰۰-۹۸۰۰ گرم قرار داشتند. در مرحله بعدی بافت گناد با دقت از حفره شکمی خارج شد و پس از جدا کردن بخش چربی با ترازو دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شد (شکل ۱). به منظور بافت‌شناسی گناد از هر گناد سه قطعه (قسمت ابتدایی، میانی و انتهایی) در مجموع شش قطعه بافت از هر ماهی جدا شد و پس از تثبیت در محلول بوئن، مراحل آگیری،

شفاف‌سازی، پارافینه کردن و قالب‌گیری بر اساس روش Hewitson و Darby (۲۰۰۹) انجام گرفت. به صورت مختصر، ابتدا بافت‌های مورد نظر از اتانول با درجات مختلف به ترتیب ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد، بوتانول، زایلن و در نهایت پارافین عبور داده شدند. در مرحله بعد قالب‌گیری بافت‌ها در پارافین انجام شد. از دستگاه میکروتوم (Thermo HM 325، Walldorf، آلمان) به منظور برش بافت با ضخامت ۵ میکرومتر استفاده شد.



شکل ۱: حفره شکمی فیل ماهی نر یک ساله. دو نوار باریک که با فلش سیاه رنگ مشخص شده‌اند، بافت بیضه ماهی هستند.

تخم‌ریزی (VI): پس از تخم‌ریزی بیضه خالی از اسپرماتوزوآ شده و اسپرماتوگونیا در بیضه مشاهده می‌شود که نشان دهنده بازگشت ماهی به مرحله دوم است (Falahatkar et al., 2011, 2013; Falahatkar and Poursaeid, 2013).

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا یا اسپرماتوگونیای نوع A تمایز نیافته از سلول‌های تمایز یافته اسپرماتوگونیا بر اساس مطالعات Genten و همکاران (۲۰۰۹)، Nobrega و همکاران (۲۰۱۰)، Schulz و Nobrega (۲۰۱۱) و Lacerda و همکاران (۲۰۱۲) و (۲۰۱۴) انجام گرفت. در این مطالعه، سلول‌های اسپرماتوگونیا به دو دسته کلی اسپرماتوگونیای تمایز نیافته (SSCs) و اسپرماتوگونیای تمایز یافته (Sg) تقسیم‌بندی شدند. پس از شمارش سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در لوبول مورد نظر فراوانی (F_{Sp}) آنها با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (برای محاسبه فراوانی دیگر سلول‌های جنسی نیز از همین روش استفاده شد).

رابطه ۱:

$$F_{Sp} (\%) = (N_{Sp} / N_{TC}) \times 100$$

N_{Sp} : فراوانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در لوبول مورد نظر؛ N_{TC} : تعداد کل سلول‌ها در لوبول.

در گام بعدی با روش هماتوکسیلین-اُوزین مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت اسلایدهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, BX50, ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال (Olympus, DP70, ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور تعیین شاخص گنادی از نسبت وزن گناد (گرم) به وزن بدن (گرم) استفاده شد و مراحل رسیدگی جنسی ماهیان نر بر اساس کلید ۶ مرحله‌ای به این شرح معین شد: مرحله نابالغ (I): در بررسی میکروسکوپی تنها سلول‌های اسپرماتوگونیا در بافت بیضه قابل مشاهده است. مرحله در حال توسعه (II): بیضه غالباً حاوی سلول‌های اسپرماتوگونیا است. در این مرحله اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها نیز با فراوانی اندک حضور دارند. مرحله اسپرماتوژنز (III): در بررسی میکروسکوپی بافت بیضه تعداد یکسان سلول‌های اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوزوآ مشاهده می‌شود. مرحله قبل از تخم‌ریزی (IV): در این مرحله تعداد اسپرماتوگونیاهای به شدت کاهش می‌یابد، در حالی که غالباً لوبول‌ها از اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآها پر شده است. مرحله تخم‌ریزی (V): این مرحله با غالب شدن اسپرماتوزوآها در لوبول‌های بیضه مشخص می‌شود. مرحله بعد از

با استفاده از غلظت ۰/۰۵ درصد تری کائین متان سولفونات (MS-222؛ A5040، Sigma-Aldrich، آمریکا) تحت شرایط استریل خارج شد. پس از جدا کردن بافت چربی از گناد در زیر لوپ، گناد به قطعات ۱ میلی‌متر مکعبی تقسیم و به درون تیوب‌ها منتقل و هموژن شد. در مرحله بعدی، هضم آنزیمی با استفاده از دستور العمل‌های یاد شده به مدت ۲ تا ۳ ساعت در دمای ۱۶ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در انتهای مرحله هضم، پیتاژ ملایم به منظور تسریع فرآیند هضم آنزیمی انجام شد. سپس سوسپانسیون سلولی از فیلتر نایلونی (Partec، آلمان) با قطر ۴۰ میکرومتر به منظور جداسازی قطعات جدا نشده، عبور داده شد. در مرحله بعدی با استفاده از سرم ۱ درصد FBS (Sigma-Aldrich، آمریکا) به میزان ۲ میلی‌لیتر و انجام سانتریفیوژ با دور ۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، هضم آنزیمی متوقف شد. پس از انجام این مرحله سلول‌های جدا شده در کف به صورت پلاک مانند ته‌نشین شدند که با دقت جمع‌آوری و سپس بر اساس نوع دستور العمل مورد استفاده به محیط کشت L-15 یا PBS منتقل شدند. در مرحله آخر

جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیل ماهی

جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیل ماهی با روش کلی هضم آنزیمی بر مبنای دستور العمل‌های زیر انجام شد. گروه ۱: هضم آنزیمی مبتنی بر آنزیم تریپسین ۰/۱ درصد (Sigma-Aldrich، T1426، آمریکا) و کلاژناز ۰/۱ درصد (Sigma-Aldrich، Type I C0130، Type I C0130، آمریکا) به همراه ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت Leibovitz L-15 (Sigma-Aldrich، L5520، آمریکا) یا به همراه ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (Aldrich، Phosphate Buffered Saline:) (Sigma-Aldrich، P4417، آمریکا)، گروه ۲: هضم آنزیمی مبتنی بر آنزیم کلاژناز و محیط کشت Leibovitz L-15 یا به همراه PBS و گروه ۳: هضم آنزیمی مبتنی بر آنزیم تریپسین و محیط کشت Leibovitz L-15 یا به همراه PBS. برای گروه‌های دوم و سوم غلظت‌های آنزیم‌ها و ترکیبات دیگر مانند گروه اول در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها در ۵ تکرار زیستی انجام گرفت. بدین منظور، ابتدا بافت گناد از فیل ماهیان یک ساله با میانگین وزنی ۱۲۱۰/۳۶±۴۲۸/۰۷ گرم و میانگین طولی ۳/۴۵±۷۶/۳ سانتی‌متر که در مرحله رسیدگی جنسی نابالغ (I) بودند با اعمال بیهوشی عمیق

ارزیابی‌های مرتبط با تعداد سلول‌های به دست آمده و درصد زنده‌مانی انجام گرفت.

محاسبه تعداد سلول‌ها و درصد زنده‌مانی

تعداد سلول‌ها به وسیله لام نئوبار (Bruker's Cell Counting Chamber) در ۲۰ مربع در سه تکرار در زیر میکروسکوپ (Olympus, BH2، ژاپن) شمارش و از طریق رابطه ۲ تعداد کل سلول‌ها (C_T) محاسبه شد (Psenicka et al., 2015).

رابطه ۲:

$$C_T (\text{mL}^{-1}) = N_C \times D \times 10^4$$

N_C : میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده؛ D : ضریب رقت.

برای اندازه‌گیری درصد زنده‌مانی از کیت رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده و مرده (04511، Sigma-Aldrich، آمریکا) استفاده شد. در این روش با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو سلول‌های زنده از مرده تفکیک می‌شوند. برای این منظور، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر از تریپان بلو ترکیب شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از ترکیب حاضر به لام نئوبار منتقل شد و شمارش صورت گرفت. در نهایت با استفاده از نسبت سلول‌های زنده درصد زنده‌مانی (SR) از رابطه ۳ مشخص شد.

رابطه ۳:

$$SR (\%) = (N_L / N_T) \times 100$$

N_L : تعداد سلول‌های زنده؛ N_T : تعداد کل سلول‌ها.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها بررسی شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها، از آزمون‌های t -استیودنت و واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای مقایسه داده‌ها استفاده شد. به منظور مقایسه تفاوت میانگین‌ها از پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ برای بررسی‌های آماری داده‌ها و از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 به منظور رسم نمودارها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($Mean \pm SD$) نمایش داده شده است.

نتایج

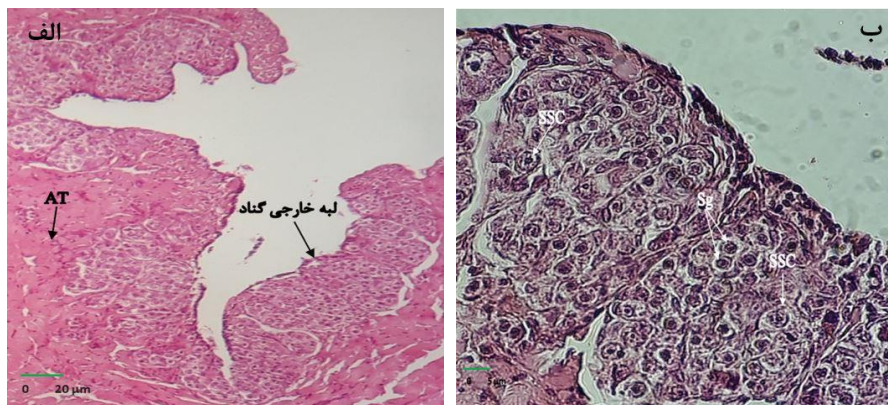
نتایج مطالعات بافت‌شناسی

بر اساس معیارهای تعریف شده در زمینه معرفی مراحل رسیدگی جنسی تاس‌ماهیان و همچنین معیارهای تعریف شده در زمینه شناسایی سلول‌های جنسی نر، در مقاطع

دیواره هسته منظم و فاقد چین خوردگی قابل شناسایی بودند.

در برش‌های بافت‌شناسی فیل ماهیان نر یک ساله، گناد از سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونیا تمایز نیافته و تمایز یافته تشکیل شده است و ماهی از نظر مرحله رسیدگی جنسی نابالغ است (مرحله رسیدگی جنسی I، نابالغ). سلول‌های اسپرماتوگونیی تمایز نیافته و تمایز یافته به وضوح در برش‌های بافت‌شناسی قابل مشاهده بودند. از لحاظ پراکندگی در ماهیان یک ساله در سراسر بافت بیضه سلول‌های اسپرماتوگونیی تمایز نیافته پراکنده و توسط سلول‌های سرتولی احاطه شده‌اند (شکل ۲).

