تحقیقات تولیدات دامی
سال دوم/ شماره دوم/ تابستان ۱۳۹۲ (۱۷-۱۱)

اثر استرس حرارتی بر سلول‌های سرتولی گوسفند در شرایط آزمایشگاهی

فروتن صالحی‌نژاد[۱]، ابوالقاسم لواف[۲]، علی کدیور[۳*]، حسین حسن‌پور[۴]، حسن نظری[۵]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دامی، گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران
۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران
۳- استادیار پژوهشکده فناوری جنین دام دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- دانشیار گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۵- دانشجوی دکترای زیست فناوری تولید مثل دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت ۹۱/۱۲/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۷)

چکیده

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرتولی گوسفند تحت تاثیر استرس حرارتی به انجام رسید. بیضه‌های مربوط به ۱۰ بره نر (طی ۵ نوبت) از کشتارگاه تهیه شد و پس از انتقال بیضه‌ها به آزمایشگاه، جداسازی و کشت سلول‌های سرتولی به انجام رسید. سلول‌های جدا شده از بیضه‌های هر بره در سه پتری‌دیش تقسیم شد و در دمای ۳۲ ^{o}C (شاهد)، ۳۹ ^{o}C (استرس خفیف) و ۴۲ ^{o}C (استرس شدید) برای ۶ ساعت نگهداری شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها، میزان پراکسیداسیون چربی (TBARS)، قدرت آنتی‌اکسیدانی (FRAP) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در همه گروه‌ها پس از ۶ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده به طور معنی‌داری در گروه ۴۲ ^{o}C (۶/۸ ± ۷۸) نسبت به گروه شاهد (۹/۳ ± ۹۵) کاهش یافت (P<۰/۰۵). میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه ۴۲ ^{o}C (۰/۰۶ ± ۰/۶۵) به طور معنی‌دار بالاتر از گروه شاهد (۰/۰۵ ± ۰/۴۶) بود (P<۰/۰۵). بر اساس نتایج تحقیق حاضر، استرس حرارتی می‌تواند با افزایش پراکسیداسیون لپیدی، عاملی مضر برای زنده‌مانی سلول‌های سرتولی باشد.

واژهای کلیدی: استرس حرارتی، سلول سرتولی، گوسفند

* نویسندهٔ مسئول: kadivar.ali@vet.sku.ac.ir

مقدمه

بیضه عضوی است که عملکرد طبیعی آن وابسته به دما است. قرار گرفتن بیضه‌ها در داخل کیسه بیضه سبب می‌شود که بیضه‌ها در دمایی کمتر از دمای بدن (۳۴ ºC-۳۲) قرار بگیرند (Ivell, 2007). اهمیت این تنظیم دما در بیضه بسیار زیاد است زیرا افزایش دما می‌تواند روند تولید اسپرم را دچار اختلال کرده و سبب ایجاد مشکلاتی در باروری گردد (Zhu and Setchell, 2004). تاکنون اختلال دستگاه تولید مثل نر ناشی از استرس حرارتی در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که در ادامه به بعضی از آنها استناد شده است. مشخص شده است که استرس حرارتی سبب از بین رفتن سلول‌های زاینده در بیضه موش می‌شود (Zhu and Setchell, 2004). همچنین، استرس حرارتی گذرا (بیش از ۴۰ ºC) و یا قرار دادن بیضه‌ها و اپیدیدیم در داخل محوطه شکمی موش با روش جراحی، سبب کاهش وزن بیضه، افزایش مرگ سلولی (آپوپتوز) و کاهش قابلیت باروری سلول‌های اسپرم می‌شود (Lue *et al.*, 1999).

