"Research article" **DOI: 10.71499/jvcp.2024.3061421**

Pathologic effects of *Candida albicans* on co-culture of sheep spermatogonia stem cells and sertoli cells

Shahbazfar, AA.[1*], Asad pour, R.[2], Tirandaz, M.[3], Katiraee, F.[4]

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author's email: Shahbazfar@tabrizu.ac.ir
(Received: 2023/10/28 Accepted: 2024/1/24)

Abstract

Candida albicans is the cause of candidiasis in sheep .*Candida albicans* can cause fertility disorder in ram with epididymitis and orchitis. Spermatogonia keep proliferating during sexual life of male animals and maintain male fertility by producing spermatozoa. Testicular tissue damage affects germ cells and consequently influences male fertility. In the present study, we isolated and purified and then co-cultured spermatogonial stem cells with sertoli cells in DMEM-F12 culture media. Spermatogonia stem cells and sertoli cells were identified by vimentin and Oct-4 immunocytochemical staining method, respectively. The cells were infected with *Candida albicans* in five groups with different doses and one group was considered as control without fungal infection. After fungal growth within 24 hours, the cells and fungus were fixed with methanol and stained with hematoxylin and eosin. The cytopathic effects of *Candida albicans* were evaluated by morphological changes and cell injury biomarkers (LDH and MDA measurement) after 24 hours. The results indicated that *Candida albicans* had cytopathic effect on spermatogonia stem cells and sertoli cells during 24 hours infection. Candida exerts its damages by its cytopathic effects and its rapid growth in culture, and these damages were dose dependent. Therefore, fungus infection of culture media should be prevented and research on infected culture media should be strictly avoided.

Conflict of interest: None declared.

Key words: *Candida albicans*, Cytopathy, Sertoli cells, Spermatogonia Stem cells.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.71499/jvcp.2024.3061421

مطالعه اثرات پاتولوژیک آلودگی با قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی گوسفند

امیرعلی شهبازفر[1*]، رضا اسدپور[2]، مهداد تیرانداز[3]، فرزاد کتیرایی[4]

۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳- دانش‌آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Shahbazfar@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۶ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۱/۴)

چکیده

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) عامل کاندیدیاز گوسفند، می‌تواند با ایجاد التهاب بیضه و التهاب اپیدیدیم در روند طبیعی قدرت باروری قوچ‌ها اختلال ایجاد کند. سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه در طول حیات مرتباً تقسیم شده و با تولید اسپرماتوزوئیدها قدرت باروری جنس نر را حفظ می‌کنند. آسیب‌های وارد شده به بافت بیضه با تحت تأثیر قرار دادن سلول‌های بنیادی، باروری جنس نر را متأثر می‌سازند. در مطالعه حاضر، جداسازی، خالص‌سازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضهٔ گوسفند به همراه سلول‌های سرتولی، در محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) انجام گرفت. ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی توسط تکنیک ایمینوسیتوشیمی تایید شد. سپس سلول‌ها با قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در ۵ گروه با دزهای متفاوت قارچی آلوده شدند و یک گروه نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و هیچ قارچی به آن اضافه نشد. بعد از رشد قارچ‌ها در مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها به همراه قارچ‌های رشد کرده توسط متانول فیکس شده و با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. اثر سیتوپاتیک قارچ *کاندیدا‌آلبیکنس* از طریق بررسی‌های ریخت‌شناسی و اندازه‌گیری شاخص‌های آسیب سلولی شامل لاکتات دهیدروژناز و مالوندی‌آلدئید بعد از طی مدت ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که *کاندیدا آلبیکنس* روی سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در طی مدت ۲۴ ساعت اثر سیتوپاتیکی را با وارد نمودن آسیب سلولی و رشد سریع در محیط، ایجاد می‌کند و میزان آسیب سلولی و شاخص‌های آسیب سلولی با افزایش دوز قارچ در گروه‌های مختلف، افزایش می‌یابد. به همین دلیل باید در نظر داشت تاحد ممکن از رشد قارچ در محیط‌های کشت جلوگیری شده و از تحقیقات روی محیط‌های کشت قارچ‌زده اکیداً خودداری گردد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های سرتولی، سیتوپاتی، *کاندیدا آلبیکنس*.

مقدمه

بیماری کاندیدیازیس (Candidiasis) به عنوان یکی از بیماری‌های عفونی قارچی در انسان و طیف وسیعی از حیوانات مطرح می‌باشد (Pappas *et al.*, 2018). گونه *کاندیداآلبیکنس* متداول‌ترین عامل آن بوده و می‌تواند موجب بیماری از حالت جلدی تا سیستمیک گردد (Touray and Touray, 2021). در حالت طبیعی مخمر مذکور جزء فلور طبیعی بدن بوده و بصورت هم‌زیست و بدون ضرر می‌باشد (Hull *et al.*, 2000). استان آذربایجان‌شرقی به لحاظ جمعیت دامی مخصوصاً پرورش گوسفند یکی از استان‌های مهم و غنی کشور است. (Nematollahi *et al.*, 2020). *کاندیدا آلبیکنس* به عنوان شایع‌ترین عامل کاندیدیازیس می‌تواند با ایجاد ارکیت و اپیدیدیمیت موجب اختلال در روند باروری قوچ‌ها شود. اساس اسپرم سازی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که دارای پتانسیل ویژه‌ای در نوسازی خود و یا تمایز به سایر رده‌های سلول ژرم و در نهایت اسپرم است (Daghighkia *et al.*, 2017; Mescher *et al.*, 2018). برای بقای سلول‌های بنیادی، نیاز به محیط ویژه نیچ است. نیچ ریز محیطی است که سرنوشت سلول‌های بنیادی را با جلوگیری از تمایز آن هاحفظ می کند و جلوی تبدیل شدن آن‌ها به سلول‌های بالغ را می‌گیرد و غالباً شامل سلول‌های تمایز یافته مجاور، سلول‌های بنیادی مجاور و ماتریکس خارج سلولی اطراف این سلول‌ها است. سلول‌های سرتولی در تشکیل این ریز محیط نقش بسزایی دارند (Hofmann, 2008).

براساس اطلاعات موجود، تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با بررسی سیتوپاتی *کاندیدا آلبیکنس* بر روی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی انجام نگرفته است. البته قبلا با بکار بردن مواد مختلف مثل آنتی‌اکسیدان‌ها سعی در حفظ سلول‌های مختلف از آسیب عوامل آسیب‌رسان مثل قارچ‌ها شده‌است (Shekari *et al.*, 2020). لذا هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی در محیط کشت آزمایشگاهی بود که سعی شد سیتوپاتی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی در آن بررسی گردد و نتایج آن به درمان بالینی دام‌های مبتلا تعمیم داده شود،

مواد و روش‌ها

-نمونه‌برداری: طی مطالعه مداخله‌ای حاضر که در طی بازه زمانی تابستان و پاییز ۱۳۹۹ صورت پذیرفته است، در هر بار برای نمونه‌برداری جهت بدست آوردن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به کشتارگاه صنعتی شهرستان تبریز واقع در خسروشاه مراجعه می‌شد و بیضهٔ کامل بره‌های نابالغ گوسفند در حین کشتار بره و قبل از ضبط آن تهیه می‌گردید. سپس کل پارانشیم بافت بیضه توسط پنس استریل جدا شده و داخل محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco, USA) انداخته می‌شد و به صورت استریل در عرض ۱ ساعت و در کنار کیسه یخ، به آزمایشگاه منتقل می‌گردید. در این مطالعه از بیضه گوسفند نابالغ استفاده گردید تا بتوان تعداد بیشتری از سلول‌های اسپرماتوگونی را جهت بررسی‌های تحقیقاتی حاضر جداسازی نمود (Rodriguez-sosa *et al.*, 2006).

