



تأثیر محافظتی آلفالیپوئیک اسید بر الگوی بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی در فرایند انجماد

کاظم نوروزی^۱، حسن نظری^{۲*}، ابراهیم احمدی^۲، ناصر شمسی اسفندآبادی^۲، آرزیتا افضلی^{۳،۴}

۱. دانشجوی دکترای تخصصی فناوری‌های تولیدمثل در دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.
۲. پژوهشکده فناوری جنین دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.
۴. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان-ایران.
۵. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، پژوهشکده علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان-ایران.

پذیرش: ۴ خردادماه ۱۴۰۵

دریافت: ۲۰ فروردین‌ماه ۱۴۰۵

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی آلفالیپوئیک اسید (ALA) بر آسیب ناشی از انجماد-ذوب سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) موش نابالغ از طریق ارزیابی بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز بود. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه موش‌های ۴-۸ روزه نژاد C57 جدا شده و پس از تأیید هویت با روش‌های ایمونوسیتوشیمی (نشانگر PLZF) و سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز، به مدت سه هفته کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در چهار گروه انجمادی شامل کنترل (بدون آنتی‌اکسیدان) و سه دوز ۰/۲، ۱ و ۵ میکرومولار آلفالیپوئیک اسید منجمد شدند. پس از ذوب، بیان ژن‌های *Casp3*، *Bcl2*، *Bax* و *Casp9* با روش Real-time PCR بررسی گردید. نتایج نشان داد که غلظت ۱ میکرومولار ALA به‌طور معنی‌داری بیان ژن پروآپوپتوتیک *Bax* و نیز ژن‌های *Casp3* و *Casp9* را کاهش و بیان ژن ضد آپوپتوتیک BCL2 را افزایش می‌دهد ($P < 0/05$). غلظت ۰/۲ میکرومولار نیز کاهش معنی‌داری در بیان *Casp3* و *Bax* ایجاد کرد. بالاترین دوز (۵ میکرومولار) اثر معنی‌داری نداشت. می‌توان نتیجه گرفت که آلفا لیپوئیک اسید، به‌ویژه در غلظت ۱ میکرومولار، با تعدیل بیان ژن‌های کلیدی آپوپتوز می‌تواند از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش در برابر آسیب ناشی از فرایند انجماد-ذوب محافظت کند و به‌عنوان یک افزودنی مؤثر در محیط انجماد این سلول‌ها پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، آلفا لیپوئیک اسید، انجماد، آپوپتوز، بیان ژن، موش

مقدمه

ناباروری امروزه یک چالش بزرگ علم پزشکی است که در جنس نر به دلیل در دسترس بودن اسپرم با استفاده از آنالیز اسپرم مورد بررسی قرار می‌گیرد. بسیاری از مطالعات اسپرم نشان داده‌اند که شیمی‌درمانی و رادیوتراپی می‌تواند کیفیت اسپرم را هم در سرطان‌های مربوط به دستگاه تناسلی (۱۹) و هم در سرطان‌های دیگر (۳۷، ۴۵) تحت‌تأثیر قرار دهند. به‌عنوان مثال لوسمی لنفوبلاستیک

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به مجموعه‌ای از سلول‌های بنیادی با قابلیت خود نوزایی گفته می‌شود که در طول حیات در لوله‌های اسپرم ساز بافت بیضه حضور دارند و به همین واسطه نقشی حیاتی در فرایند اسپرماتوژنز و حفظ باروری ایفا می‌کنند؛ بنابراین حفظ و ذخیره سازی آن‌ها می‌تواند منجر به حفظ باروری در آینده شود (۱۵).



اسمزی و مکانیکی ناشی از کریستال‌های یخ درون سلولی و خارج سلولی، آسیب DNA، پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین را به کمترین حد برساند و کارایی انجماد را افزایش دهد (۳۰).

آلفا لیپوئیک اسید (ALA) نوعی ترکیب طبیعی بی‌خطر حاوی سولفور است که از اسید اکتانوئیک مشتق می‌شود (۴۸). ALA یک آنتی‌اکسیدان درمانی بالقوه است که در آب و چربی حل می‌شود و به راحتی از غشا عبور کرده و خود را به تمام اجزای سلولی می‌رساند این ماده همچنین به عنوان یک کوفاکتور ضروری برای آنزیم آلفا کتواسید دهیدروژناز میتوکندریایی مورد نیاز است ALA در تنظیم تثبیت کمپلکس‌های چند آنزیمی موجود در میتوکندری نقش مهمی دارد و از همین مسیر منجر به جذب گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد و از اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها ممانعت می‌کند. ALA گلوکاتیون را سنتز می‌کند و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون پراکسیداز را افزایش می‌دهد (۳۶). تا کنون مطالعات بسیاری در خصوص تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر فعالیت سلول‌های بنیادی متعاقب انجماد و ذوب انجام شده است (۴۶)؛ به عنوان مثال مطالعات جدید نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند رزوراترول (۴۶، ۵۱) و ملاتونین (۲۸)، فعالیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در موش متعاقب انجماد و ذوب بهبود می‌بخشند و موجب افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و مهار آپوپتوز می‌شوند. آنتی‌اکسیدان ALA اگرچه هنوز در روش‌های انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده نشده است؛ ولی در برخی از مطالعات در شرایط آزمایشگاهی برای ساختارهای فولیکولی (۴۶) و نیز تخمک مفید واقع گردیده است (۵۶).

با در نظر گرفتن طراحی مدل حیوانی حفظ باروری به منظور استفاده از تحقیقات انسانی در سرطان کودکان، هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی آلفا لیپوئیک بر آسیب انجماد - ذوب سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نابالغ با استفاده از بررسی بیان برخی ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر Bax

حاد، سرطان شایع در دوران کودکی است که مطالعاتی نظیر مطالعه Poganitsch - Korhonen و همکاران نشان می‌دهد مقدار سلول‌های اسپرماتوگونی متعاقب شیمی درمانی، در بیوپسی از بافت بیضه کاهش می‌یابد (۴۰)؛ بنابراین راه‌حل حفظ باروری در چنین شرایطی نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به صورت منجمد در پسران نابالغ است. از آنجایی که در این سنین بلوغ رخ نداده است، اسپرم برای نگهداری وجود ندارد. از سویی دیگر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توانمند بیشتری در سنین قبل از بلوغ در بافت بیضه وجود دارد. بنابراین در چنین مواردی انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی به جای اسپرم می‌تواند گزینه مطلوبی برای حفظ باروری در این دست از بیماران باشد که معمولاً به دو صورت انجماد آهسته یا سریع (انجماد شیشه‌ای) انجام می‌شود (۴).