سلول سرتولی یکی از اصلی‌ترین سلول حمایتی موجود در دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز است. سلول سرتولی دارای نقشی اساسی در تغذیه و تکامل سلول‌های زاینده اسپرم در لوله‌های اسپرم‌ساز بوده و به این ترتیب دارای نقش مهمی در فرایند اسپرم‌سازی است (Griswold, 1995). مشخص شده است که گلیکوپروتئین‌های سلول‌های سرتولی نقش‌های مختلفی در فرایند اسپرم‌سازی در بیضه‌ها دارند (Griswold, 1995). با توجه به نقش بسیار مهم و حیاتی که سلول‌های سرتولی در فرایند تولید اسپرم در بیضه‌ها ایفا می‌کنند، برقراری هر شرایطی که بتواند سبب آسیب به این سلول‌ها شده و یا عملکرد آنها را دچار اختلال نماید تولید اسپرم و در نتیجه باروری در جنس نر را به شدت تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. یکی از عوامل آسیب‌رسان، بروز استرس حرارتی است. تاکنون مطالعات کمی چگونگی تاثیر استرس حرارتی بر سلول‌های سرتولی را مورد بررسی قرار داده‌اند. در این ارتباط یافته‌های بالینی در پستانداران حکایت از تاثیر مخرب استرس حرارتی بر باروری جنس نر دارند (Mieusset, 1992; Hochereau-deRevier, 1993). مطالعات قبلی نشان دادند که حرارت با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در دستگاه تولید مثل موجب بروز ناباروری می‌شود (Turne and Lysiak, 2008). از آنجا که استرس می‌تواند از طریق تولید رادیکال آزاد موجب پراکسیداسیون چربی‌های غشا سلول‌ها و نهایتاً تخریب آنها شود (Sharma and Agarwal, 1996)، در این مطالعه به‌دنبال این اثر بر سلول‌های سرتولی ناشی از استرس حرارتی بوده‌ایم. جهت بررسی اثر ترکیبات اکسیدان در سلول‌های متاثر از استرس حرارتی، میزان این ترکیبات با استفاده از آزمایش TBARS[1] اندازه‌گیری شد. از طرفی میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های سرتولی در مواجهه با حرارت با استفاده از آزمون FRAP[2] سنجیده شد تا میزان واکنش سلول‌های سرتولی در مقابله با این استرس ارزیابی شود. در همین راستا فعالیت یکی از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سلولی به نام سوپراکسید دیسموتاز که شاخصی مهم از چگونگی عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول محسوب می‌شود، نیز اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

کشت و آماده‌سازی سلول سرتولی

بیضه‌های مربوط به ۱۰ بره نر ۳ تا ۱۰ ماهه در طی ۵ نوبت از محل کشتارگاه تهیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از انتقال نمونه‌ها، بیضه‌ها توسط الکل ۷۰ درصد چند بار شسته و ضدعفونی شده و پس از آن لایه Tunica albuginea برش داده شده و مقداری از بافت پارانشیم بیضه برداشت شد. جداسازی و کشت سلول‌های سرتولی مطابق روش Izadyar *et al.* (2002) با کمی اصلاح انجام شد. بافت بیضه در ظرف استریل دیگری قطعه قطعه شد و این قطعات به لوله ته مخروطی انتقال داده شد. در مرحله بعد و به منظور هضم آنزیمی، ابتدا آنزیم کلاژناز (17104-019, Gibco, UK) به نمونه اضافه شده و درون گرمخانه ۳۷ ºC قرار داده شد. پس از نیم ساعت، نمونه‌ها به مدت ۴ دقیقه در دمای آزمایشگاه با ۴۰۰×g سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی که حاوی سلول‌های لیدیگ هضم شده بود، دور ریخته شد. در مرحله هضم آنزیمی دوم، محلولی حاوی تریپسین (25300054, Gibco, UK) و DNAse (D5025, Sigma, Germany) به میزان ۲۰ µl/ml، به نمونه اضافه شد. نمونه حاوی این دو آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه درون گرمخانه ۳۷ ºC قرار داده شد. بعد از اتمام هضم دوم آنزیمی، نمونه به مدت ۴ دقیقه