سلول‌های سرتولی علاوه بر حمایت فیزیکی که محیطی همانند لوله‌های منی‌ساز را ایجاد می‌کند، فاکتورهای رشد مختلفی را ترشح می‌کنند. این فاکتورها ریز محیط مناسبی برای بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی فراهم می‌کنند (Griswold., 2018). از این رو در مطالعه حاضر سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با هم کشت داده شدند.

- **استخراج و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:** برای تهیهٔ سوسپانسیون سلولی، روش مورد استفادهٔ ون پلت با کمی تغییرات به کار برده شد که شامل هضم مکانیکی و هضم آنزیمی دو مرحله‌ای (Van Pelt *et al*., 1996)، به‌شرح زیر می‌باشد:

- **هضم مکانیکی:** در این مرحله نمونه تهیه شده ، در زیر هود کلاس ۲ (پارس‌آزما-ایران) به داخل یک پتری‌دیش با قطر ۵ سانتی‌متر حاوی محیط DMEM-F12 تازه منتقل شد. در ادامه بافت پارانشیم بیضه توسط تیغ بیستوری استریل به قطعات ریز در حد امکان خرد شد. سپس محتویات پتری دیش حاوی محیط DMEM-F12 و پارانشیم خردشدهٔ بیضه به داخل لوله فالکون دیگری منتقل شده و عمل سانتریفیوژ (Labtron, Iran) با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه، بمدت ۱ دقیقه به عنوان شست‌وشو انجام گردیدو در ادامه محیط رویی تخلیه شد. این کار ۲ بار تکرار شد.

- **هضم آنزیمی:** در این مرحله، محتویات حاصله از مرحله هضم مکانیکی، تحت اثر مخلوطی از آنزیم‌های کلاژناز، تریپسین و هیالورونیداز (Sigma-Aldrich, USA) در دو مرحله قرار گرفت.

- **هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی:** بعد از دور ریختن محیط رویی حاصله از سانتریفیوژ در مرحله دوم هضم آنزیمی، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محیط DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS(Fetal Bovine Serum) (Gibco, USA) به رسوب حاصله در ته لوله فالکون افزوده شد. با سمپلر عمل مخلوط کردن انجام شده و سلول‌ها کاملا همگن شده و سوسپانسیون سلولی حاصله در زیر هود و شرایط استریل به داخل فلاسک T25 (فلاسک کشت سلول ۲۵ میلی‌لیتر (South Korea-life science) منتقل شد و حجم محیط کشت به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. فلاسک کشت سلول بعد از درج تاریخ و اطلاعات بر روی آن به داخل گرمخانه ۳۷ درجه (Memmet, Germany) منتقل شد. محیط کشت موجود در فلاسک‌ها هر دو روز یک بار تحت شرایط استریل و در زیر هود تعویض می‌گردید. در این مدت فلاسک‌های کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) برای مشاهده رشد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی و همچنین حصول اطمینان از عدم وجود آلودگی در فلاسک‌ها بررسی می‌شد. فرآیند کشت سلولی در حدود ۵ تا ۶ روز طول کشید. تأیید ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی به کمک روش ایمنوسیتوشیمی انجام گردید (Koruji *et al*., 2007; Dann *et al*., 2008).

روش ایمنوسیتوشیمی برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی

رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی با آنتی‌بادی ضد ویمنتین کونژوگه با FITC (فلوئورسین ایزوتیوسیانات) که البته هسته سلول‌ها با 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) رنگ شده‌است، صورت گرفته است. رنگ FITC نوعی رنگ فلئورسنت

برای مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت است.

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با آنتی Oct-4 (آنتی‌بادی ضد پروتئین Oct-4 کونژوگه با FITC (فلوئورسین ایزوتیوسیانات) انجام شده است. پروتئین Oct-4 یک مارکر جهت شناسایی سلول بنیادی تمایزنیافته است. به طور خلاصه روش ایمنوسیتوشیمی به عنوان روشی برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی جداشده با تشخیص بیان دو نشانگر OCT-4 و Vimentin (به‌ترتیب) استفاده شد (Koruji *et al*., 2007).

- **کشت قارچ *کاندیدا آلبیکنس*:** در مطالعه حاضر از سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC:10321) تهیه‌شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد که جهت استفاده لازم، در محیط کشت سابارو دکستروز آگار (SDA) (Conda Lab, Spain) کشت داده شد.

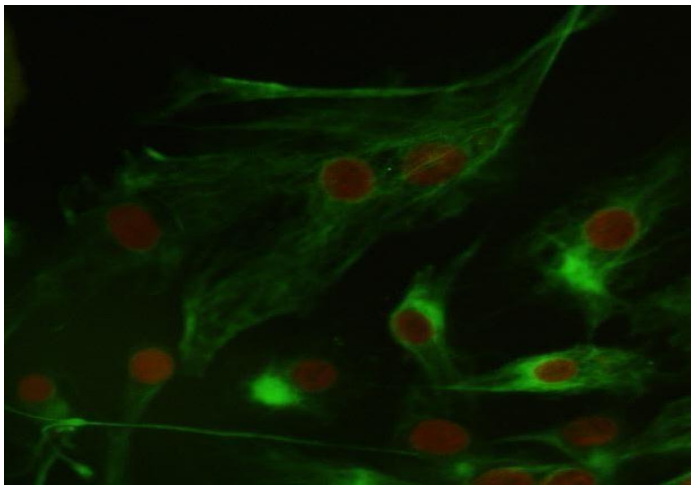
- **افزودن *کاندیدا آلبیکنس* به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی:** بعد از آماده نمودن ۵ گروه متفاوت از جمعیت قارچ *کاندیدا آلبیکنس* که در ادامه توصیف شده، هر کدام از گروه‌های مذکور، به داخل یکی از خانه‌های پلیت کشت سلول ۶ خانه‌ای که قبلا در آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به همراه سلول‌های سرتولی به تعداد 10^6 سلول در هر چاهک، کشت داده شده بود، افزوده شد و به یکی از خانه‌ها نیز به عنوان گروه شاهد، قارچ افزوده نشد: گروه ۱) شاهد، گروه ۲) شامل 10^3 عدد سلول قارچی، گروه ۳) شامل 10^4 سلول قارچی، گروه ۴) شامل 10^5سلول قارچی، گروه ۵) شامل 10^6 سلول قارچی و گروه ۶) شامل 10^7 سلول قارچی. همچنین هر کدام از خانه‌ها حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی DMEM-F12 بود تا شرایط مساوی برای هر کدام از گروه‌ها مهیا شود. پلیت ۶ خانه به داخل گرمخانه (۳۷-۳۵ درجه سلسیوس) منتقل شد تا در محیط مناسب از نظر شرایط دمایی و میزان CO_2 ۵ درصد در کنار هم رشد نمایند. هر ۱۲ ساعت رشد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* به همراه سلول‌های بنیادی توسط میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. بعد از ۴۸ ساعت بدلیل رشد بیش از اندازهٔ قارچ‌ها پروسهٔ هم‌کشتی متوقف شد. متوقف نمودن رشد سلول‌ها با تخلیه محیط کشت رویی سلول‌ها و افزودن متانول (Merck, USA) به مدت ۳ دقیقه در چاهک‌های پلیت انجام شد. افزودن متانول موجب فیکس شدن سلول‌ها در کف چاهک‌های پلیت ۶ خانه شد. جهت مطالعات پاتولوژیک هم از روش رنگ‌آمیزی سلول‌ها در چاهک‌ها با هماتوکسیلین-ائوزین (Bahar Afshan, Iran)استفاده شد. همچنین تکرار دیگری نیز جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها انجام شد، بدین ترتیب که همهٔ سلول‌های رشد کرده توسط پاروی پلاستیکی استریل کنده شدند و همراه محیط رویی برداشته شده و سانتریفیوژ شد. سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور به‌مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد و بعد از تخلیه مایع رویی به اندازه ۱ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) بر روی سلول‌ها ریخته شده و توسط سمپلر (Eppendorf, Germany) با سلول‌ها مخلوط گردید. سپس در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس منجمد شده و سپس در بن‌ماری یخ‌زدایی شد تا شکست سلولی انجام شود. در نهایت این نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها به فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس جهت نگه‌داری منتقل گردید.