مطالعات *in vitro* و *in vivo* بسیاری هم برای مدل‌سازی آسیب بافت بیضه و هم برای اثرات مداخلات مختلف نظیر القای سمیت سلولی، استرس اکسیداتیو یا همان القای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای آپوپتوز انجام شده است هستند (۸). به عنوان مثال برای مدل‌های *in vivo*، پیچش بیضه (detorsion) برای القای ROS (۲۴)، سمیت جنتامایسین (۵)، یا القای تخریب بافت بیضه با سیس‌پلاتین (۵۳) و در مدل‌های *in vitro* آسیب انجماد-ذوب ذکر شده‌اند و در کنار آن مداخلاتی نظیر اثر آنتی‌اکسیدان‌ها شامل آستانزان‌تین (۲، ۱۴)، ملاتونین (۱۳)، گرلین (۱۸)، سلنیوم (۲۳) و غیره به کار گرفته شده است. در بین مدل‌سازی‌ها و مداخلات انجام شده در مطالعات گذشته، فرایند انجماد - ذوب ممکن است موجب آسیب به سلول‌های اسپرماتوگونی شود؛ بنابراین مداخلات کمکی باید برای کاهش این آسیب انجام شود و بررسی تمامی این مسائل نیازمند مدل حیوانی نظیر موش است.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ملاتونین (۲۶)، رزوراترول (۳۱)، لیکوپن (۴۹)، α -توکوفرول و اسید اسکوربیک (۱۷) به محیط‌های انجماد می‌تواند از استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از تولید ROS اضافی جلوگیری کند و صدمات



دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ با رطوبت حداکثر برای مدت زمان ۱ ساعت انجام شد. سپس سلول‌های شناور، در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی (LIF)، ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده سلولی گلیال (GDNF) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) به مدت ۳ هفته در انکوباتور ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند و در طول دوره کشت هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت با محیط کشت تازه جایگزین شد.

به‌منظور تأیید سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از دو روش ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های ویژه این سلول‌ها با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی و بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز استفاده شد. برای تعیین درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خالص شده، نشانگر اختصاصی لوسمی پرومیلوسیتیک انگشت روی (PLZF) در سلول‌های زایا با استفاده از ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور پس از سه هفته کشت سلول‌ها در پتری‌دیش‌های ۱۲ خانه، سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد (مرک، Darmstadt، آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شده و پس از نفوذپذیر کردن با تریتون X100 ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۴۵ دقیقه به‌منظور بلاک کردن واکنش آنتی‌بادی ثانویه به نمونه‌ها اضافه شد. پس از حذف سرم بز، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های اولیه ضد PLZF (ab104854; Abcam, Cambridge) رقیق شده با PBS به میزان ۱ به ۱۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در یخچال انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها ۴ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS، شستشو داده شدند، سپس آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (goat anti-rabbit IgG H&L; ab6717, Abcam) کانژوگه شده با FITC با رقت ۱ به ۱۵۰ به نمونه‌ها اضافه و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت ۳۰ دقیقه انکوبه و در نهایت هسته سلول‌ها با DAPI (سیگما،

پروآپوپتوتیک)، *Bcl2* (ضد آپوپتوتیک)، *Caspase-3*، *Caspase-9* (*Casp9*) و *SOD2* (آنزیم آنتی‌اکسیدان) بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد ۳۲ موش نر نابالغ نژاد C57 از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه شد. این حیوانات در کنار موش‌های مادر که در دما و رطوبت استاندارد با چرخه نور تا تاریکی ۱۲/۱۲ ساعت، دسترسی آزاد به آب و غذا و شرایط عاری از پاتوژن نگهداری می‌شدند قرار داشتند. کلیه آزمایش‌های مربوط به استفاده از حیوانات در این مطالعه پس از اخذ مصوبه کارگروه اخلاق در پژوهش (IR.SKU.REC.1403.048) انجام شد.

بیضه‌ها از موش‌های نر ۴ تا ۸ روزه (۸ موش در هر تکرار) به دست آمد و سلول‌های بیضه طبق یک پروتکل هضم آنزیمی دو مرحله‌ای جدا شدند (۲۲). برای این منظور موش‌های نابالغ پس از بی‌هوش کردن با کلروفورم، کشته شدند. سپس بیضه‌های آن‌ها در زیر استریومیکروسکوپ از محوطه بطنی موش‌ها خارج و پس از حذف کامل چربی‌های اضافه و تونیکا آلبوژینا از سطح خارجی بیضه، با استفاده از دو نیدل انسولینی به قطعات کوچک خرد شدند (شکل ۳-۲). در نهایت بافت کاملاً خرد شده پس از شستشو با محیط کشت پایه به‌منظور جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به محیط هضم آنزیمی اول برای مدت ۲۰ دقیقه و سپس به محیط هضم آنزیمی دوم به مدت ۱۵ دقیقه منتقل شدند. محیط‌های هضم آنزیمی شامل محیط DMEM/F12 حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیالورونیداز، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز نوع IV و ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر DNase بودند.

به‌منظور کاهش و حذف سلول‌های تمایز یافته و سوماتیک، جداسازی سلول‌های زایای تمایز نیافته با روش differential plating با کشت یک‌ساعته سلول‌های بیضه‌ای به‌دست‌آمده در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco, Paisley, UK) در



انجماد بین کنترل (محیط انجماد پایه) و تیمارها (محیط انجماد پایه + آلفالیپوئیک اسید (ALA); سیگما، سنت‌لوئیس، MO، ایالات متحده) در سه دوز) با استفاده از روش ارزیابی بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز با استفاده از Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

دوزهای به‌کاررفته برای آلفالیپوئیک اسید به ترتیب ۰/۲ میکرومولار (ALA0.2)، ۱ میکرومولار (ALA1) و ۵ میکرومولار (ALA5) بود. ارزیابی بیان ژن در هر گروه در پنج تکرار و به‌صورت مضاعف (Duplicated) انجام شد. استخراج RNA از سلول‌ها طبق پروتکل کیت خریداری شده (ویراژن، ایران) انجام و میزان خلوص نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (LSPR and Micro-Volume Spectrophotometer System, Nano Mabna Co) در طول موج‌های ۲۸۰/۲۶۰ و ۲۳۰/۲۶۰ مشخص گردید. برای سنتز cDNA نیز از کیت سنتز cDNA شرکت یکتاتجهیز آزما (cDNA Synthesis Kit; Cat No: YT4500) استفاده شد. در نهایت نمونه‌ها برای Real-time PCR تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه سنجش میزان بیان ژن‌های *Bax*، *Casp3*، *Casp9* و *Bcl2* در قیاس با *Gapdh* به‌عنوان ژن مرجع با تکنیک Real-time PCR با استفاده از دستگاه روتورژن ۶۰۰۰ شرکت کایژن آمریکا، برطبق کیت شرکت آمپلیکون (RealQ Plus 2x Master Mix Green) انجام شد.

توالی کلیه پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. به‌طور مختصر برای هر واکنش (نمونه) ۵ میکرولیتر سایبرگرین، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس، ۰/۵ میکرولیتر نمونه cDNA و ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شدند (حجم کل هر واکنش ۱۰ میکرولیتر). سپس فرایند با برنامه جدول ۲ و ۳ دنبال شد.