1. Thiobarbituric Acid Reactive Substances
2. Ferric Reducing Ability of Plasma

در g×۴۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شده و از سلول‌های سرتولی ته‌نشین شده در کف جهت کشت در محیط DMEM (10567-014, Gibco, UK) استفاده شد. سلول‌های به دست آمده از بیضه‌های هر بره در سه پتری‌دیش تقسیم شد و در دمای ºC ۳۲ (شاهد)، ºC ۳۹ (استرس خفیف) و ºC ۴۲ (استرس شدید) برای ۶ ساعت نگهداری شد. بعد از این مدت میزان زنده‌مانی سلول‌های کشت شده ارزیابی شد. سپس نمونه‌های سلولی با دستگاه سونیکاتور (Branson B3, sonicator, Germany) در مدت ۱۰ ثانیه و دامنه قدرت ۹۰ متلاشی شدند. سپس میزان کل پروتئین سلولی در هر میلی‌لیتر از محیط کشت موجود در پتری‌دیش‌ها به عنوان پروتئین تام اندازه‌گیری شد. میزان پراکسیداسیون چربی، میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر گروه سلولی سنجیده شد و سپس نتایج این آزمایشات بر اساس میزان پروتئین تام یکسان‌سازی شد. در واقع نتایج برحسب هر میلی‌لیتر پروتئین تام ارایه شد.

شمارش سلول‌های مرده و زنده

در این روش از رنگ تریپان بلو (۰/۴ درصد) استفاده شد. به این صورت که مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر از رنگ مخلوط شد. سپس با استفاده از لام هماسیتومتر تعداد سلول‌ها در ۲۵ خانه میانی زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی × ۱۰ شمارش شده و نسبت سلول‌های زنده به کل سلول‌ها به صورت درصد بیان شد. در این روش رنگ‌آمیزی، سلول‌های زنده رنگ آبی تریپان بلو را به خود نمی‌گیرند در حالیکه سلول‌های مرده به صورت آبی رنگ دیده می‌شدند (Altman *et al.*, 1993).

اندازه‌گیری پروتئین تام

به این منظور از محلول آماده Bradford (B6916, Sigma, Germany) استفاده شد. اندازه‌گیری پروتئین کل سلول‌ها طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. میزان جذب نوری پروتئین کل هر نمونه در طول موج ۵۹۵ nm خوانده شد. برای سنجش نهایی مقدار پروتئین کل برحسب µg/ml، از نمودار استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی

جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از روش TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) استفاده شد (Yagi, 1998). در این روش مقدار مالون‌دی‌آلدهید (malondialdehyde) به عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپیدی سنجیده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه به ۲ میلی‌لیتر از محلول کار (ترکیبی از ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال، ۰/۳۷۵ گرم تیوباربیوتریک اسید و ۱۵ گرم اسید تری کلرو استیک) افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در داخل حمام °C ۱۰۰ قرار گرفت. پس از این، نمونه‌ها در دمای اتاق سرد شده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰ دور در دقیقه) شدند. محلول رویی برداشت شده و جذب نوری آن در مقابل بلانک با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Corning 480, USA) در nm ۵۳۵ قرائت شد. با استفاده از محلول استاندارد مالون‌دی‌آلدهید (T9889, Sigma, Germany) نمودار استاندارد تهیه شد و مقادیر جذب نوری به صورت میکرومولار محاسبه شد.

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی

جهت سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، از روش FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma Assay) استفاده شد. µl ۱۰۰ از نمونه با ml ۳ از محلول FRAP (ترکیبی از ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات (31048, Sigma, Germany)، ۱۰ میلی‌مولار محلول Tris-2-pyridyl-s-triazine (T1253, Sigma, Germany) و ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن (372870, Sigma, Germany)) مخلوط شد و طول موج در جذب نوری nm ۵۹۳ قرائت شد. ابتدا جذب نوری در دقیقه صفر خوانده شد. سپس نمونه‌ها در °C ۳۷ به مدت ۴ دقیقه قرار گرفته و بعد از طی این زمان جذب نوری دوباره خوانده شد. ارزش FRAP هر نمونه مطابق با روش Iris *et al.* (1996) محاسبه و تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

به منظور اندازه‌گیری این آنزیم از کیت Ransod (Randox, England) استفاده شد و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به انجام رسید. در این کیت از ترکیب گزانتین استفاده شده است که در حضور آنزیم گزانتین اکسیداز تولید سوپراکسید می‌نماید. سوپراکسید با ترکیب دیگری تحت عنوان *2-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium iodophenyl)-3-chloride (INT)* واکنش داده و تولید رنگ قرمز Formazan می‌نماید که میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در نهایت بر اساس میزان مهار این واکنش سنجیده شد. نتایج با واحد unit/ml ارایه شده است.