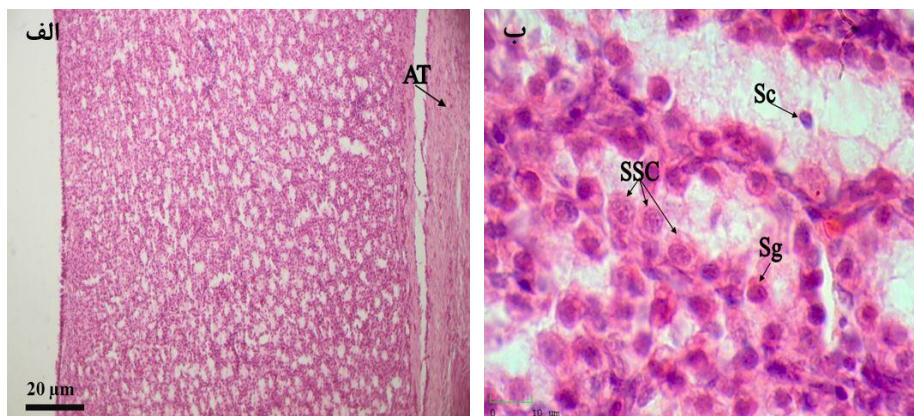
بافت‌شناسی به دست آمده از گناد فیل ماهیان نر یک تا سه ساله اقدام به شناسایی سلول‌های جنسی نر و به دست آوردن فراوانی آنها شد. در مطالعه حاضر سلول‌های اسپرماتوگونیا به دو دسته اسپرماتوگونیی تمایز یافته (Sg) و اسپرماتوگونیی تمایز نیافته (SSCs) تقسیم شد. اسپرماتوگونیی تمایز نیافته با خصوصیات بارزی چون سلول منفرد، هسته بسیار بزرگ و دیواره هسته چین خورده، هسته دارای یک یا دو هستک آشکار و حجم بالای سیتوپلاسم و اسپرماتوگونیی تمایز یافته با خصوصیات بارزی مانند حضور بیش از دو سلول در سیست، کاهش حجم هسته و سلول، افزایش تعداد هستک‌ها و



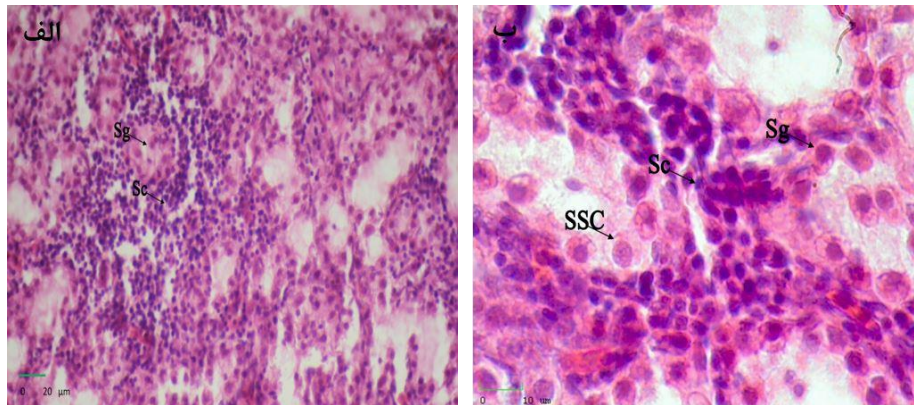
شکل ۲: برش عرضی از مقطع بافت بیضه فیل ماهی یک ساله با بزرگنمایی‌های مختلف (الف و ب). AT: بافت چربی (Adipose Tissue)؛ SSC: سلول بنیادی اسپرماتوگونیا؛ Sg: سلول‌های تمایز یافته اسپرماتوگونیا. ضخامت بافت: ۵ میکرومتر. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.

در فضای لومن برخی از لوبول‌ها سلول‌های اسپرماتید نیز حضور داشتند (شکل ۴). میانگین شاخص گنادی در فیل ماهیان نر یک ساله (با میانگین وزنی $1025/58 \pm 341/2$ گرم و میانگین طولی $69/32 \pm 4/83$ سانتی‌متر) $0/19 \pm 0/03$ درصد، در فیل ماهیان نر دو ساله (با میانگین وزن $4400 \pm 898/15$ گرم و طول $85/68 \pm 7/99$ سانتی‌متر) $0/21 \pm 0/02$ درصد و در ماهیان نر سه ساله (با میانگین وزنی $112/56 \pm 5/85$ گرم و طولی $7780 \pm 147/35$ سانتی‌متر) $0/45 \pm 0/02$ درصد به دست آمد (شکل ۵).

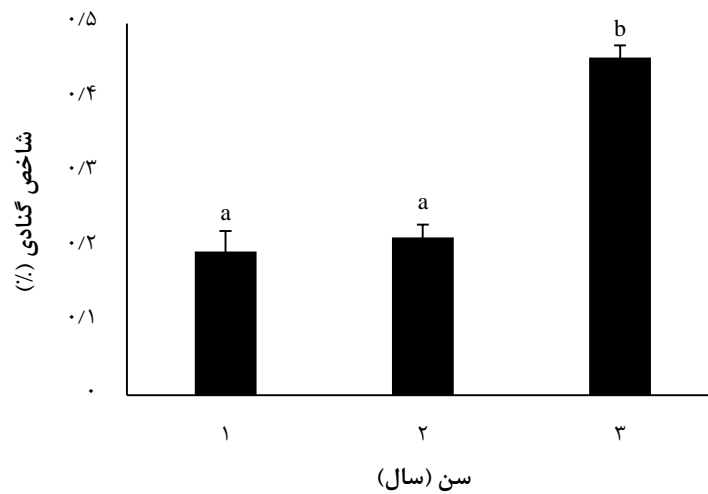
بررسی مقاطع بافت‌شناسی فیل ماهیان دو ساله، در کنار اسپرماتوگونیای سلول‌های اسپرماتوسیت را نیز نشان داد. در بافت بیضه، سلول‌های اسپرماتوگونیای تمایز یافته و اسپرماتوسیت‌ها به صورت دستجات سلولی در توبول مشاهده شدند و در کنار آنها اسپرماتوگونیای تمایز نیافته نیز به شکل سلول‌های منفرد مشاهده شد (شکل ۳). در مقاطع بافتی فیل ماهیان نر سه ساله، اسپرماتوگونیای تمایز نیافته به صورت محدودتری در کنار اسپرماتوگونیای تمایز یافته و اسپرماتوسیت‌ها مشاهده شد. در این ماهیان



شکل ۳: برش عرضی از مقطع بافت بیضه فیل ماهی دو ساله با بزرگنمایی‌های مختلف (الف و ب). AT: بافت چربی (Adipose Tissue)؛ SSC: سلول بنیادی اسپرماتوگونیای؛ Sg: سلول‌های تمایز یافته اسپرماتوگونیای؛ Sc: اسپرماتوسیت. ضخامت بافت: ۵ میکرومتر. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-آنوزین.