- **اندازه‌گیری شاخص‌های آسیب سلولی**: اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز با استفاده از کیت (Delta Darman Part, Iran) براساس اصول و روش ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام‌گردید. جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو هم از اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) تولید شده در فرآیند لیپیدپراکسیداسیون استفاده گردید (Koracevic *et al*., 2001).

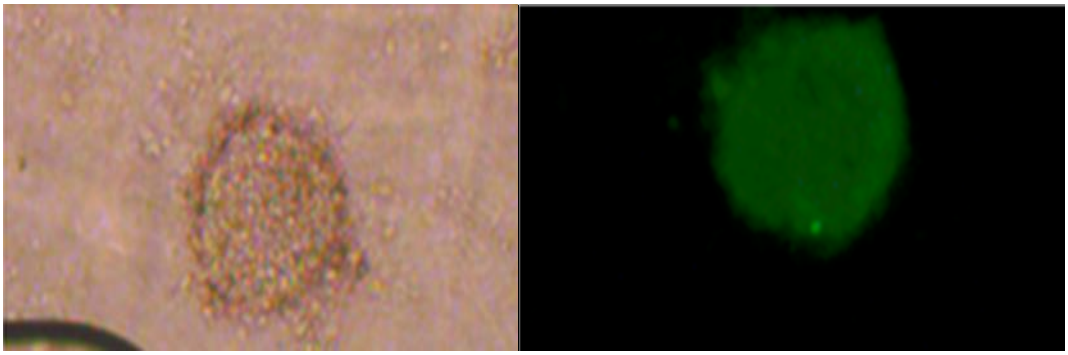
- **تحلیل آماری داده‌ها**: نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز آماری توسط نرم افزار۲۲- SPSS انجام شد. برای بررسی اختلاف آماری در گروه‌ها از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و توکی (Tukey) به عنوان تست مکمل استفاده شد. در تمامی موارد هم فاصله اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اشکال ۱ و ۲ نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در روش ایمونوسیتوشیمی انجام گرفته را نشان می‌دهد.



شکل ۱- نمائی از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی با آنتی‌ویمنتین کونژوگه با FITC که البته هسته سلول‌ها با 7-AAD رنگ شده‌است (درشت‌نمایی ×۴۰۰).

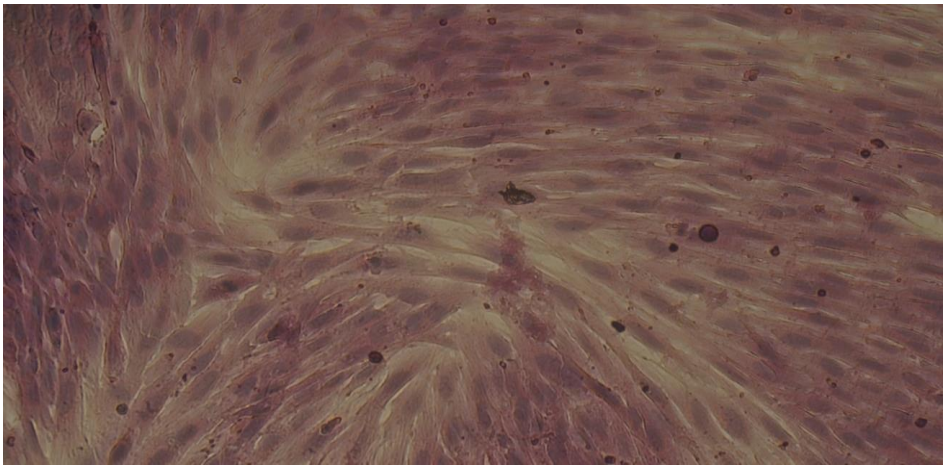


شکل ۲- نمائی از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با آنتی Oct-4 کونژوگه با FITC (درشت‌نمایی ×۲۰).

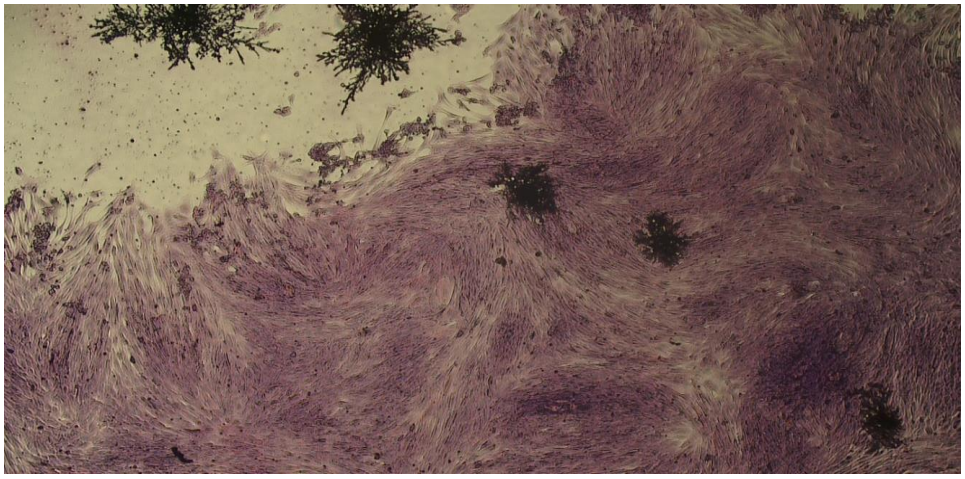
مطابق روش کار ارائه‌شده، در مطالعه حاضر سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از هم‌کشتی و رشد سلول‌ها توسط قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با دزهای مختلف افزایشی آلوده شدند که بعد از ۲۴ ساعت رشد رشته‌ای قارچ وکلنی‌های قارچی که چسبیده به سلول‌ها و کف چاهک‌ها بودند و موجب وارد شدن آسیب سلولی به سلول‌های کشت داده شده بودند، مشاهده گردیدند. رشد قارچ‌ها در ساعات ابتدایی و تا ۱۲ ساعت اولیه و قبل از رنگ‌آمیزی بیشتر بصورت کلنی‌های کوچک و حالت مخمری دیده می‌شد ولی با افزایش زمان و رشد بیشتر قارچی، حالت هایفی نیز ایجاد شده و قارچ‌ها بصورت رشد هایفی در بین سلول‌ها نفوذ یافتند. بنظر می‌رسد، افزایش زمان و رشد بیشتر کاندیداها شرایطی را ایجاد می‌کنند که رشد هایفی نیز علاوه بر رشد مخمری در قارچ‌های جنس کاندیدا ایجاد شود.