جدول ۱- اثر حرارت بر سلول‌های سرتولی جدا شده از بیضه بره

Table 1. Effect of heat on sertoli cells isolated from lamb testis

Groups / Tests	Severe heat stress (42 °C)	Mild heat stress (39 °C)	Control (32 °C)
Live cells (%)	78 ± 6.8 *	96 ± 8.6	95 ± 9.3
TBARS (µM)	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.06	0.46 ± 0.05 *
FRAP (µM)	56.21 ± 5.58	50.03 ± 3.68	51.26 ± 4.67
SOD (unit/ml)	6.4 ± 0.7	5.4 ± 0.8	5.2 ± 0.9

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; FRAP: Ferric reducing ability of plasma assay; SOD: Super oxide dismutase.

* Significantly different *vs*. other groups (P<0.05).

تجزیه آماری

داده‌های به دست آمده در برنامه آماری SPSS با استفاده از روش One way ANOVA بین گروه‌های شاهد و تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارایه شدند. مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شدند.

نتایج

کمترین درصد سلول‌های زنده در گروه استرس شدید حرارتی مشاهده شد (جدول ۱؛ P<۰/۰۵) و سایر تیمارها تفاوتی را نشان ندادند. میزان تولید MDA در گروه‌های استرس خفیف و شدید حرارتی بالاتر از گروه شاهد بود (جدول ۱؛ P<۰/۰۵). تفاوتی بین تیمارها از نظر قدرت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز وجود نداشت (جدول ۱؛ P>۰/۰۵).

بحث

بیضه پستانداران برای عملکرد صحیح باید دمایی کمتر از دمای بدن داشته باشد. ویژگی‌های تشریحی بیضه و کیسه بیضه، امکان تنظیم دما را فراهم می‌کند (Hees *et al.*, 1990). سلول‌های بیضه در این دمای پایین قادر به حداکثر فعالیت خود هستند. سلول‌های سرتولی از مهمترین سلول‌های تشکیل دهنده بافت بیضه بوده که در فرایند اسپرماتوژنز نقش بسزایی دارند (Russell, 1980; Wong, 2005).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد سلول‌های زنده با اعمال استرس حرارتی (۴۲ °C) کاهش معنی‌داری می‌یابد که حاکی از اثر مخرب این نوع استرس برای سلول‌های سرتولی است. مشخص شده است که رساندن دمای اسکروتوم در قوچ به ۴۲ °C برای مدت زمان ۴۵ دقیقه سبب کاهش وزن بیضه، کاهش متوسط قطر لوله‌های اسپرم ساز، کاهش قطر هسته سلول‌های سرتولی، کاهش تعداد سلول‌های زاینده از اسپرماتوگونیاهای A_1 به بعد و کاهش تولید اسپرم طبیعی ۲۰ روز پس از اعمال استرس حرارتی شده است (Hochereau-de Reviers *et al.*, 1993). افزایش دمای اسکروتوم قوچ به مقدار ۱/۵ تا ۲/۲ °C برای ۱۶ ساعت در روز و در مدت زمان ۲۱ روز به صورت یک روز در میان سبب کاهش قابل ملاحظه در میزان زنده‌مانی جنین در فاصله روزهای ۱۷ تا ۶۵ پس از تلقیح در مقایسه با گروه شاهد شد (Mieusset *et al.*, 1992). در این مطالعات، استرس ناشی از حرارت به عنوان عامل اصلی عوارض ذکر شده، بیان شده است (Mieusset *et al.*, 1992). چنین به نظر می‌رسد که این استرس حرارتی هم به صورت آناتومیک و هم فیزیولوژیک اثر منفی خود را بر بیضه اعمال می‌کند.