D9542 سنت‌لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) رنگ‌آمیزی شدند. پس از ۲۰ دقیقه نمونه‌ها مجدداً با PBS شسته شدند. برای کنترل منفی‌ها، فقط از آنتی‌بادی‌های ثانویه استفاده شد. نسبت سلول‌های مثبت با تقسیم تعداد سلول‌های مثبت بر تعداد کل سلول‌ها محاسبه شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

در بررسی فعالیت آلكالین فسفاتاز، سلول‌ها در پارافرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند و پس از شستشو با رنگ آلكالین به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور شدند. پس از آن، سلول‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ اینورت (IX71 Olympus، ژاپن) به‌منظور رؤیت کلتی‌های قرمز روشن نشان‌دهنده بیان آلكالین فسفاتاز بررسی شدند (۵۰).

انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیز ۳ هفته پس از کشت سلولی انجام شد. برای این منظور سلول‌های کشت داده شده در فلاسک‌های کشت سلول تریپسینه شده و سوسپانسیونی از آن‌ها آماده شد. محیط انجماد پایه مورد استفاده برای انجماد سلول‌ها شامل محیط کشت پایه حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱/۴ مول دی‌متیل سولفو کسید بود. انجماد سلول‌ها طبق طراحی آزمایش، در ۴ گروه و در هر گروه ۵ تکرار انجام شد. محلول‌های انجماد به‌آرامی به کرایوپوئال‌های ۱/۸ میلی‌لیتری حاوی سوسپانسیون سلولی اضافه شدند. کرایوپوئال‌ها به میزان ۲۰ دقیقه در یخچال، ۱ ساعت در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد و یک شب در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آن به مدت حداقل یک ماه به نیتروژن مایع منتقل شدند. ذوب سلول‌های منجمد در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه) صورت گرفت. سپس سلول‌های ذوب شده با محیط α -MEM حاوی ۱۰ درصد FBS به‌صورت قطره‌ای رقیق و سانتی‌فیوژ (۱۲۰۰ × گرم، ۵ دقیقه) شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلت سلولی تشکیل شده برای مقایسه عملکرد محیط



جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	شماره دستیابی	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز)
<i>Gapdh</i>	NM_001411844.1	F-GGAAGGGCTCATGACCACAG R-ACCAGTGGATGCAGGGATGA	۱۲۴
<i>Bax</i>	NM_007527.4	F-CTCAAGGCCCTGTGCACTAA R-TTGGATCCAGACAAGCAGCC	۹۶
<i>Bcl2</i>	NM_009741.5	F-GGATAACGGAGGCTGGGATG R-GCTGAGCAGGGTCTTCAGAG	۹۷
<i>Casp3</i>	NM_009810.3	F-GGAGTCTGACTGGAAGCCGAA R-CTTCTGGCAAGCCATCTCCTCA	۱۱۳
<i>Casp9</i>	NM_015733.6	F-GCTGTGTCAAGTTTGCCTACCC R-CCAGAATGCCATCCAAGGTCTC	۱۲۴

جدول ۲- برنامه Real Time PCR اعمال شده برای ژنهای مورد مطالعه

عملکرد هر مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تکرار (سیکل)
واسرشتی (denaturation) اولیه	۹۵	۱۵ دقیقه	۱
واسرشتی هر سیکل	۹۵	۲۰ ثانیه	۴۰
اتصال (Annealing)	طبق جدول ۳	۲۰ ثانیه	
گسترش (Extension)	۷۲	۳۰ ثانیه	

جدول ۳- دمای اتصال اختصاصی برای ژنهای مورد مطالعه در واکنش Real time PCR

نام ژن	شماره دستیابی	دمای اتصال
<i>Gapdh</i>	NM_001411844.1	۶۰
<i>Bax</i>	NM_007527.4	۶۳
<i>Bcl2</i>	NM_009741.5	۶۰
<i>Casp3</i>	NM_009810.3	۶۰
<i>Casp9</i>	NM_015733.6	۶۰

استفاده شد (۴۲). مقدار هدف نرمال شده نسبت به یک کنترل درونی و همچنین نسبت به یک کالیبراتور با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۲, ۳۹):

$$Ratio = \frac{E_{GAPDH}(C_t Treatment) / E_{target}(C_t Treatment)}{E_{GAPDH}(C_t Control) / E_{target}(C_t Control)}$$

در تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار LinRegPCR ویرایش 2012.0 به منظور محاسبه میزان راندمان یا بهره-وری ((Mean efficiency values (E)) برای هر ژن



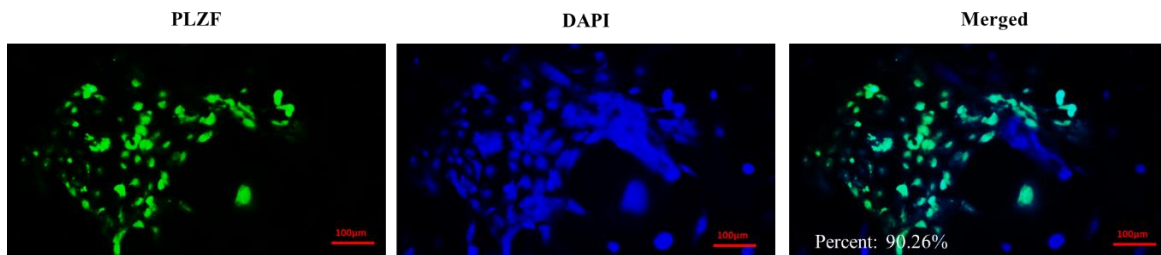
P-value به مقدار < 0.05 از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

به‌منظور تأیید سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد و بر اساس آن بیان نشانگر اختصاصی PLZF در سلول‌های بیضه، پس از سه هفته کشت، ارزیابی گردید. نتایج ارزیابی میزان بیان این نشانگر خاص را در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی با خلوص بالای ۹۰/۲۶ درصد (شکل ۱) نشان داد.

لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر گروه کنترل یعنی گروه انجماد بدون حضور آنتی‌اکسیدان، به‌عنوان کالیبراتور استفاده شد و بدین ترتیب، دیگر گروه‌های انجمادی، نسبت به این گروه، نرمال شدند.