شکل ۴: برش عرضی از مقطع بافت بیضه فیلم ماهی سه ساله با بزرگنمایی‌های مختلف (الف و ب). Sg: سلول تمایز یافته اسپرماتوگونیا؛ Sc: اسپرماتوسیت؛ SSC: سلول بنیادی اسپرماتوگونیا. ضخامت بافت: ۵ میکرومتر. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین.



شکل ۵: مقایسه میانگین شاخص گنادی فیلم ماهی در سنین یک تا سه سال (میانگین \pm انحراف معیار). ستون‌های دارای حرف متفاوت با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

در این مطالعه، میانگین شاخص گنادی در نشان داد که ماهیان یک ساله دارای کمترین میزان شاخص گنادی، سپس ماهیان دو ساله و بین سنین مورد بررسی مقایسه شد و نتایج

ماهیان دو ساله و سه ساله می‌توان آنها را در مرحله II رسیدگی جنسی دانست که در واقع ماهیان در شروع مرحله اسپرماتوژنز قرار دارند. مقایسه فراوانی سلول‌های اسپرماتوگونیا تمایز نیافته یا سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در ماهیان یک تا سه ساله اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). در ماهیان یک ساله فراوانی به مراتب بالاتری به دست آمد. از سوی دیگر اثری از تمایز اسپرماتوگونیا به اسپرماتوسیت‌ها در این ماهیان مشاهده نشد. در فیل‌ماهیان دو ساله فراوانی این سلول‌های به شکل معنی‌داری کمتر از یک ساله و بیشتر از سه ساله بود ($P < 0/05$). در فیل‌ماهیان سه ساله فراوانی این سلول‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$; شکل ۶).

بررسی قطر سلول‌های اسپرماتوگونیا تمایز نیافته و اسپرماتوگونیا تمایز یافته نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میانگین قطر این دو نوع سلول وجود دارد ($P < 0/05$). قطر اسپرماتوگونیا تمایز نیافته در محدوده ۱۲/۱ تا ۱۴/۹ میکرومتر با میانگین $13/44 \pm 0/86$ میکرومتر به صورت معنی‌داری بالاتر از سلول‌های تمایز یافته در محدوده ۷/۴ تا ۱۲/۵ میکرومتر با میانگین $9/75 \pm 1/22$ میکرومتر بود ($P < 0/05$).

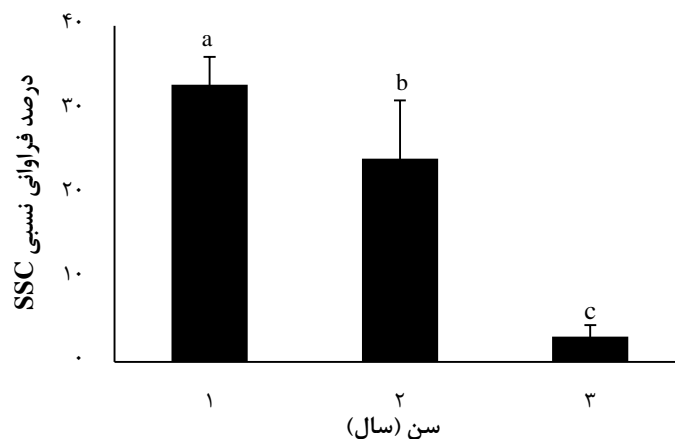
در نهایت ماهیان سه ساله بودند. شاخص گنادی ماهیان یک ساله و دو ساله با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$), در حالی که با ماهیان سه ساله اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0/05$; شکل ۵).

فراوانی اسپرماتوگونیاها در فیل‌ماهیان یک ساله مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا یا اسپرماتوگونیا تمایز نیافته به صورت معنی‌داری فراوانی کمتری نسبت به نوع تمایز یافته داشتند ($P < 0/05$). مقایسه فراوانی سلول‌های اسپرماتوگونیا در ماهیان دو ساله نشان داد که فراوانی سلول‌های اسپرماتوگونیا تمایز نیافته به صورت معنی‌داری کمتر از نوع تمایز یافته بود ($P < 0/05$). از سوی دیگر فراوانی اسپرماتوسیت‌ها به صورت معنی‌داری کمتر از فراوانی دو نوع اسپرماتوگونیا بود ($P < 0/05$). در ماهیان سه ساله فراوانی اسپرماتوگونیا تمایز نیافته به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد ($P < 0/05$). اسپرماتوگونیا تمایز یافته دارای فراوانی بالاتر نسبت به اسپرماتوسیت‌ها بودند، با این وجود اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). این تغییرات نشان از شروع فرآیند اسپرماتوژنز در بیضه دارد. با توجه به نوع سلول‌های زایا و درصد فراوانی آنها در بیضه