ثابت شده است که استرس اکسیداتیو سبب بروز آسیب به غشاها، پروتئین‌ها، DNA و RNA سلولی می‌شود (Helmut, 1997). بیضه با داشتن آنتی‌اکسیدان‌های متعددی مانند آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، هم‌اکسیژناز و گلوتاتیون ترانسفراز توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد تولید شده در بیضه (به طور مثال رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل) را داشته تا از آسیب به وجود آمده به وسیله این ترکیبات به بافت بیضه و سلول‌های زاینده جلوگیری کند (Turne and Lysiak, 2008). بروز برخی از شرایط استرس‌زا، تعادل بین میزان رادیکال آزاد تولیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی بیضه را بر هم زده و باعث بروز شرایط استرس اکسیداتیو در بیضه می‌شود (Turne and Lysiak, 2008). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با بروز استرس شدید حرارتی میزان مرگ سلولی و میزان پراکسیداسیون چربی به طور معنی‌دار

افزایش یافت. مشخص شده است که هدف اولیه رادیکال‌های آزاد، چربی‌های غشای سلولی است (Sharma and Agarwal, 1996). هیدروپراکسید چربی، تجزیه شده و تشکیل رادیکال‌های آلکوکسی و پراکسی می‌کند (Sharma and Agarwal, 1996). پراکسیداسیون چربی اعمال شده بر غشا، به شدت برای غشای سلول مضر بوده و می‌تواند زمینه‌ساز مرگ سلولی شود (Sharma and Agarwal 1996). بنابراین ممکن است که حرارت با افزایش رادیکال‌های آزاد موجب تخریب غشا سلولی شود و زمینه را برای مرگ سلولی فراهم کند.

نتایج این مطالعه مشخص کرد که ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تغییر معنی‌دار نداشت، در حالیکه غلظت مالون‌دی‌آلدهید افزایش داشت. دیگر مطالعات انجام شده نیز این مساله را تایید می‌نمایند. مشخص شده است که میزان پراکسیداسیون چربی در سلول‌های اسپرم دارای همبستگی منفی با درصد حرکت رو به جلو و درصد سلول‌هایی با ریخت‌شناسی طبیعی است. همچنین این میزان پراکسیداسیون چربی همبستگی مثبت با درصد ناهنجاری‌های اولیه در سلول‌های اسپرم داشت (Kasimanickama *et al*., 2006). مشخص شده است که در معرض قرار دادن سلول‌های اسپرماتوزوای موش با استرس حرارتی بین ۳۴ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش معنی‌دار در مقدار مالون‌دی‌آلدهید می‌شود که بیانگر میزان زیاد رادیکال‌های آزاد تولیدی در محیط است (Alvarez and Storey, 1985). این رادیکال‌های آزاد تولیدی در محیط می‌تواند منشا سیتوپلاسمی، میتوکندریایی و یا غشا سیتوپلاسمی داشته باشد (Shin *et al*., 2008). اثرات مخرب این رادیکال‌های آزاد بر DNA سلولی اثری کاملاً اثبات شده است. همانند چربیها، رادیکال‌های آزاد می‌توانند مولکول DNA را نیز مورد تهاجم قرار دهند و آسیب‌های متعدد به آن وارد نمایند (Sun *et al*., 1997). محل آسیب می‌تواند به طور مستقیم خود بازها و یا اسکلت ملکول DNA باشد. آسیب‌هایی مثل جهش‌های نقطه‌ای، پلی‌مورفیسم، حذف، شکست در تک رشته و یا هر دو رشته DNA از جمله این موارد است (Aitken and Krausz, 2001). افزایش قابل توجه و معنی‌دار که در مطالعه حاضر در مقدار مالون‌دی‌آلدهید در پی افزایش دما رخ داد به خوبی بیانگر افزایش میزان تولید رادیکال‌های آزاد در محیط کشت سلول است و علت عدم وجود افزایش معنی‌دار در قدرت سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌های سرتولی احتمالاً ناشی از افزایش بیش از حد ترکیبات اکسیدان و صدمه آنها به اجزا سازنده سیستم آنتی‌اکسیدانی است.

در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که استرس حرارتی از طریق افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی آثار مخرب خود را بر حیات و عملکرد سلول‌های سرتولی بر جای می‌گذارد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که کلیه هزینه‌های این تحقیق را متقبل شد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

فهرست منابع

Aitken R. J. and Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction, 122: 497-506.

Altman S. A., Randers A. and Govind R. 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. Biotechnology Progress, 9: 671-674.

Alvarez J. G. and Storey B. T. 1985. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa: dependence of rate on temperature and oxygen concentration. Biology of Reproduction, 32: 342-351.