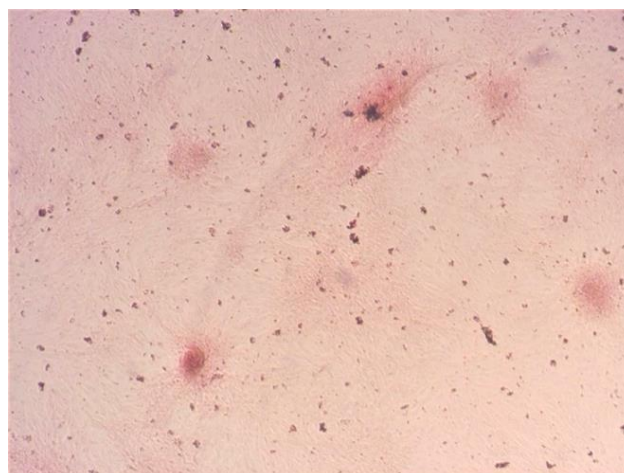
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲.۰، Armonk، نیویورک) انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro-Wilk مقایسه بین گروه‌ها با تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA one-way) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey صورت گرفت (۱۱). داده‌ها به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (میانگین \pm SEM) ارائه شدند و



شکل ۱- ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی به‌منظور ارزیابی نشانگر PLZF سه هفته پس از کشت. هسته‌ها با رنگ DAPI (آبی) رنگ‌آمیزی شدند و نشانه‌های مقیاس ۱۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهند.

مثبت بودن فعالیت آلکالین فسفاتاز در تمام کلنی‌ها بود (شکل ۲).

در این مطالعه استفاده از آزمون سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز نیز به‌عنوان روشی دیگر برای تأیید سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شد و ارزیابی‌ها حاکی از

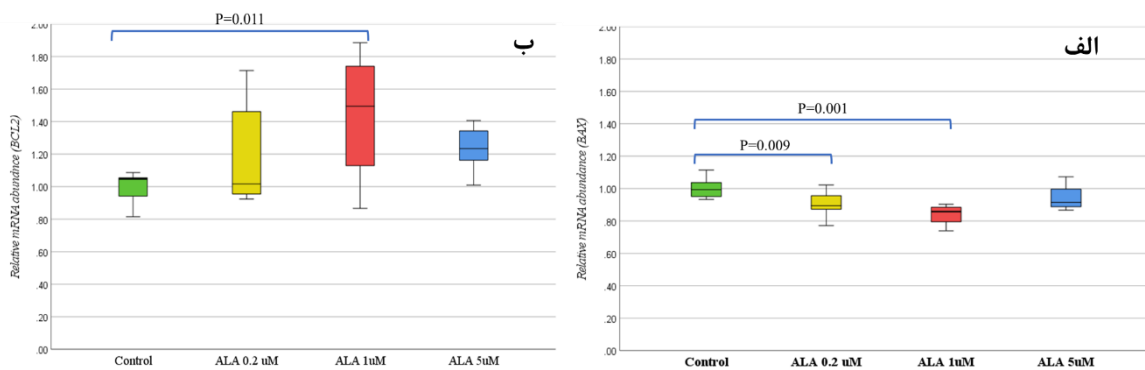


شکل ۲- آزمون فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی سه هفته پس از کشت (بزرگ‌نمایی $10\times$).



غلظت ۰/۲ و ۱ میکرومولار آلفالیپوئیک اسید به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشته است ($P < 0.05$) و در سوی مقابل بیان ژن *Bcl2* به‌عنوان یک ژن سرکوبگر فرایند آپوپتوز تنها در غلظت ۱ میکرومولار آلفالیپوئیک اسید افزایش معنی‌دار نشان داده است ($P < 0.011$).

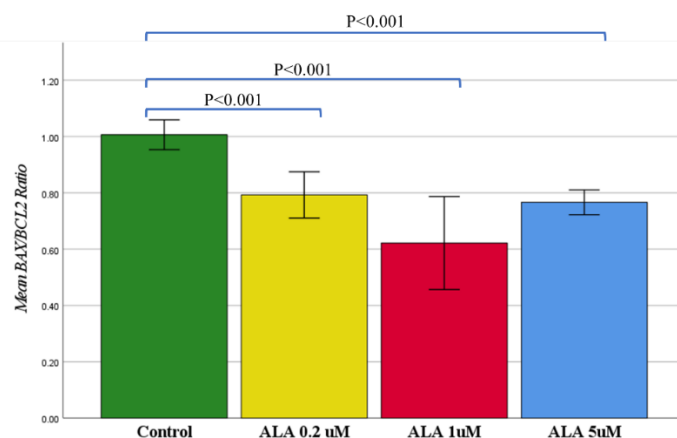
برای بررسی مکانیسم مولکولی تأثیر مستقیم آلفالیپوئیک اسید بر کاهش اثرات منفی انجماد در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، میزان بیان ژن‌های *Bax*، *Casp3*، *Bcl2* و *Casp9* به‌عنوان ژن‌های دخیل در فرایند آپوپتوز با استفاده از Real-time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است؛ بیان ژن *Bax* به‌عنوان یک ژن محرک آپوپتوز در دو



شکل ۳- فراوانی نسبی ژن‌های *BAX* (الف) و *BCL2* (ب) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی متعاقب انجماد و ذوب در گروه‌های مختلف؛ تفاوت معنی‌دار در بالای ستون‌های نمودار مشخص شده است ($P < 0.05$).

کاهش معنی‌دار این نسبت، در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ($P < 0.001$) (شکل ۴).

باتوجه به اهمیت نسبت *Bax/Bcl2* در تعیین سرنوشت آپوپتوزی، مقایسه این نسبت در گروه‌های مختلف نشان داد که آلفالیپوئیک اسید در هر سه غلظت باعث

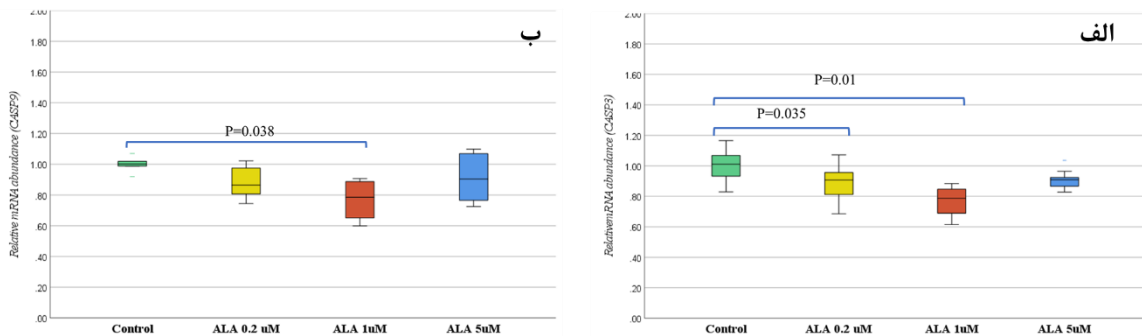


شکل ۴- نسبت بیان ژن *Bax* به *Bcl2* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی متعاقب انجماد و ذوب در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار در بالای ستون‌های نمودار مشخص شده است ($P < 0.05$).



میکرومولار آلفالیپوئیک اسید هم توانسته بود بیان ژن *Casp3* را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد ($P < 0.035$) (شکل ۵).