آسیب وارده به سلول‌ها در مشاهدات میکروسکوپ نوری از لحاظ مورفولوژیک بصورت واکوئله شدن سیتوپلاسم سلول‌ها، چروکیده شدن سلول‌ها و ائوزینوفیل‌تر شدن سیتوپلاسم سلول‌ها دیده شد. همچنین در بعضی سلول‌ها تورم سلولی و کنده شدن سلول‌ها از کف پلیت مشاهده شد. در بخش‌هایی که کلونیزاسیون قارچی صورت نگرفته بود میزان آسیب سلولی به تدریج با افزایش دز قارچ در گروه‌های دوم تا چهارم بیشتر شده و سلول‌ها چروکیده‌تر می‌شدند. در گروه پنجم و ششم بدلیل پوشیده شدن سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توسط رشد قارچی، از لحاظ مورفولوژیک نمی‌توان اظهار نظر خاصی نمود.

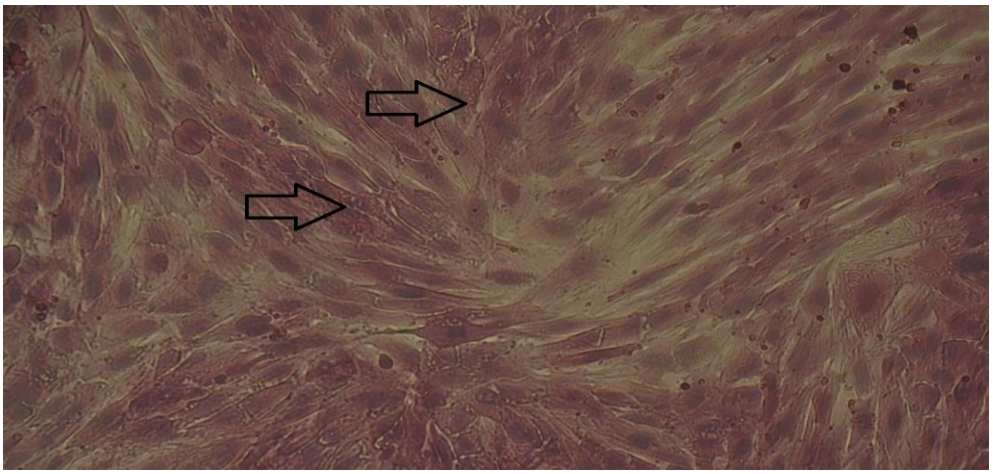
در مورد گروه کنترل، با مطالعه توسط میکروسکوپ نوری، ضایعه خاصی مشاهده نشد (شکل ۳). اما در گروه حاوی تعداد 10^3 سلول قارچی، با رشد قارچ‌ها، سلول‌های زیرین از بین رفته بودند. در سایر سلول‌ها واکوئل‌های ریزی مشاهده گردید. همچنین در تعدادی از سلول‌ها تورم سلولی و تغییر رنگ سیتوپلاسم سلول‌ها و ائوزینوفیلیک شدن آن مشاهده شد (اشکال ۴، ۵ و۶).



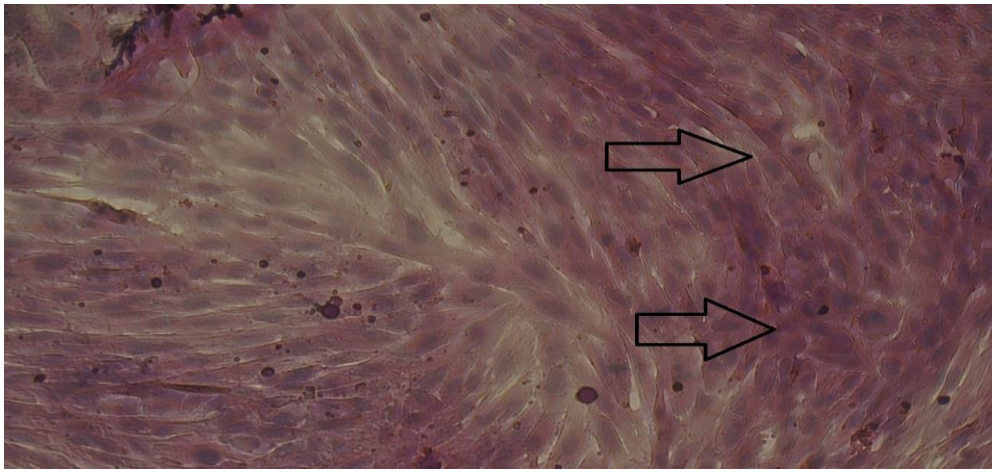
شکل ۳- تصویر سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل که درآن هیچ عارضه خاصی مشاهده نمی‌گردد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۲۰۰×).



شکل ۴- از بین رفتن کامل سلول‌های اسپرماتوگونی در محل رشد کلونی‌های قارچی در گروه 10^3 (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

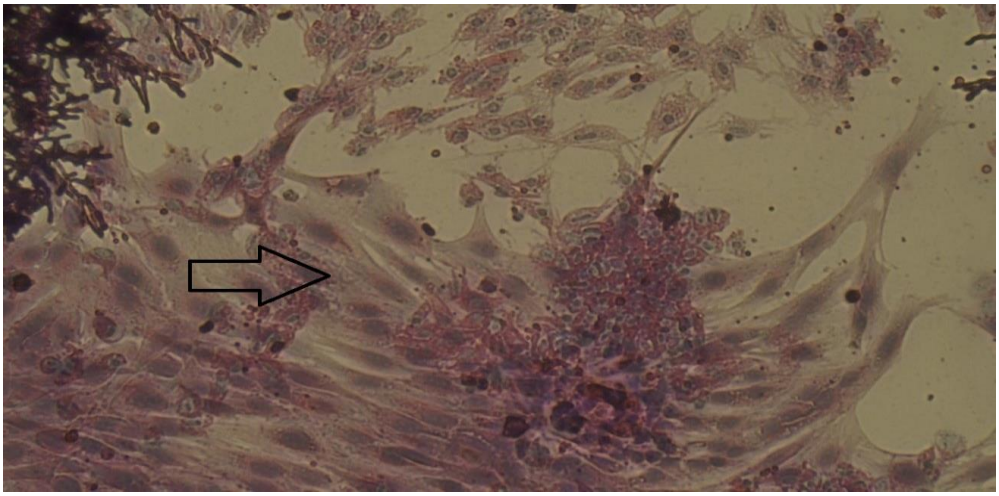


شکل ۵- تشکیل واکوئل‌های ریز در سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه 10^3 (فلش) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

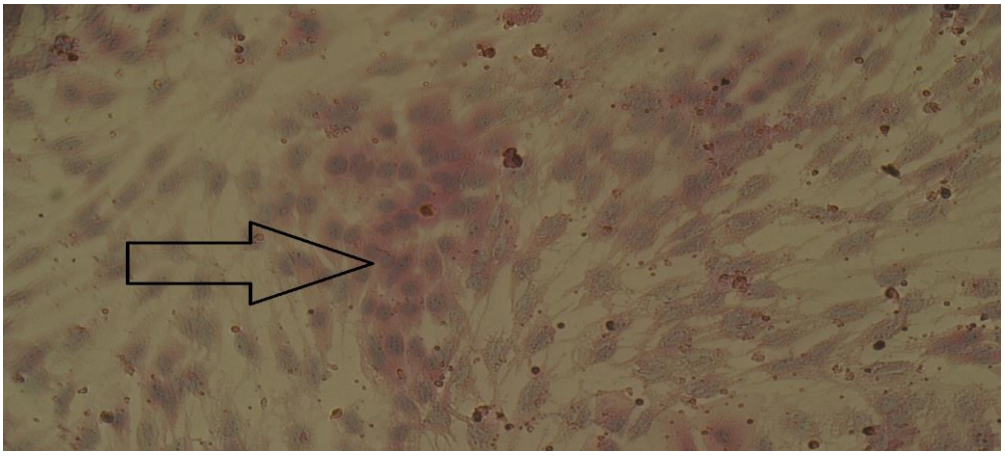


شکل ۶ – سیتوپلاسم بعضی از سلول‌های اسپرماتوگونی ائوزینوفیل‌تر از حالت عادی شده است. (فلش‌ها) گروه 10^3 (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