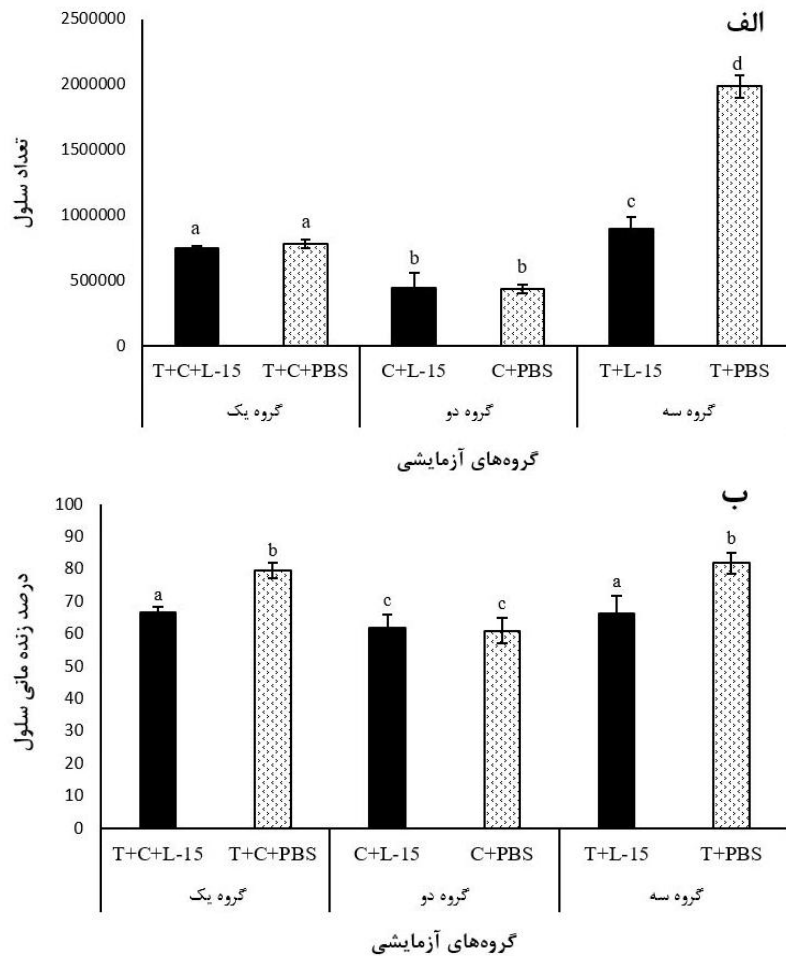
هضم آنزیمی به منظور جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیل ماهی بر اساس نتایج به دست آمده از میانگین ذخیره سلولی بعد از هضم آنزیمی در هر یک از روش‌های استفاده شده می‌توان اظهار داشت که حذف آنزیم کلاژناز به بهبود ذخیره سلولی ایجاد شده، منجر شد. میانگین ذخیره سلولی در حضور آنزیم کلاژناز به صورت معنی‌داری کمتر از روش‌های دیگر بود ($P < 0/05$). انجام هضم آنزیمی بر مبنای دو آنزیم تریپسین و کلاژناز دارای اختلاف معنی‌دار از نظر ذخیره سلولی با انجام هضم آنزیمی بر مبنای آنزیم تریپسین بود

از سوی دیگر، اثر استفاده از محیط کشت و بافر فسفات بر روی تعداد سلول‌های به دست آمده نشان داد محیط نمکی بافر فسفات در مقایسه با محیط کشت سبب تسهیل استحصال سلول‌های اسپرماتوگونیا در هر سه روش شد. نتایج نشان داد که هضم آنزیمی در حضور بافر فسفات به صورت معنی‌داری سبب افزایش ذخیره سلولی در گروه سه شد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۷-الف).

بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها بین هر سه گروه بعد از هضم آنزیمی اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$ ؛ شکل ۷-ب).



شکل ۶: مقایسه میانگین فراوانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا فیل ماهی در سنین یک تا سه سال (میانگین \pm انحراف معیار). ستون‌های دارای حرف متفاوت با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0/05$).



شکل ۷: میانگین تعداد سلول‌ها (الف) و درصد زنده‌مانی سلول‌ها (ب) بعد از انجام هضم آنزیمی به منظور استحصال سلول‌های اسپرماتوگونیای فیل ماهی (میانگین \pm انحراف معیار). T: آنزیم تریپسین؛ C: آنزیم کلاژناز؛ L-15: محیط کشت L-15؛ PBS: فسفات بافر. ستون‌های دارای حرف متفاوت با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

کمترین درصد زنده‌مانی به سلول‌های به دست آمده از روش هضم آنزیمی مبتنی بر کلاژناز تعلق داشت. در دو گروه دیگر زنده‌مانی سلول‌ها بعد از هضم آنزیمی بالاتر بود (بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها در گروه‌های یک و سه روند مشابهی را نشان داد).

از گروه ماهیان غضروفی استخوانی با نحوه پراکنش نامحدود سلول‌های زایا در بیضه است (Lacerda et al., 2012). بررسی‌های ریخت‌شناسی مطالعه حاضر نشان داد SSCs فیلماهی دارای خصوصیات مهمی چون منفرد بودن در درون سیست بیضه، اندازه بزرگ‌تر، پوشش هسته‌ای نامنظم با یک تا دو هستک آشکار و مشخص بودن اجزای هسته است و سلول‌های اسپرماتوگونیای تمایز یافته فیلماهی به وسیله ویژگی‌هایی چون کاهش اندازه سلول، حضور به صورت دو تا هشت عدد در سیست بیضه، پوشش هسته‌ای منظم‌تر و شکل کلی گرد و بیضوی مشخص‌تر نسبت به SSCs، از سلول‌های تمایز نیافته تفکیک می‌شوند. با توجه به مطالعات، سلول‌های اسپرماتوگونیای تمایز نیافته و تمایز یافته در قطر هسته، میزان کروماتین و غشای هسته با یکدیگر تفاوت دارند (Lacerda et al., 2014; Zhang et al., 2016; Robles et al., 2015). در مطالعات صورت گرفته در تاس‌ماهیان و آزادماهیان، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا ($SSCs = A$) به صورت منفرد در سیست بیضه حضور داشتند که با انجام مطالعات ایمنولوژیک با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی، سلول زایا و دورگه‌گیری در محل نیز مورد تایید واقع

در هر دو گروه زمانی که هضم آنزیمی در حضور بافر فسفات و محیط کشت انجام شد، درصد زنده‌مانی سلول‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) و سلول‌ها در حضور بافر فسفات دارای قدرت بقای بالاتری بودند (شکل ۷-ب). با توجه به میانگین ذخیره سلولی به دست آمده و همچنین میزان زنده‌مانی سلول‌ها می‌توان نتیجه گرفت که بهترین تیمار برای هضم آنزیمی، استفاده از آنزیم تریپسین به همراه محیط بافر فسفات بود، در این صورت می‌توان تعداد بیشتری سلول را با درصد بازماندگی بالاتر از بافت بیضه فیلماهی یک ساله استحصال کرد.