در خصوص ژن‌های دخیل در آبشار آپوپتوزی یعنی *Casp9* و *Casp3* نیز غلظت ۱ میکرومولار آلفالیپوئیک اسید منجر به کاهش معنی‌دار بیان این دو ژن در مقایسه با گروه کنترل شده بود ($P < 0.05$). همچنین غلظت ۰/۲



شکل ۵- فراوانی نسبی ژن‌های *Casp3* (الف) و *Casp9* (ب) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی متعاقب انجماد و ذوب در گروه‌های مختلف؛ تفاوت معنی‌دار در بالای ستون‌های نمودار مشخص شده است ($P < 0.05$).

پروآپوپتوتیک است که در پاسخ به استرس‌های سلولی مانند انجماد به غشای خارجی میتوکندری منتقل شده و با تشکیل منافذی بر روی آن موجب آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم می‌شود. در مقابل *BCL2* (B-Cell Lymphoma 2) پروتئینی ضد آپوپتوتیک است که با اتصال به *BAX* و مهار آن، از نفوذپذیری غشای میتوکندری جلوگیری می‌کند (۱). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فرایند انجماد و یخ‌گشایی، بیان ژن *Bax* را در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و بیان ژن *Bcl2* معمولاً کاهش می‌یابد یا بدون تغییر می‌ماند (۷). در نتیجه، نسبت *Bax/Bcl2* به نفع *BAX* افزایش می‌یابد. این عدم تعادل، سلول را به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد (۴۱). علت این تغییرات را می‌توان در ایجاد استرس اکسیداتیو از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در حین انجماد جستجو کرد که سیگنال‌هایی را فعال می‌کند تا رونویسی *Bax* را القا کرده و پایداری *Bcl2* را کاهش دهند. از دیگر علل این تغییرات می‌توان به تشکیل کریستال‌های یخ اشاره کرد که به غشای

بحث

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells – SSCs) پایه‌گذار اسپرماتوژنز مداوم در بیضه‌های بالغ هستند. این سلول‌ها توانایی خودنوسازی و تمایز را دارند و برای حفظ باروری در شرایطی مانند سرطان‌های دوران کودکی، ناباروری و قبل از شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۳۵). فرایند انجماد یکی از روش‌های اصلی نگهداری طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. با این حال، استرس ناشی از انجماد و یخ‌گشایی می‌تواند منجر به فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی شده و بقا و کارایی این سلول‌ها را به شدت کاهش دهد (۴).

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، تحت کنترل دقیق ژن‌های مختلفی انجام می‌شود که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به *Bax*، *Bcl2*، *Casp3* و *Casp9* اشاره کرد (۲۱، ۴۳).

ژن‌های خانواده *Bcl2* مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز هستند. در این میان *BAX* (BCL2-Associated X Protein) یک پروتئین



باعث القای آزاد شدن سیتوکروم C می‌شود؛ همچنین استرس حاصل از انجماد می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ مانند MAPK (به‌ویژه JNK و p38) را فعال کند که خود تنظیم‌کننده‌های بالادستی بیان BAX و کاسپازها هستند (۲۰).

همواره افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد به‌عنوان یک استراتژی مؤثر برای کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد و بهبود بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مطرح بوده است. مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند فعالیت سلول‌های بنیادی را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح آپوپتوز در سلول‌های بنیادی پیش‌ساز، تحت‌تأثیر قرار دهند (۱۴). انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حضور کاتالاز و آلفا توکوفرول (α -TCP)، زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش داده و از طریق القای بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک *Bcl2* و مهار بیان ژن پروآپوپتوتیک *Bax*، مانع آپوپتوز می‌شوند (۳). در مطالعات دیگر، دیده شده است که انجماد به همراه آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند باعث افزایش تشکیل کلونی در سلول‌های اسپرماتوگونی جدا شده شود (۲۵، ۳۲). این تکنیک باعث افزایش قابلیت ذخیره سازی و نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مردان با بیماری‌های بدخیم می‌شود و از سرگیری اسپرماتوژنز را در پذیرنده‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بهبود می‌بخشد (۴۴).

درباره تأثیر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی، Wu و همکاران در سال ۲۰۱۶ در نتایج مطالعه خود نشان دادند که رزوراترول فعالیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در موش‌های آرواسپرمی شده تحت القای بوسولفان تغییر می‌دهد و این ترکیب می‌تواند به‌منظور مداخلات درمانی برای افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و متوقف کردن از دست رفتن آن‌ها در مدل‌های موشی آرواسپرمی شده تحت القای بوسولفان از طریق مهار آپوپتوز، مورد استفاده قرار گیرد (۵۲).

سلول و میتوکندری آسیب می‌زنند و مستقیماً مسیرهای وابسته به *Bax* فعال می‌کنند (۳۸).

کاسپازها نیز آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که اجرای نهایی آپوپتوز را انجام می‌دهند. *Casp9* کاسپاز آغازگر در مسیر میتوکندریایی است که پس از آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و تشکیل آپوپتوزوم (با همکاری APAF-1)، فعال می‌شود. *Casp3* نیز کاسپاز اجرایی یا افکتور است. *CASP9* فعال، *CASP3* را بریده و فعال می‌کند. سپس *CASP3* فعال پروتئین‌های کلیدی سلول مانند *PARP*، لامین‌ها و اکتین را تجزیه کرده و باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیک مشخصه آپوپتوز نظیر چروکیدگی سلول، متراکم شدن کروماتین، تشکیل اجسام آپوپتوتیک و... می‌شود (۳۳). فرایند انجماد-یخ‌گشایی باعث افزایش قابل‌توجه بیان mRNA و پروتئین *Casp9* و *Casp3* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود (۵۴). مطالعات با استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی نشان داده‌اند که مهار *CASP9* می‌تواند تا حد زیادی از آپوپتوز ناشی از انجماد جلوگیری کند (۵۷) که تأکیدی بر نقش محوری مسیر میتوکندریایی در این پدیده است. سطح فعالیت *CASP3* به‌عنوان یک بیومارکر استاندارد برای سنجش میزان آپوپتوز پس از انجماد در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده می‌شود (۲۹).

انجماد از طریق چندین مکانیسم به طور هماهنگ باعث تغییر بیان این ژن‌ها می‌شود. مکانیسم‌هایی نظیر آسیب فیزیکی ناشی از کریستال‌های یخ که باعث پارگی غشاهای و اختلال در هموستاز یونی و کلسیمی می‌شود (۲۰). افزایش کلسیم داخل سیتوپلاسمی، میتوکندری را تحریک کرده و مستقیماً مسیر *BAX/Caspase-9* را فعال می‌کند. همچنین انجماد با ایجاد استرس اکسیداتیو موجب می‌شود تشکیل ROS مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در حین انجماد و به‌خصوص در لحظه یخ‌گشایی به‌شدت بالا برود و به دنبال آن ROSها می‌توانند بیان ژن *Bax* را از طریق فاکتور رونویسی p53 افزایش داده و بیان *Bcl2* را کاهش دهند و با تخریب مستقیم میتوکندری



غلظت‌ها برای فعال‌سازی فولیکولی بهتر است. بر اساس این یافته‌ها، به نظر می‌رسد که غلظت ALA کمتر از ۱۰۰ میکرومول در میلی‌لیتر، قادر به حذف مقدار کافی رادیکال‌های آزاد برای کاهش آسیب به عملکرد سلولی نیست (۴۷).