همچنین با اضافه شدن قارچ‌ها در گروه حاوی تعداد 10^4 سلول قارچی، واکوئله‌شدن در سلول‌ها بیشتر شد، گرچه اندازه واکوئل‌ها تغییر نکرد. سلول‌ها متورم شده و سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک گردید. رشد کلنی‌های قارچی هم بیشتر از گروه قبلی بود. (اشکال ۷ و۸).

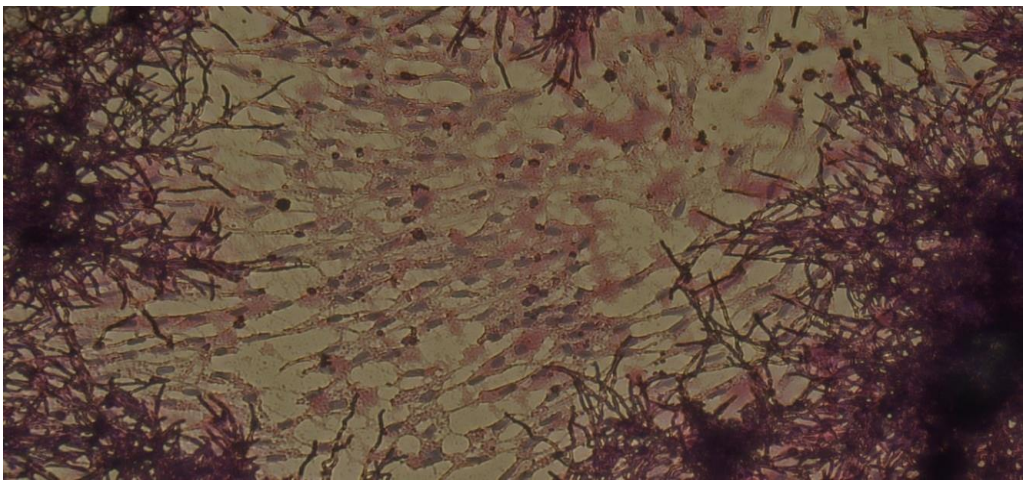


شکل ۷– در گروه حاوی تعداد 10^4 سلول قارچی بعضی از سلول‌های اسپرماتوگونی حالت واکوئله شدن را نشان می‌دهند (فلش) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین– ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).



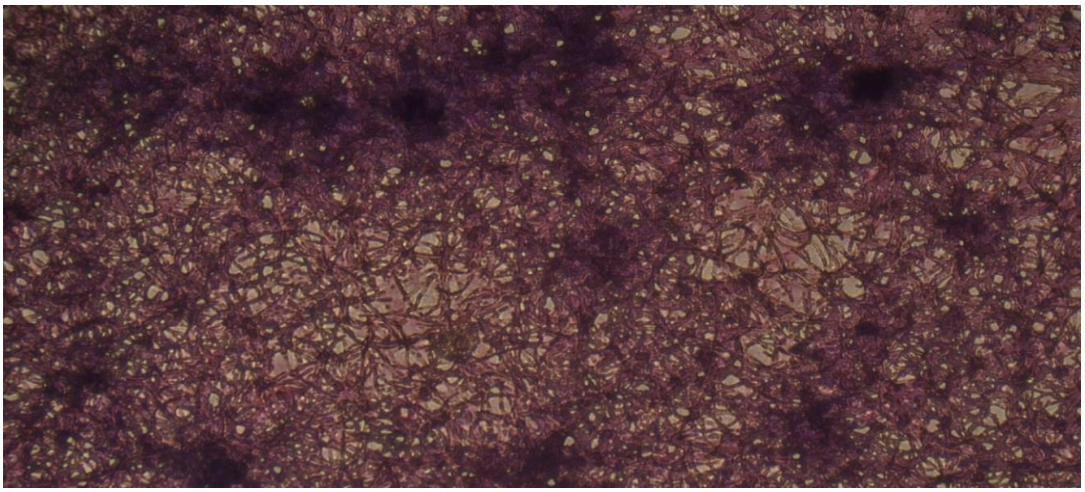
شکل ۸- در گروه حاوی تعداد 10^4 سلول قارچی بعضی از سلول‌های اسپرماتوگونی سیتوپلاسمی ائوزینوفیل‌تر از حالت عادی را نشان می‌دهند و متورم نیز هستند (فلش) (رنگ‌آمیزی - ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

اما در گروه حاوی تعداد 10^5 سلول قارچی، تورم سلول‌ها دیگر مشاهده نشد و به‌جای آن سلول‌ها حالت چروکیده پیدا کردند. سیتوپلاسم آن‌ها هم واکوئله و ائوزینوفیلیک‌تر از حالت عادی بود.



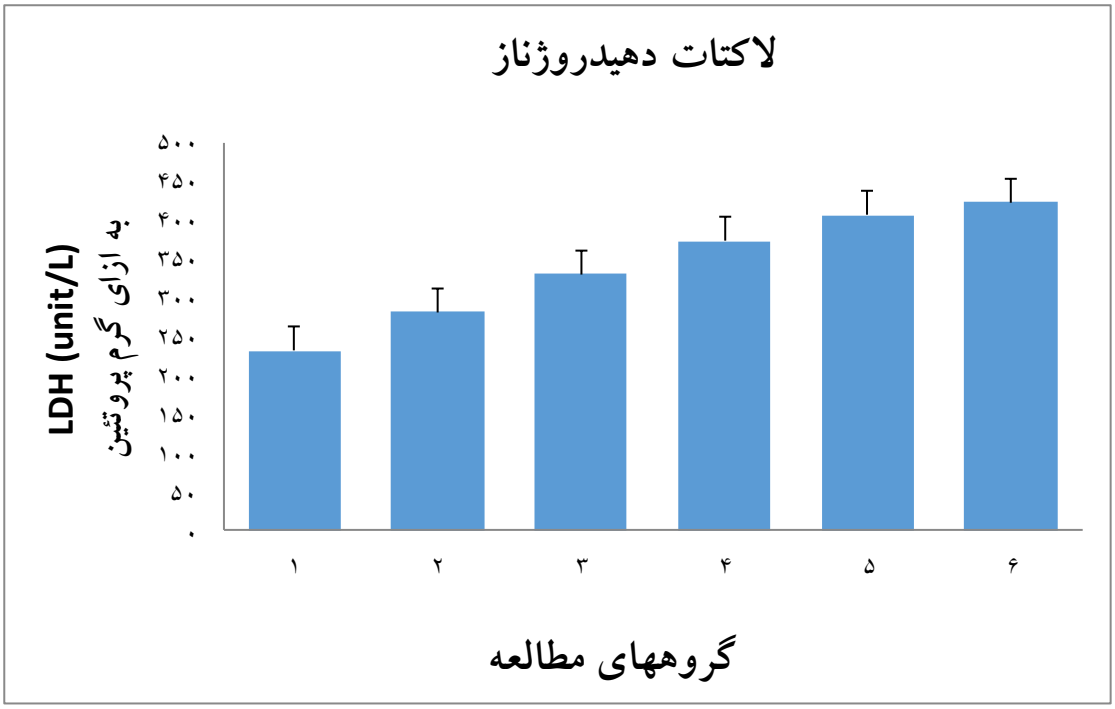
شکل ۹ – در گروه حاوی تعداد 10^5 سلول قارچی اکثر سلول‌های اسپرماتوگونی چروکیده شده است. همچنین سلول‌ها واکوئله و سیتوپلاسم آنها ائوزینوفیل‌تر از حالت عادی است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

در مورد گروه‌های حاوی تعداد 10^6 و 10^7 سلول قارچی، به‌خاطر رشد فراوان قارچ‌ها و پوشیده شدن سطح سلول‌ها توسط آن‌ها، نمی‌توان راجع به وضعیت سلول‌ها اظهار نظر کرد (شکل ۱۰).