بحث

این مطالعه به عنوان اولین گزارش از شناسایی ویژگی‌های ظاهری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا و همچنین جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیلماهی محسوب می‌شود که نتایج به دست آمده می‌تواند در زمینه حفاظت غیرمستقیم از ذخیره ژنتیکی این ماهی ارزشمند از طریق تولید ماهی کایمر با استفاده از پیوند سلول‌های استحصال شده به لاروهای تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، مورد استفاده قرار گیرد. فیلماهی

موفقیت پیوند این سلول‌ها و همچنین میزان تکثیر سلول‌های کلون شده با استفاده از سلول‌های اسپرماتوگونیا جداسازی شده از بافت بیضه ماهیان بالغ در مقایسه با ماهیان نابالغ به صورت معنی‌داری پایین‌تر است (Sato et al., 2017). بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده مبتنی بر فراوانی SSCs و همچنین دشواری خالص‌سازی SSCs از ماهیان با سن بالاتر، کاهش فراوانی این سلول‌ها در ماهیان با مرحله رسیدگی جنسی بالاتر و پتانسیل این سلول‌ها در زمان پیوند و کلون شدن تحت شرایط آزمایشگاهی، به نظر می‌رسد که استحصال سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا از ماهیان یک ساله با مرحله رسیدگی جنسی نابالغ و میزان شاخص گنادی ۰/۱۹ درصد برای اهداف مطالعه حاضر گزینه مناسب‌تری نسبت به دیگر مراحل رسیدگی جنسی باشد.

بهینه‌سازی روش هضم آنزیمی با توجه به نوع گونه مورد مطالعه، سن جاندار و نوع بافت در فرآیند جداسازی سلول اسپرماتوگونیا از بافت بیضه بسیار حائز اهمیت است (Poursaeid et al., 2020). در مطالعه حاضر به منظور به دست آوردن روش بهینه برای استحصال سلول اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیل ماهی یک ساله، کارایی سه روش هضم آنزیمی مورد بررسی قرار

شده است (پورسعید و همکاران، ۱۳۹۸؛ Xie et al., 2019؛ Psenicka et al., 2015؛ Poursaeid et al., 2020). در مطالعه حاضر، بیضه فیل ماهیان یک ساله مملو از سلول‌های اسپرماتوگونیا تمایز یافته و نیافته بود که توسط سلول‌های سرتولی احاطه شده بودند، در ماهیان دو ساله در بافت بیضه تمایز اسپرماتوگونیا به اسپرماتوسیت و در ماهیان سه ساله در کنار سلول‌های یاد شده تا حدود اسپرماتید نیز مشاهده شد. بر این اساس، فیل ماهیان یک ساله نابالغ (مرحله I) و فیل ماهیان دو و سه ساله در مرحله شروع اسپرماتوژنز (مرحله II) قرار داشتند. مطالعات متعددی در ارتباط با فراوانی سلول‌های زایای نر و رشد و تکوین گنادی صورت گرفته و نشان داده است که همزمان با رشد و تکامل گنادی، SSCs به دیگر سلول‌های زایای جنسی نر متمایز شده و به تدریج از فراوانی آنها در بیضه کاسته می‌شود (Falahatkar et al., 2013؛ Psenicka et al., 2015؛ Poursaeid et al., 2020). با این وجود، در تمام مراحل رسیدگی جنسی حضور دارند. از سوی دیگر، نتایج نشان داده است که تمایل به تمایز سلول‌های اسپرماتوگونیا تمایز نیافته در ماهیان بالغ بیشتر از ماهیان نابالغ است به طوری که میزان

زمانی که سوسپانسیون سلولی در مجاورت محیط کشت L-15 قرار گرفت، به شدت کاهش یافت. به علاوه، نتایج کلی نشان داد هضم آنزیمی همراه با بافر فسفات می‌تواند منجر به جداسازی تعداد بیشتر سلول و با زنده‌مانی بالاتر از بافت بیضه شود. در واقع از آنجایی که بافر فسفات سبب ایجاد شرایطی مشابه با محیط بدن فیل‌ماهی از نظر فشار اسمزی (۲۳۸ میلی‌اسمول در کیلوگرم) در مراحل هضم آنزیمی می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت فیزیولوژی موجود زنده و شرایط پرورش آن از عوامل بسیار مهم در انتخاب شرایط برای استحصال سلول از طریق هضم آنزیمی است. شرایط پرورشی بهینه گونه مورد نظر می‌تواند به عنوان عامل مهمی به منظور انتخاب دما، مدت و نوع سوسپانسیون مورد استفاده برای هضم آنزیمی محسوب شود (Psenicka et al., 2015). در پژوهش حاضر مشخص شد که آنزیم تریپسین با غلظت ۰/۱ درصد در دمای ۱۶ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت می‌تواند برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیا از بیضه فیل‌ماهی باشد. این شرایط سبب استحصال ذخیره سلولی با میانگین $1.05 \times 10^5 \pm 0.8/19$ سلول از کل بافت بیضه بدون کاهش نرخ زنده‌مانی (میانگین درصد زنده‌مانی

گرفت. انتخاب روش بهینه هضم آنزیمی بر اساس میزان ذخیره سلولی به دست آمده و درصد زنده‌مانی سلول‌های استحصال شده در نظر گرفته شد که تحت تاثیر عواملی چون نوع آنزیم (آنزیم تریپسین، آنزیم کلاژناز و یا آنزیم تریپسین به همراه آنزیم کلاژناز) و بستر مورد استفاده برای هضم آنزیمی (هضم آنزیمی در محیط کشت L-15، هضم آنزیمی در حضور بافر فسفات) قرار داشت. نتایج نهایی نشان داد حضور آنزیم تریپسین می‌تواند شرایط هضم آنزیمی را بهبود بخشد. با این حال استفاده توأم از آنزیم‌های تریپسین و کلاژناز روشی کارا برای جداسازی اسپرماتوگونیا از بافت بیضه فیل‌ماهی نیست، اما زمانی که آنزیم تریپسین به تنهایی مورد استفاده قرار گرفت، ذخیره و درصد زنده‌مانی سلول‌های استحصال شده افزایش یافت. از سوی دیگر، در مطالعه حاضر اثر محیط کشت L-15 و بافر فسفات نیز مورد توجه قرار گرفت. یافته‌های عملی نشان داد بافر فسفات قادر است در دمای یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) تا حداکثر ۲۴ ساعت سوسپانسیون سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونیا را بدون اثر منفی روی زنده‌مانی نگه‌داری کند، در حالی که در همین دما مدت زمان نگه‌داری سلول‌های اسپرماتوگونیا بدون اثر منفی روی زنده‌مانی آنها