در مطالعه‌ای دیگر بر روی اسپرم بیماران نابارور، غلظت بهینه ALA (۰/۰۲ میلی‌مول) منجر به کاهش غیرمعنی‌دار *Bax* اما افزایش معنی‌دار بیان *Bcl2* در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0/05$) (۶). این یافته نشان می‌دهد که حتی در صورت عدم کاهش چشمگیر *Bax*، افزایش *Bcl2* به‌تنهایی می‌تواند تعادل را به نفع بقای سلولی تغییر دهد. همچنین، در مطالعه‌ای بر روی اسپرم خروس، استفاده از ALA بارگذاری شده در حامل‌های لیپیدی نانوساختار (ALN30) منجر به افزایش معنی‌دار بیان *Bcl2* و کاهش بیان *Casp3* در مقایسه با سایر گروه‌ها شد؛ همچنین درصد اسپرم‌های آپوپتوتیک در این گروه کاهش یافت (۳۴). مطالعه‌ای بر روی موش‌های صحرایی که تحت استرس گرمایی قرار گرفته بودند، نشان داد که تیمار با ALA (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) منجر به افزایش سطح *Bcl2* و کاهش معنی‌دار *Bax* و *Casp3* و *Casp9* شد ($P < 0/05$) (۵۵). این نشان می‌دهد که ALA قادر است کل آبشار آپوپتوزی را از ابتدا (فعال‌شدن *Bax*) تا انتها (فعال‌شدن کاسپاز-۳) مهار کند. اگرچه این مطالعه به طور مستقیم بر روی انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انجام نشده است، مکانیسم مشابه استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهد و تأیید می‌کند که ALA قادر به تعدیل بیان این ژن‌ها در بافت بیضه است.

به‌عبارت‌دیگر، ALA با سه مکانیسم موازی خنثی‌سازی ROS و جلوگیری از فعال‌شدن مسیرهای بالادستی که بیان *Bax* را القا می‌کنند، تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد از طریق افزایش بیان *Sod2* و سایر آنزیم‌ها و در نهایت تنظیم مستقیم بیان ژن‌های آپوپتوزی به نفع بقای سلول (کاهش *Bax* و کاسپازها، افزایش *Bcl2*)، از آپوپتوز جلوگیری می‌کند.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن *Bax* و افزایش معنی‌دار بیان ژن *Bcl2* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و اسپرم می‌شود. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش، افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط انجماد منجر به کاهش معنی‌دار بیان BAX در مقایسه با گروه کنترل شد و افزایش قابل‌توجهی در بیان *Bcl2* مشاهده گردید (۹).

در مطالعه‌ای مستقیم بر روی انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نشان داده شد که افزودن ملاتونین (Melatonin) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به محیط انجماد، ROS درون‌سلولی را کاهش داده و آپوپتوز را از طریق کاهش BAX و افزایش BCL2 مهار می‌کند ($P < 0/05$) (۱۶). این یافته به طور مستقیم اثربخشی آنتی‌اکسیدان‌ها را در محافظت از انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در برابر آپوپتوز ناشی از انجماد تأیید می‌کند. در مطالعه‌ای بر روی اسپرم مردان آستنوسپرمیک (Asthenospermic)، افزودن رزوراترول (Resveratrol) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی منجر به کاهش آپوپتوز و کاهش بیان *Casp3* شد (۱۰). این یافته نشان می‌دهد که نه تنها ALA، بلکه سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نیز قادر به مهار *Casp3* در شرایط انجماد هستند.

آلفا لیپوئیک اسید (α-Lipoic Acid - ALA) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قدرتمند با توانایی خنثی‌سازی مستقیم ROS و بازسازی سایر آنتی‌اکسیدان‌ها، توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است. آنتی‌اکسیدان‌ها با مکانیسم‌های نظیر خنثی‌سازی مستقیم رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو، تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد از طریق افزایش بیان آنزیم‌هایی مانند SOD2 و گلوتاتیون پراکسیداز و تنظیم بیان ژن‌های آپوپتوزی از این فرایند جلوگیری می‌کنند (۲۷).

در مطالعه‌ای بررسی تأثیر آلفا لیپوئیک اسید بر کشت فولیکول‌های پره‌آنترال بافت تخمدان موش‌ها، نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومول در میلی‌لیتر ALA نسبت به بقیه



- Jozani, Co-supplementation of freezing media with trehalose and vitamin C on cell viability and apoptotic gene expression in ovine spermatogonial stem cells. 2022. 25(4).
8. Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri, Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2010. 2010.
 9. Boroujeni, M.B.; F. Peidayesh; A. Pirnia; N.B. Boroujeni; S.A.Y. Ahmadi, and M. Gholami, Effect of selenium on freezing-thawing damage of mice spermatogonial stem cell: a model to preserve fertility in childhood cancers. *Stem Cell Investig*, 2019. 6: p. 36.
 10. Chimento, A.; A. De Luca; M. Venditti; F. De Amicis, and V. Pezzi, Beneficial Effects of Resveratrol on Testicular Functions: Focus on Its Antioxidant Properties. *Cells*, 2025. 14(14).
 11. Costoya, J.A.; R. Hobbs; M. Barna; G. Cattoretti; K. Manova; M. Sukhwani; K. Orwig; D. Wolgemuth, and P. Pandolfi, Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature genetics*, 2004. 36: p. 653-9.
 12. Dorak, M.T., *Real-time PCR*. 2007: Taylor & Francis.
 13. Fadl, A.M.; A.R.M. Ghallab; M.M. Abou-Ahmed, and A.R. Moawad, Melatonin can improve viability and functional integrity of cooled and frozen/thawed rabbit spermatozoa. 2021. 56(1): p. 103-111.
 14. Fathi, S.; H. Nazari; M. Arabi; A. Afzali, and E. Ahmadi, The antioxidant capacity and protective ability of astaxanthin in cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. *Cryobiology*, 2025. 120: p. 105261.
 15. Fayomi, A.P. and K.E. Orwig, Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res*, 2018. 29: p. 207-214.

در نهایت، انجام مطالعات بیشتر با تمرکز مستقیم بر SSCs انسانی و بررسی اثرات طولانی‌مدت ALA بر کیفیت و کارایی این سلول‌ها پس از پیوند، می‌تواند به بهینه‌سازی بیشتر پروتکل‌های بالینی کمک کند.