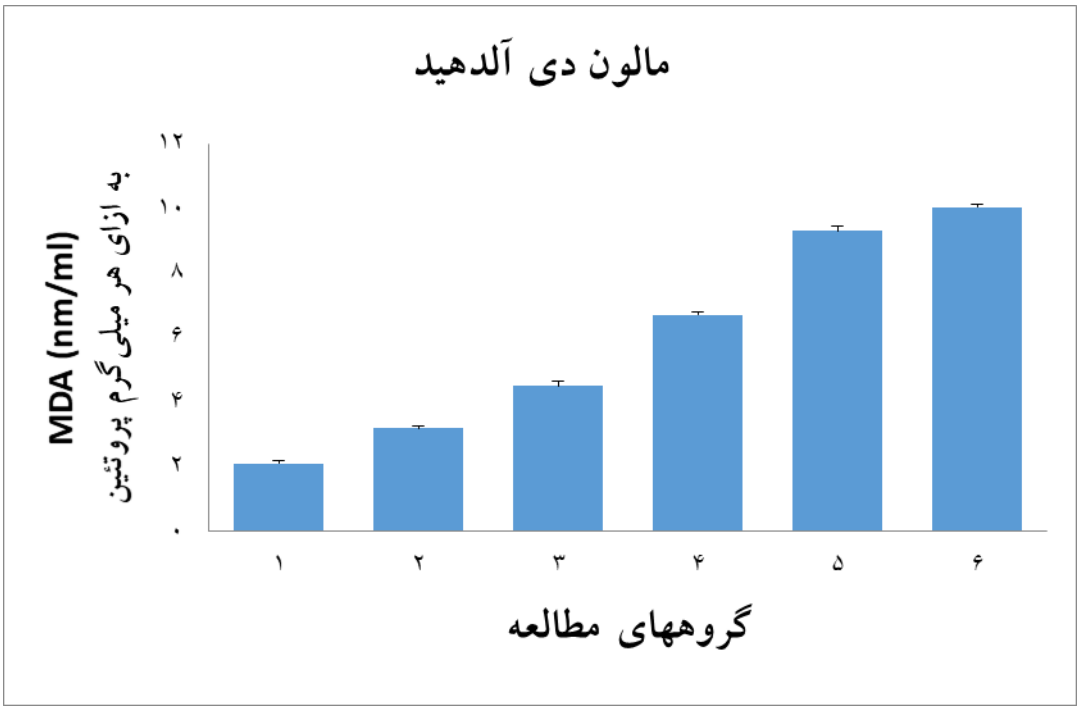


شکل ۱۰- در گروه حاوی تعداد $۱۰^{۶}$ سلول قارچی رشد قارچ‌ها به حدی رسیده که همه سلول‌ها به وسیله آن‌ها پوشیده شده‌اند (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

- **نتایج اندازه‌گیری آنزیم‌ها:** نتایج حاصله از آزمون‌های اندازه‌گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز و حمله اکسیدانی و دفاع آنتی‌اکسیدانی انجام شده در تحقیق حاضر در نمودارهای ۱ و ۲ ارائه شده‌است. ملاحظه می‌گردد که در مورد فاکتورهای مذکور با اضافه شدن میزان قارچ در گروه تحقیق، مقادیر آن‌ها هم بالا می‌رود. که نشان‌دهنده افزایش آسیب سلولی است که این تفاوت‌ها مابین گروه‌های مختلف و گروه کنترل معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). البته دو گروه $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند که می‌تواند به علت این باشد که وجود تعداد فراوان قارچ در گروه $۱۰^{۶}$ حداکثر آسیب را به سلول‌ها رسانده و بالا بردن تعداد قارچ دیگر آسیب را از آن بالاتر نبرده‌است.



نمودار ۱- مقایسه میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در گروه‌های مختلف تحقیق: گروه ۱) شاهد، گروه ۲) حاوی$۱۰^{۳}$ عدد سلول قارچی، گروه ۳) حاوی $۱۰^{۴}$ سلول قارچی، گروه ۴) حاوی $۱۰^{۵}$سلول قارچی، گروه ۵) حاوی $۱۰^{۶}$ سلول قارچی، گروه ۶) حاوی $۱۰^{۷}$ سلول قارچی.



نمودار ۲ – مقایسه میزان آنزیم مالوندی‌آلدئید در گروه‌های مختلف تحقیق: گروه ۱) شاهد، گروه ۲) حاوی$۱۰^{۳}$ عدد سلول قارچی، گروه ۳) حاوی $۱۰^{۴}$ سلول قارچی، گروه ۴) حاوی $۱۰^{۵}$سلول قارچی، گروه ۵) حاوی $۱۰^{۶}$ سلول قارچی، گروه ۶) حاوی $۱۰^{۷}$ سلول قارچی.

بحث و نتیجه‌گیری

جهت شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از آزمون ایمینوسیتوشیمی برای تایید ماهیت سلول‌ها استفاده شد که این سلول‌ها از نظر بیان نشانگر اختصاصی فاکتور رونویسی متصل شونده به OCT-4 (Octamer-binding transcription factor 4) مثبت بودند (شکل ۲) و از این نظر با سایر مطالعات مشابه مطابقت داشت (Luo *et al*., 2006; Dann *et al*., 2008).

برای شناسایی سلول‌های سرتولی نیز از آزمون ایمینوسیتوشیمی استفاده شد که در طی آن یکی از پروتئین‌های اسکلت سلولی به نام وایمنتین مورد ارزیابی واقع گردید که نتایج حاصله از این آزمون، وجود این پروتئین را در سلول‌های رشد یافته نشان داد (شکل ۱) و لذا این یافته هم با نتایج سایر مطالعات مطابقت داشت (Anway *et al*., 2003; Koruji *et al*., 2007).

انتخاب عامل پاتوژن بدلیل ایجاد آسیب در سلول‌های رده اسپرماتوژن و ایجاد ارکیت توسط قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در حیوانات درگیر بود (Pimental *et al*., 1996; Perumal *et al*., 2013) از مطالعات مشابهی که در این زمینه وجود دارد می توان به تاثیر قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بر روی ماکروفاژهای کشت داده شده در آزمایشگاه اشاره کرد که قارچ *کاندید آلبیکنس* موجب آسیب سلولی و تاخیر در بالغ شدن فاگوزوم ماکروفاژها شده است و رشد قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در محیط کشت بصورت هایفی و رشته ای بوده (شکل‌های ۹ و ۱۰) که این بخش از مطالعه مذکور مشابه نتایج مطالعه حاضر بود (Bain *et al*., 2014). در هم‌کشتی *کاندیدا آلبیکنس* به همراه لاین سلولی RAW264.7 با منشأ ماکروفاژهای موشی دیده شده که قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در نهایت موجب مرگ سلولی ماکروفاژها می‌شود (Marcil *et al*., 2002).