سلول‌ها تا حدودی می‌توانند قابلیت تکثیر شدن خود را زمانی که در حفره صفاقی میزبان جاگیری می‌کنند (به عنوان محیط کشت) دوباره به دست آورند. با این وجود به مطالعات بیشتری برای بررسی اثر آنزیم تریپسین روی فعالیت میتوزی سلول‌های اسپرماتوگونیا مورد نیاز است تا بتوان به صورت قاطعانه در مورد بهبودی دوباره قابلیت تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی و همچنین در شرایط درون تنی اظهار نظر کرد.

در مجموع، اندازه سلول، پوشش هسته‌ای نامنظم، اجزای هسته‌ای مشخص و وجود هستک‌ها اطراف هسته از مهم‌ترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا فیل ماهی است. جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیا از فیل ماهیان نابالغ در مرحله رسیدگی I بر اساس روش هضم آنزیمی مبتنی بر آنزیم تریپسین توانست ذخیره سلولی با تعداد بالا و درصد زنده‌مانی بالا را فراهم آورد، به طوری که می‌توان با استناد به این روش، دیگر گام‌های مربوط به خالص‌سازی سلول بنیادی اسپرماتوگونیا و پیوند آن به تاس ماهی استرلیاد به منظور تولید ماهی کایمر را انجام داد. این اقدامات می‌تواند به عنوان روشی موثر در جهت حفاظت غیرمستقیم

سلول‌ها $۸۱/۹ \pm ۳/۲۶$ درصد) شد. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با مطالعات انجام شده در مورد تاس‌ماهیان دیگر مطابقت دارد (Psenicka et al., 2015, 2016; Xie et al., 2019). امروزه پژوهشگران از تیمار سلول‌های بنیادی با آنزیم تریپسین اجتناب می‌کنند. به عنوان مثال، در مطالعات Shikina و همکاران (۲۰۱۳) ثابت شد که تخریب پروتئین‌های غشای سلول‌های اسپرماتوگونیا در قزل‌آلای رنگین‌کمان به علت انکوبه شدن بافت بیضه با آنزیم تریپسین در جریان هضم آنزیمی است که به شکل قابل توجهی سبب کاهش قابلیت فعالیت میتوزی سلول‌های استحصالی، شده است (Shikina et al., 2013). پروتئین‌های غشایی در اتصالات بین سلولی، سلول و محیط خارج سلولی و در نتیجه ویژگی بنیادی بودن سلول نقش بسیار مهمی دارند. از سوی دیگر، بهبود دوباره اسپرماتوگونیاها به وسیله کشت کوتاه مدت آنها امکان‌پذیر است (Psenicka et al., 2015; Xie et al., 2019). در مطالعه حاضر، انکوبه کردن با تریپسین به عنوان یک روش کارآمد برای جداسازی سلول تعیین شد و سلول‌های استحصال شده قابلیت تکثیر بعد از پیوند را همانند خود سلول‌های میزبان داشتند (داده‌های منتشر نشده) که نشان می‌دهد

از منابع ژنتیکی این ماهی در معرض خطر تمام کسانی که در زمینه اجرایی شدن این پژوهش یاری رسانده‌اند کمال تشکر و سپاس را محسوب شود.

داریم.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس و

منابع

- رونوشت *Vasa* در بافت بیضه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) با شیوه دورگه‌سازی در محل (In Situ Hybridization). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۷(۱): ۳۷-۲۳.
- نوروزی ک.، کلباسی م.ر.، فرزانه پ.، شاهزاده فضلی س.ا.، فرقدان م.، نسیمیان ا.، ایزدپناه م.، آشوری موثق س.، مرادمندی ز. و فرهنگ‌نیا م. ۱۳۹۳. تولید و ارزیابی رده سلولی اپیتلیالی شکل از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲(۳): ۸۸-۶۹.
- اسماعیلی ا.ح.، کلباسی م.ر.، بهاروند ح. و حسینی س.ن. ۱۳۹۴. مطالعه بیان ژن‌های پرتوانی در مراحل مختلف تکوین جنینی ماهی گورخری (*Danio rerio*). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۳(۱): ۱۱۱-۹۳.
- امامی لنگرودی ف.، میرواقفی ع.، فرهنگ‌نیا ح. و مجازی امیری ب. ۱۳۹۵. بررسی بافت‌شناسی گناد فیل ماهیان پرورشی یکساله و دو ساله در استان قم. شیلات (منابع طبیعی ایران)، ۶۹(۳): ۳۳۰-۳۳۳.
- پورسعید س.، کلباسی م.ر.، حسینی س.ن.، یوشیزاکی گ. و بهاروند ح. ۱۳۹۸. مکان‌یابی *Huso huso* L. through biopsy. Iranian Journal of Veterinary Research, 14(2): 133-139.
- Falahatkar B., Tolouei Gilani M.H., Falahatkar S. and Abbasalizadeh A. 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. Aquaculture, 321(3-4): 273-279.
- Genten F., Terwinghe E. and Danguy A. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers, USA. 219P.
- Hewitson T. and Darby I. 2009. Histology Protocols. Human Press, P: 225.
- Higaki S., Shimada M., Kawamoto K., Todo T., Kawasaki T., Brinster R.L. and Avarbock M.R. 1994. Germ line transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(24): 11303-11307.
- Falahatkar B. and Poursaeid S. 2013. Gender identification in great sturgeon (*Huso huso*) using morphology, sex steroids histology and endoscopy. Anatomia, Histologia, Embryologia, 43(2): 81-89.
- Falahatkar B., Akhavan S.R., Tolouei Gilani M.H. and Abbasalizadeh A. 2013. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon,