منابع

1. Adams, J.M. and S. Cory, Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 2007. 19(5): p. 488-496.
2. Afzali, A.; F. Amidi; M. Koruji; H. Nazari; M.A.S. Gilani, and A.S. Sanjbad, Astaxanthin Relieves Busulfan-Induced Oxidative Apoptosis in Cultured Human Spermatogonial Stem Cells by Activating the Nrf-2/HO-1 pathway. *Reprod Sci*, 2022. 29(2): p. 374-394.
3. Aliakbari, F.; M.A. Gilani; F. Amidi; M. Baazm; M. Korouji; F. Izadyar; H. Yazdekhashti, and M. Abbasi, Improving the Efficacy of Cryopreservation of Spermatogonia Stem Cells by Antioxidant Supplements. *Cell Reprogram*, 2016. 18(2): p. 87-95.
4. Aliakbari, F.; H. Yazdekhashti; M. Abbasi; M. Hajian Monfared, and M. Baazm, Advances in cryopreservation of spermatogonial stem cells and restoration of male fertility. *Microsc Res Tech*, 2016. 79(2): p. 122-9.
5. Aly, H.A.A. and M.H. Hassan, Potential testicular toxicity of gentamicin in adult rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. 497(1): p. 362-367.
6. Asa, E.; R. Ahmadi; M. Mahmoodi, and A. Mohammadniya, Supplementation of freezing media with alpha lipoic acid preserves the structural and functional characteristics of sperm against cryodamage in infertile men with asthenoteratozoospermia. *Cryobiology*, 2020. 96: p. 166-174.
7. Asadpour, R.; S. Kalantari; A. Shahbazfar, and R.J.B.J.o.V.M. Jafari-



- oxidative stress in mice testes. *Andrologia*, 2015. 47(10): p. 1109-19.
24. Kheirollahi, A.; A. Abbaszadeh; K. Anbari; B. Rostami; A. Ahangari; A. Hasanvand, and M. Gholami, Troxerutin protect sperm, seminiferous epithelium and pituitary-gonadal axis from torsion-detorsion injury: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*, 2018. 16(5): p. 315-322.
 25. Koruji, M.; M. Movahedin; S.J. Mowla, and H. Gourabi, Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse %J *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2007. 5(4): p. 109-115.
 26. Lançon, R.; E.C.C. Celeghini; M.B.R. Alves; K.M. Lemes; A.M. Gonella-Diaza; L.Z. Oliveira, and R.P.J.J.o.e.v.s. de Arruda, Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm. 2018. 69: p. 78-83.
 27. Len, J.S.; W.S.D. Koh, and S.X. Tan, The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci Rep*, 2019. 39(8).
 28. Li, B.; X. He; M. Zhuang; B. Niu; C. Wu; H. Mu; F. Tang; Y. Cui; W. Liu; B. Zhao; S. Peng; G. Li, and J. Hua, Melatonin Ameliorates Busulfan-Induced Spermatogonial Stem Cell Oxidative Apoptosis in Mouse Testes. *Antioxid Redox Signal*, 2018. 28(5): p. 385-400.
 29. Li, J.-T.; L. Zhang; J.-J. Liu; X.-L. Lu; H.-X. Wang, and J.-M. Zhang, Testicular damage during cryopreservation and transplantation. 2021. 53(10): p. e14191.
 30. Liu, X.; Y. Xu; F. Liu; Y. Pan; L. Miao; Q. Zhu, and S.J.F.i.C. Tan, The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. 2021. 9: p. 648684.
 31. Lv, C.; A. Larbi; G. Wu; Q. Hong, and G.J.A.r.s. Quan, Improving the quality of cryopreserved goat semen with a
 16. Feng, T.Y.; Q. Li; F. Ren; H.M. Xi; D.L. Lv; Y. Li, and J.H. Hu, Melatonin Protects Goat Spermatogonial Stem Cells against Oxidative Damage during Cryopreservation by Improving Antioxidant Capacity and Inhibiting Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2020. 2020: p. 5954635.
 17. Figueroa, E.; J. Farias; M. Lee-Estevez; I. Valdebenito; J. Risopatrón; C. Magnotti; J. Romero; I. Watanabe, and R.P.d.S.J.A. Oliveira, Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). 2018. 493: p. 1-8.
 18. Garcia, J.M.; J.A. Chen; B. Guillory; L.A. Donehower; R.G. Smith, and D.J. Lamb, Ghrelin Prevents Cisplatin-Induced Testicular Damage by Facilitating Repair of DNA Double Strand Breaks Through Activation of p53 in Mice. *Biol Reprod*, 2015. 93(1): p. 24.
 19. Ghezzi, M.; M. Berretta; A. Bottacin; P. Palego; B. Sartini; I. Cosci; L. Finos; R. Selice; C. Foresta, and A. Garolla, Impact of Bep or Carboplatin Chemotherapy on Testicular Function and Sperm Nucleus of Subjects with Testicular Germ Cell Tumor. *Front Pharmacol*, 2016. 7: p. 122.
 20. Hai, E.; B. Li; J. Zhang, and J. Zhang, Sperm freezing damage: the role of regulated cell death. *Cell Death Discovery*, 2024. 10(1): p. 239.
 21. Hussar, P., Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. 2022. 2(4): p. 1624-1636.
 22. Kanatsu-Shinohara, M.; N. Ogonuki; K. Inoue; H. Miki; A. Ogura; S. Toyokuni, and T.J.B.o.r. Shinohara, Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. 2003. 69(2): p. 612-616.
 23. Kaur, S. and M.P. Bansal, Protective role of dietary-supplemented selenium and vitamin E in heat-induced apoptosis and