نشان داده شده است زمانی که قارچ کاندیدا آلبیکنز دارای رشد هایفی باشد از حدت بیشتری برخوردار است قابل ذکر است رشد هایفی *کاندیدا آلبیکنس* در صورت نامساعد بودن شرایط محیطی برای رشد قارچ انجام نخواهد شد (Chen *et al*., 2020,). چسبندگی یکی از عوامل حدت *کاندیدا آلبیکنس* بوده که نقش مهمی در آسیب زایی کاندیدا دارد (Goswami *et al*., 2000) در مطالعه‌ای میزان چسبندگی *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به دیگر گونه های کاندیدا همچون *کاندیدا دابلیننسیس* بر روی رده های سلولی Buccal epithelial cell و Vaginal epithelial cell بیشتر بوده‌است. (Vidotto *et al*., 2003)، همچنین سرعت چسبیدن قارچ به رده های سلولی مختلف هم متفاوت است (Sohn *et al*., 2006; Negri *et al*., 2011; Silva *et al*., 2011). در هم‌کشتی *کاندیدا آلبیکنس* و رده‌های سلولی HELA و VERO میزان چسبندگی و سرعت رشد *کاندیدا آلبیکنس* در حضور گلوکز بیشتر از کربوهیدرات‌های دیگر ارزیابی شد (Pires *et al*., 2001) با توجه به استفاده از محیط کشت سرشار از گلوکز DMEMF-12 در این مطالعه، این مورد می‌تواند دلیل مناسبی برای رشد سریع قارچی و چسبندگی آن به سطوح سلولی و کف در مطالعه حاضر باشد.

در مطالعات با تاثیر دو آنزیم پروتئولیتیک کلاژناز و الاستاز بر روی لاین‌های سلولی مختلف اثرات سیتوتوکسیک این آنزیم‌ها بر روی سلول‌ها ، با کاهش

میزان بقای سلولی مشاهده می‌گردد .فعالیت آنزیمی دو آنزیم پروتئولیتیک کلاژناز و الاستاز در *کاندیدا آلبیکنس* بیشتر *از سایر کندیداها است* (Sayed *et al*., 2012).

علاوه بر بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها، پارامترهای LDH و MDA نیز جهت تایید آسیب وارده اندازه‌گیری شدند که نشان‌دهنده افزایش آسیب سلولی وارده به سلول‌ها با افزایش دز قارچی در گروه‌ها می‌باشد. از آنجایی‌که ترشح آنزیم لاکتات دهیدروژناز به عنوان یک مارکر مناسب برای تشخیص میزان آسیب و مرگ سلولی می‌باشد لذا اندازه‌گیری این شاخص بیوشیمیایی، برای تایید آسیب در انواع سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی استفاده گسترده‌ای دارد (Kono and Rock, 2008). نتایج بیوشیمیایی حاصله از اندازه‌گیری LDH در مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش تعداد قارچ‌ها در گروه‌های موجود، میزان LDH نیز دارای روند افزایشی می‌باشد این مورد احتمالاً به دلیل نشت آنزیمی اندامک‌های سلول به سیتوپلاسم است که پس از تخریب غشای سیتوپلاسمی، به این صورت قابل مشاهده و اندازه‌گیری است. در مطالعه نگری و همکاران برای تایید آسیب در سه رده سلولی TCC-SUP، HELA و Caco-2 توسط قارچ کاندیدا، اندازه‌گیری شاخص لاکتات دهیدروژناز انجام شده و آزاد شدن این آنزیم به محیط کشت تایید شد (Negri *et al*., 2011).

همچنین در مطالعات انجام گرفته بر روی رده سلولی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی C18-4 (Braydich-Stolle *et al*., 2005; Moghimi *et al*., 2005) مشاهده شده است که میزان LDH آزاد شده با افزایش آسیب سلولی و کاهش زنده مانی سلول‌ها، معمولا روند افزایشی داشته است. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با اطلاعات و نتایج موجود در مطالعات قبلی همخوانی دارد (نمودار۱). شاخص دیگری که در این مطالعه اندازه‌گیری شد، مالون‌دی‌آلدئید بود عوامل پاتوژن با پراکسیداسیون چربی در سلول‌ها، موجب افزایش استرس اکسیداتیو و بدنبال آن افزایش مالون-دی‌آلدئید می‌گردند. در مطالعه‌ای با افزودن ماده تیتانیوم دی‌اکسید به سلول‌های استئوبلاست انسانی با افزایش میزان ماده آسیب رسان، سطح مالون دی آلدهید نیز افزایش یافته است (Niska *et al*., 2015). با تاثیر انواع مختلف مواد آسیب رسان بر روی رده‌های سلولی مختلف همچون تاثیر Grafen Oxid بر روی رده سلولی RPMI8226 (Wang *et al*., 2014)، تاثیر اتانول بر رده سلولی HEPG2 (Ogany *et al*., 2008)، میزان مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافته است. در مطالعه‌ای با تاثیر مورفین بر روی رده سلولی pc12 (Shang *et al*., 2007) مشاهده شده است که علاوه بر مالون‌دی‌آلدئید، شاخص LDH نیز با افزایش میزان ماده سیتوتوکسیک افزایش می یابد. همچنین در مطالعاتی با اضافه کردن افزودنی‌های مفید مثل عصاره Bee hony بر رده سلولی HEPG2 (Hassan *et al*., 2013) و عصاره چای سبز بر سلول‌های Jurkat T انسانی (Erba *et al*., 1999)، میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های تیمار شده کاهش یافته بود. هر چند در برخی مطالعات اثرات سیتوتوکسیک مواد آسیب رسان بر روی سلول‌ها، مانند اثرات سیتوتوکسیک روغن‌های ضروری Chenopodium ambrosioides بر رده سلولی MCF-7 (Liang *et al*., 2013) تغییرات معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدئید

ایجاد نکرده بود. نتایج مطالعات موجود با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش متناسب می‌باشد.(نمودار ۲).

به‌طور کلی طبق نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با رشد سریع خود در کنار سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی و در محیط کشت، موجب ایجاد آسیب سلولی در سلول‌های مذکور شده که در نهایت می‌تواند به مرگ سلولی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی نیز ختم شود. این آسیب سلولی می‌تواند از طریق ایجاد شرایط رقابتی توسط *کاندیدا آلبیکنس* در محیط کشت و همچنین اثرات پاتولوژیک حاصل از متابولیت‌های ترشحی از قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، حاصل شود. البته پیشنهاد می‌شود که اثر سایر قارچ‌ها هم در کشت این سلول‌ها بررسی شود و از تکنیک‌های بیشتری که امکان آن برای محققان وجود دارد برای بررسی اثرات این قارچ و سایر قارچ‌ها بر روی کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی و همچنین در مورد سایر رده‌های سلولی استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز جهت تامین هزینه این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Anway, M.D., Folmer, J., Wright, W.W. and Zirkin, B.R. (2003). Isolation of Sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of sertoli cell function. Biology of Reproduction, 68(3): 996-1002.
- Bain, J.M., Louw, J., Lewis, L.E., Okai, B., Walls, C.A., Ballou, E.R., et al. (2014). Candidia albicans hypha formation and mannan masking of β-glucan inhibit macrophage phagosome maturation. Microbiology, 5(6): 1874-1881.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J. and Hofmann, M.C. (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicological Sciences, 88(2): 412-419.
- . Chen, H.; Zhou, X.; Ren, B.; Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in Candida albicans. Virulence, 11(1): 337-348
- Daghigh Kia, H., Sadeghi Sadegh Abad, F., Ebrahimi, M. and Samadian, F. (2017). Comparative effect of different concentrations of hydro-ethanolic extract of chamomile on freeze-thawn semen quality of rams. Veterinary Clinical Pathology, 11(41):13-24. [In Persian]
- Dann, C.T., Alvarado, A.L., Molyneux, L.A., Denard, B.S., Garbers, D.L. and Porteus, M.H. (2008). Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a Factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. Stem Cells, 26(11): 2928-2937.
- Erba, D., Riso, P., Colombo, A. and Testolin, G. (1999). Supplementation of jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. The Journal of Nutrition, 129(12): 2130-2134.