Griswold M.D. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biology of Reproduction, 52: 211-216.

Hees H., Kohler T., Leiser R., Hees I. and Lips T. 1990. Vascular morphology of the bovine testis. Light and scanning electron microscopic studies. Anatomischer Anzeiger, 170: 119-132.

Helmut S. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidant. Experimental Physiology, 82: 291-295.

Hochereau-de Reviers M. T., Locatelli A., Perreau C., Pisselet C. and Setchell B. P. 1993. Effects of a single brief period of moderate heating of the testes on seminiferous tubules in hypophysectomized rams treated with pituitary extract. Journal of Reproduction and Fertility, 97: 381-387.

Iris F., Benzie F. and Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Ivell R. 2007. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. Reproduction Biology and Endocrinology, 5: 15-23.

Izadyar F., Spierenberg G. T., Creemers L. B., den Ouden K. and de Rooij D. G. 2002. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction, 124: 85-94.

Kasimanickam R., Pelzer K. D., Kasimanickam V., Swecker W. S and Thatcher C. D. 2006. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. Theriogenology, 65: 1407-1421.

Lue Y. H., Hikim A. P., Swerdloff R. S., Im P., Taing K. S., Bui T., Leung A. and Wang C. 1999. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intra testicular testosterone on stage specificity. Endocrinology, 140: 1709-1717.

Mieusset R., Quintana Casares P., Sanchez Partida L. G., Sowerbutts S. F., Zupp J. L. and Setchell B. P. 1992. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. Journal of Reproduction and Fertility, 94: 337-343.

Mruk D. D. and Cheng C. Y. 2004. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocrine Reviews, 25: 747-806.

Russell L. D. 1980. Sertoli-germ cell interrelations: a review. Gamete Research, 3: 179-202.

Sharma R. K. and Agarwal A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology, 48: 835-850.

Shin M. H., Moon Y. J., Seo J. E., Lee Y., Kim K. H. and Chung J. H. 2008. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. Free Radical Biology and Medicine, 44: 635-645.

Sun J. G., Jurisicova A. and Casper R. F. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biology of Reproduction, 56: 602-607.

Turner T. T. and Lysiak J. J. 2008. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. Journal of Andrology, 29: 488-498.

Wong C. H. and Cheng C. Y. 2005. The Blood-testis barrier: Its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. Current Topics in Developmental Biology, 71: 263-296.

Yagi K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. Methods in Molecular Biology, 108: 101-106.

Zhu B. K. and Setchell B. P. 2004. Effects of paternal heat stress on the in vivo development of preimplantation embryos in the mouse. Reproduction Nutrition Development, 44: 617-629.

Effect of heat stress on in vitro culture of ram Sertoli cell

F. Salehinejhad[1], A. Lavvaf[2], A. Kadivar[*3], H. Hassanpour[4], H. Nazari[5]

1. M.Sc. Student, Department of Animal Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Research Institute of Animal Embryo Technology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
5. Ph.D Student, Reproductive biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(Received: 10-3-2013- Accepted: 8-9-2013)

Abstract

The present study was conducted to evaluate some oxidative stress in ram Sertoli cells under heat stress condition. The testis of 10 ram lambs was gathered from abattoir (during 5 times) and transferred to laboratory for isolation and culture of Sertoli cells. Isolated cells from lamb testes were divided into 3 plates and maintained in temperatures 32 ºC (control), 39 ºC (mild stress) and 42 ºC (severe stress) for 6 hours. The percentage of cell viability, the amount of lipid peroxidation (TBARS), the antioxidant capacity (FRAP) and superoxide dismutase activity were measured in all groups after 6 hours. The percentage of alive cells were reduced in group 42 ºC (78 ± 6.8) as compared to control (95 ± 9.3; $P<0.05$). Lopud neroxidation was higher in sever stress (0.65 ± 0.06) than control (0.46 ± 0.05; $P<0.05$). In conclusion, heat stress could be a detrimental factor for viability of Sertoli cells via increasing of lipid peroxidation.

Key words: Heat stress, Ram, Sertoli cell

*Corresponding author: kadivar.ali@vet.sku.ac.ir