- and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev*, 2007. 74(7): p. 878-92.
39. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
40. Poganitsch-Korhonen, M.; I. Masliukaite; M. Nurmio; P. Lähteenmäki; M. van Wely; A.M.M. van Pelt; K. Jahnukainen, and J.B. Stukenborg, Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia*, 2017. 31(6): p. 1460-1463.
41. Putri, G.F.T.J.I.J.o.C. and B. Science, Bax/Bcl-2 ratio as the golden marker of apoptosis: molecular mechanisms and regulatory pathways. 2025. 4(10): p. 309-317.
42. Ruijter, J.M.; C. Ramakers; W.M.H. Hoogaars; Y. Karlen; O. Bakker; M.J.B. van den Hoff, and A.F.M. Moorman, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 2009. 37(6): p. e45-e45.
43. Sahoo, G.; D. Samal; P. Khandayataray, and M.K. Murthy, A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 2023. 60(10): p. 5805-5837.
44. Shaban, S.; M.W.A. El-Husseney; A.I. Abushouk; A.M.A. Salem; M. Mamdouh, and M.M. Abdel-Daim, Effects of Antioxidant Supplements on the Survival and Differentiation of Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. 2017: p. 5032102.
45. Siegel, D.A.; J. King; E. Tai; N. Buchanan; U.A. Ajani, and J. Li, Cancer incidence rates and trends among children and adolescents in the United States, commercial bull extender supplemented with resveratrol. 2019. 208: p. 106127.
32. Mirzapour, T.; M. Movahedin; T.A. Tengku Ibrahim; A.W. Haron, and M.R. Nowroozi, Evaluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells in vitro culture. *Andrologia*, 2013. 45(1): p. 26-34.
33. Mustafa, M.; R. Ahmad; I.Q. Tantry; W. Ahmad; S. Siddiqui; M. Alam; K. Abbas; Moinuddin; M.I. Hassan; S. Habib, and S. Islam ,Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. 2024. 13(22): p. 1838.
34. Najafi, A.; H. Daghigh Kia, and H. Hamishehkar, Does alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carriers improve post-thawed sperm quality and ameliorate apoptosis-related genes of rooster sperm? *Poult Sci*, 2021. 100(1): p. 357-365.
35. Ning, L.; E. Goossens; M. Geens; D.V. Saen, and H. Tournaye, Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. *Middle East Fertility Society Journal*, 2012. 17(1): p. 1-7.
36. Packer, L.; E.H. Witt, and H.J. Tritschler, Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*, 1995. 19(2): p. 227-250.
37. Paoli, D ;F. Rizzo; G. Fiore; F. Pallotti; A. Pulsoni; G. Annechini; F. Lombardo; A. Lenzi, and L. Gandini, Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Hum Reprod*, 2016. 31(3) p. 263-72.
38. Peris, S.I.; J.F. Bilodeau; M. Dufour, and J.L. Bailey, Impact of cryopreservation



53. Yan, W.H.; D. Liu; H.Y. Lu; Y.Y. Li; X. Zhang, and A. Lin, Significance of tumour cell HLA-G5/-G6 isoform expression in discrimination for adenocarcinoma from squamous cell carcinoma in lung cancer patients. *J Cell Mol Med*, 2015. 19(4): p. 778-785.
54. Yang, F.; J. Zhao; Y. Li; C. Niu, and Y. Zheng, Cryopreservation of spermatogonial stem cells: an overview of cryoprotectants. *Reproductive BioMedicine Online*, 2025. 51(4).
55. Yazğan, Y. and B. Yazğan, Potent antioxidant alpha lipoic acid reduces STZ-induced oxidative stress and apoptosis levels in the erythrocytes and brain cells of diabetic rats. *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, 2023. 14(2): p. 1085-1094.
56. Zhang, H.; B. Wu; H. Liu; M. Qiu; J. Liu; Y. Zhang, and F. Quan, Improving development of cloned goat embryos by supplementing α -lipoic acid to oocyte in vitro maturation medium. *Theriogenology*, 2013. 80(3): p. 228-233.
57. Zhang, K.; Z. Ge; L. Fu; Q. An; F. Zhou; Y. Guo; X. Wang; W. Lu; X. Liang; S. Wang; X. Shang, and Y. Gu, Qilin pills alleviate oligoasthenospermia by inhibiting Bax-caspase-9 apoptosis pathway in the testes of model rats. *Oncotarget*, 2018. 9(31): p. 21770-21782.
- 2001-2009. *Pediatrics*, 2014. 134(4): p. e945-55.
46. Silva, L.M.; G.T. Mbemba; D.D. Guerreiro; D.C.C. Brito; N.J. Donfack; M.L.G. Morais; G.Q. Rodrigues; J.B. Bruno; R.M. Rocha, and B.G. Alves, Effect of catalase or alpha lipoic acid supplementation in the vitrification solution of ovine ovarian tissue. *Biopreservation and Biobanking*, 2018. 16(4): p. 258-269.
47. Talebi, A.; S. Zavareh; M.H. Kashani; T. Lashgarbluki, and I. Karimi, The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2012. 29: p. 175-183.
48. Tirosh, O.; C.K. Sen; S. Roy; M.S. Kobayashi, and L. Packer, Neuroprotective effects of α -lipoic acid and its positively charged amide analogue. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. 26(11-12): p. 1418-1426.
49. Tvrdá, E.; A. Mackovich; H. Greifova; F. Hashim, and N.J.V.m. Lukac, Antioxidant effects of lycopene on bovine sperm survival and oxidative profile following cryopreservation. 2017. 62(8): p. 429-436.
50. van der Wee, K.S.; E.W. Johnson; G. Dirami; T.M. Dym, and M.C. Hofmann, Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl*, 2001. 22(4): p. 696-704.
51. Wu, C.; Y. Zhang; Q. Shen; Z. Zhou; W. Liu, and J. Hua, Resveratrol changes spermatogonial stem cells (SSCs) activity and ameliorates their loss in busulfan-induced infertile mouse. *Oncotarget*, 2016. 7(50): p. 82085.
52. Wu, C.; Y. Zhang; Q. Shen; Z. Zhou; W. Liu, and J. Hua, Resveratrol changes spermatogonial stem cells (SSCs) activity and ameliorates their loss in busulfan-induced infertile mouse. *Oncotarget*, 2016. 7(50): p. 82085-82096.



The Protective Role of Alpha-Lipoic Acid on the Expression of Apoptosis-Related Genes in Mouse Spermatogonial Stem Cells During Freezing

Kazem Norouzi¹; Hassan Nazari^{2*}; Ebrahim Ahmadi²; Naser Shams-Esfandabaadi³; Azita Afzali^{4,5*}

1. Ph.D. Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord- Iran
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan- Iran.
5. Nervous System Stem Cells Research Center, Neuroscience Research Institute, Semnan University of Medical Sciences, Semnan- Iran.

Summary

Received: 9 April 2026

Accepted: 25 May 2026

This study aimed to examine the protective role of alpha-lipoic acid (ALA) against damage caused by freeze-thawing in immature mouse spermatogonial stem cells (SSCs) by analyzing the expression of genes related to apoptosis. SSCs were extracted from the testes of 4–8-day-old C57 mice and, after verification through immunocytochemistry using the PLZF marker and an alkaline phosphatase activity test, were cultured for three weeks. The cells were then frozen in four groups: a control group without antioxidants and three groups treated with different ALA concentrations (0.2, 1, and 5 μM). Following thawing, the expression levels of BAX, BCL2, Caspase-3, and Caspase-9 were measured using Real-time PCR. Findings revealed that 1 μM ALA significantly lowered the expression of the pro-apoptotic genes BAX, Caspase-3, and Caspase-9, while significantly increasing the anti-apoptotic gene BCL2 ($P < 0.05$). The 0.2 μM dose also notably reduced BAX and Caspase-3 expression. However, the highest concentration (5 μM) showed no significant impact. The study concludes that alpha-lipoic acid, especially at 1 μM , can safeguard mouse spermatogonial stem cells from freeze-thaw damage by regulating key apoptosis-related gene expression and may serve as a beneficial additive in the cryopreservation medium for these cells.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Alpha-lipoic acid, Cryopreservation, Apoptosis, Gene expression, Mouse

* Corresponding Authors: hnazari@sku.ac.ir; afzali.azita@sem.ums.ac.ir