- Goswami, R., Dadhwal, V., Tejaswi, S., Datta, K., Paul, A., Haricharan, R.N., et al. (2000). Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. Journal of Infection, 41(2): 162-166.
- Griswold, M.(2018). 50 years of Spermatogenesis: Sertoli cells and their Interactions with Germ Cells Biology of Reproduction, 99(1): 87-100.
- Hassan, M.I., Zahran, F.M., Shehata, H.H. and Abdelhamid, M.S. (2013). The inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory effect of bee hony on hepatocellular carcinoma cell line hepG2. International Journal of Biological and Pharmaceutical Research, 4(9): 618-626.
- Hofmann, M.C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. Molecular and Cellular Endocrinology, 288(1): 95-103.
- Hull, C.M., Raisner, R.M. and Johnson, A.D. (2000). Evidence for mating of the" asexual" yeast candida albicans in a mammalian host. Science, 289(5477): 307-310.
- Jia-liang, W., Dan-wei, M., Ya-nan., W., Hong, Z., Bing, H., Qun, L., et al. (2013). Cytotoxicity of Essential Oil of Chenopodium ambrosioides L against Human Breast Cancer MCF-7 Cells. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12(6): 929-933
- Kono, H. and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. Nature Reviews Immunology, 8: 279-289
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. and Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of Clinical Pathology, 54(5): 356-361.
- Koruji, M., Movahedin, M., Mowla, S.J. and Gourabi, H. (2007). Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. International Journal of Reproductive Biomedicine, 5(3): 109-115.
- Koruji, M., Movahedin, M., Mowla, S.J., Gourabi, H. and Jabari Arfaei, A. (2007). The effects of inducer factors on adult mouse spermatogonial cells colony formation in vitro. Cell Journal, 2(9):141-150
- Luo, J., Megee, S., Rathi, R. and Dobrinski, I. (2006). Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: Application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. Molecular Reproduction and Development, 73(12): 1531-1540.
- Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (2002). Candida albicans killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of candida genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. Infection and Immunity, 70(11): 6319-6329.
- Mescher, A. (2018). Junqueira’s basic histology. Text and Atlas.15th ed., New York .McGraw Hill Education, pp: 480.
- Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G. and Szewczyk, A. (2005). A two-stage poly (ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. Molecular Therapy, 11(6): 990-995.
- Negri, M., Botelho, C., Silva, S., Lopes, L.M.R.H., Henriques, M., Azeredo, J. and Oliveira, R. (2011). An in vitro evaluation of candida tropicalis infectivity using human cell monolayers. Journal of Medical Microbiology, 60(9): 1270-1275.
- Nematollahi, A., Habashizadeh, M., Raafat, S.A. and Moghaddam, Gh. (2020). Retrospective survey of the abundance of nematodes in the digestive tract of sheep in East Azerbaijan province and calculation of correlation between egg per gram (EPG) and humidity in the mentioned regions. Veterinary Clinical Pathology, 13(52): 328-340. [In Persian]
- Niska, K., Pyszka, K., Tukaj, C., Wozniak, M., Radomski, M.W. and Inkielewicz-Stepniak, I. (2015). Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. International Journal Nanomedicine, 10: 1095-1107.
- Ogony, J., Matthews, R., Anni, H., Shannon, K. and Ercal, N. (2008). The mechanism of elevated toxicity in HepG2 cells due to combined exposure to ethanol and ionizing radiation. Journal of Applied

- Pappas, P.G., Lionakis, M.S.,Arendrup,M. C.,Ostrosky-Zeichner,L. and Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. Nature Reviews Disease Primers, 4: Article number: 18026.
- Perumal, P., Chamuah, J.K., Srivastava, N., Vupru, K. and Srivastava, S.K. (2013). Infectious causes of infertility in Buffalo bull. International Journal of Bio-Resource and Stress Management, 4(1): 84-90.
- Pimentel, M., Nicolle, L.E. and Qureshi, S. (1996). Candida albicans epididymo-orchitis and fungemia in a patient with chronic myelogenous leukemia. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 7(5): 332-334.
- Pires, M.D.F.C., Corrêa, B., Gambale, W. and Paula, C.R. (2001). Experimental model of Candida albicans (serotypes A and B) adherence in vitro. Brazilian Journal of Microbiology, 32(3): 163-169.
- Rodriguez-Sosa, J.R., Dobson, H. and Hahnel, A. (2006). Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenology, 66(9): 2091-2103.
- Sayed, M.A., Rahman, T.M.A., Assem, M.M. and Sayed, M.R.E. (2012). Cytotoxicity of collagenases and elastases purified from candida species on some carcinoma cell lines. Jordan Journal of Biological Sciences, 5(4): 321-330.
- Shang, Y.Z., Qin, B.W., Cheng, J.J. and Miao, H. (2008). Effect of scutellaria falvonoids on KCN-induced damages in rat pheochromocytoma PC12 cells. Indian Journal of Medical Research, 127(6): 610-615.
- Shekari, A., Safavi, SE. and Mousavi, GH. (2020) Effect of Coenzyme Q10 on testicular tissue after correction of experimental cryptorchidism in rat. Veterinary Clinical Pathology, 14(54):168-184. [In Persian]
- Silva, S., Hooper, S.J., Henriques, M., Oliveira, R., Azeredo, J. and Williams, D.W. (2011). The role of secreted aspartyl proteinases in candida tropicalis invasion and damage of oral mucosa. Clinical Microbiology and Infection, 17(2): 264-272.
- Sohn, K., Senyürek, I., Fertey, J., Königsdorfer, A., Joffroy, C., Hauser, N., et al. (2006). An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of Candida albicans to different human epithelia. Fems Yeast Research, 6(7): 1085-1093.
- Touray, M. and Touray, A. (2021). Urology and Nephrology. In: Clinical Work and General Management of a Standard Minimal-Resource Facility. Sustainable Development Goals Series. Springer, pp: 107-121
- Van Pelt, A.M., Morena, A.R., van Dissel-Emiliani, F.M., Boitani, C., Gaemers, I.C., De Rooij, D.G., et al. (1996). Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. Biology of Reproduction, 55(2): 439-444.
- Vidotto, V., Mantoan, B., Pugliese, A., Pontón, J., Quindós, G., Aoki, S., et al. (2003). Adherence of candida albicans and Candida dubliniensis, to buccal and vaginal cells. Revista Iberoamericana De Micología, 20(2): 52-54.
- Wang, Y., Wu, S., Zhao, X., Su, Z., Du, L. and Sui, A. (2014). In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells. Biomedical Materials and Engineering, 24(6): 2007-2013.