- Tooyama I., Fujioka Y., Sakai N. and Takada T. 2017.** In vitro differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). *Scientific Reports*, 17(7): 1–14 (e42852).
- Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Miki H., Ogura A., Toyokuni S. and Shinohara T. 2003.** Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction*, 69(2): 612–616.
- Lacerda S.M.S.N., Aponte P.M., Costa G.M.J., Campos-Junior P.H.A. and Segatelli T.M. 2012.** An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. *Animal Reproduction*, 9(4): 798–808.
- Lacerda S.M.S.N., Batlouni S.R., Costa G.M., Segatelli T.M., Quirino B.R., Queiroz B.M., Kalapothakis E. and França L.R. 2010.** A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS One*, 5(5): 1–9 (e10740).
- Lacerda S.M.S.N., Costa G.M.J. and Franca L.R. 2014.** Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *General and Comparative Endocrinology*, 207(1): 56–65.
- Nobrega R.H., Greebe C.D., Van De Kant H., Bogerd J., França L.R. and Schulz R.W. 2010.** Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One*, 5(9): 1–16 (12808).
- Okutsu T., Shikina S., Kanno M., Takeuchi Y. and Yoshizaki G. 2007.** Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317(5844): 1–2 (e1517).
- Poursaeid S., Kalbassi M.R., Hassani N. and Baharvand H. 2020.** Isolation, characterization, in vitro expansion and transplantation of Caspian trout (*Salmo caspius*) type a spermatogonia. *General and Comparative Endocrinology*, 289(1): 1–13 (e113341).
- Psenicka M. and Saito T. 2020.** Specificity of germ cell technologies in sturgeons. P: 336–357. In: Yoshida M. and Asturiano J. (Eds.). *Reproduction in Aquatic Animal*. Springer, Singapore.
- Psenicka M., Saito T., Linhartova Z. and Gazo I. 2015.** Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology*, 83(6): 1085–1092.
- Psenicka M., Saito T., Rodina M. and Dzyuba B. 2016.** Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole

- tissue and dissociated cells. *Cryobiology*, 72(2): 119–122.
- Robles V., Riesco M.F., Psenicka M., Saito T., Valcarce D.G., Cabrita E. and Herraes P. 2016.** Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*, 472(1): 4–20.
- Sato M., Hayashi M. and Yoshizaki G. 2017.** Stem cell activity of type A spermatogonia is seasonally regulated in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 96(6): 1303–1316.
- Schulz R.W. and Nobrega R.H. 2011.** Anatomy and histology of fish testis. P: 616–626. In: Farrell A.P. (Ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Vol. 1. Academic Press, USA.
- Shang M., Su B., Lipke E.A., Perera D.A., Li C., Qin Z., Li Y., Dunn D.A., Cek S., Peatman E. and Dunham R.A. 2015.** Spermatogonial stem cells specific marker identification in channel catfish, *Ictalurus punctatus* and blue catfish, *I. furcatus*. *Fish Physiology Biochemistry*, 41(6): 1545–1556.
- Shikina S., Nagasawa K., Hayashi M., Furuya M., Iwasaki Y. and Yoshizaki G. 2013.** Short-term in vitro culturing improves transplantability of type A spermatogonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 80(9): 763–773.
- Tonelli F.M.P., Lacerda S.M.S.N., Paiva N.C.O., Lemos M.S., De Jesus A.C., Pacheco F.G., Correa Junior J.D., Ladeira L.O., Furtado C.A., França L.R. and Resende R.R. 2016.** Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials. *RSC Advances*, 6(58): 52636–52641.
- Xie X., Li P., Psenicka M., Ye H., Steinbach C., Li C. and Wei Q. 2019.** Optimization of in vitro culture conditions of sturgeon germ cells for purpose of surrogate production. *Animals*, 9(3): 1–16 (e106).
- Xie X., Nobrega R. and Psenicka M. 2020.** Spermatogonial stem cells in fish: Characterization, isolation, enrichment, and recent advances of in vitro culture systems. *Biomolecules*, 10(4): 1–31 (e664).
- Zhang R., Sun J. and Zou K. 2015.** Advances in isolation methods for spermatogonial stem cells. *Stem Cell Review and Reports*, 12(1): 15–25.



Research Paper

Identification and isolation of spermatogonial stem cells from beluga (*Huso huso*) testicular tissue

Mahsa Borhani¹, Mohammad Reza Kalbasi^{2*}, Martin Psenicka³, Bahram Falahatkar⁴, Alexander Dettmar Crawford⁵

Received: August 2021

Accepted: October 2021

Abstract

Spermatogonial stem cells (SSCs) are unique cells and able to transmit genetic information to the next generation, therefore, they play an important role in chimeric fish production and preservation of rare species. This study was performed for the first time with the aim of examining morphology of spermatogonial cells through histological method and then isolating them through enzymatic digestion method from beluga (*Huso huso*) testicular tissue. Histological examination of testicular tissue of one- to three-year-old beluga showed there are two general types of spermatogonial cells, undifferentiated spermatogonia (SSCs) and differentiated spermatogonia. SSCs were often identified by their large size, irregular nuclear envelope, distinct nuclear components and one to two nuclei. Moreover, in one-year-old fish the frequency of SSCs was significantly higher than 2 and 3-year-old beluga ($P < 0.05$). Isolation of testicular tissue cells of one-year-old beluga through enzymatic digestion was indicated that using 0.1% trypsin enzyme with phosphate buffer for 2 to 3 hours at 16-20°C has higher efficiency based on frequency and viability of beluga spermatogonial cells ($P < 0.05$). This study has provided basic information for isolation beluga SSCs for transplantation to produce chimeric fish.

Key words: *SSCs, Histology, Enzymatic Digestion, Beluga, Chimeric Fish.*

1- Ph.D. Student in Fisheries Science, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Associate Professor in Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Faculty of Fisheries and Protections of Waters, South Bohemia University, Ceske Budejovice, Czech.

4- Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.

5- Associate Professor in Department of Preclinical Sciences and Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, Oslo, Norway.

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir