

Original Article

A Comparison between the Colony Formation of Adult Mouse Spermatogonial Stem Cells in Co cultures with Sertoli and STO (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line)

Syede Momeneh Mohamamadi, M.Sc.¹, Mansoureh Movahedin, Ph.D.^{1*},
Seyed Morteza Koruji, Ph.D.²

1. Anatomical Sciences Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Anatomical Sciences Department, School of Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Anatomical Scienc Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: mansoureh@modares.ac.ir

Received: 28/Jul/2009, Accepted: 2/Jan/2010

Abstract

Objective: The aim of this study was to compare the colony formation of spermatogonial stem cells (SSCs) on sertoli and STO (Mouse embryonic fibroblast cell line) feeder cell layers during a two-week period.

Materials and Methods: Initially, sertoli cells and SSCs were isolated from adult mouse testes using a two-step enzymatic digestion and lectin immobilization. Characteristics of the isolated cells were immunocytochemically confirmed by examining for the presence of Oct-4, CDH1, promyelocytic leukaemia zinc finger factor (PLZF), SSC C-kit, and the distribution of Sertoli cell vimentin. SSCs were then cultured above the Sertoli, STO and the control (without co-culture) separately for two weeks. In all three groups, the number and diameter of colonies were evaluated using an invert microscope on the 3rd, 7th, 10th and 14th day. β_1 and α_6 -integrin m-RNA expressions were assessed using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR. Furthermore, Oct-4 m RNA expression was assessed using real time PCR. Statistical analysis was performed using ANOVA; and the paired two-sample t test and Tukey's test were used as post-hoc tests for the data analysis of the three sertoli, STO and control cocultures.

Results: At the four specified time points, our results showed significant differences ($p < 0.05$) in colony numbers and diameters among the sertoli, STO and control groups. The number and diameter of colonies increased more rapidly in the sertoli coculture than in the other two. Our results at all four time points also showed significant differences ($p < 0.05$) in the mean colony numbers and diameters between the three groups, with the Sertoli coculture having the highest mean values for colony numbers and diameters. The RT-PCR results, after two-weeks of culturing, showed that β_1 -integrin was expressed in all three groups cocultures, but α_6 -integrin was not expressed. Additionally, based on real time PCR results, the three genes (β_1 -integrin, α_6 -integrin, Oct-4) mentioned were also expressed in all three cocultures groups.

Conclusion: Based on the optimal effects of sertoli feeder cells on spermatogonial stem cells in a co culture system, as also confirmed by several other studies, their use is suggested to achieve better colonization of SSCs.

Keywords: Adult Spermatogonial Stem Cells, Colony Formation, Co Culture, Mouse

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 231-240

مقایسه کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و فیبروبلاست موشی (STO)

سیده مومنه محمدی ^۱M.Sc.، منصوره موحدین ^۲Ph.D.، سیدمرتضی کروجی ^۳Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
پست الکترونیک: [Email: mansoure@modares.ac.ir](mailto:mansoure@modares.ac.ir)

دریافت مقاله: ۸۸/۴/۷، پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۱۴

چکیده

* **هدف:** مقایسه میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بین دو روش هم‌کشتی با لایه‌های تغذیه‌کننده سرتولی و سلول‌های رده فیبروبلاست موشی، در طول دو هفته کشت

* **مواد و روش‌ها:** ابتدا سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه موش بالغ با استفاده از دو مرحله هضم آنزیمی جدا شدند. ماهیت سلول‌های سرتولی توسط ویمنتین و سلول‌های اسپرماتوگونی توسط نشان‌گرهای Oct-4، CDH1، Cadherin-1، Promyelocytic Leukemia Zinc-Finger (PLZF) و C-kit تایید شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی لایه‌های تغذیه‌کننده سرتولی و STO (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line) به مدت دو هفته کشت داده شد و یک گروه کنترل بدون هم‌کشتی در نظر گرفته شد. تعداد و قطر کلونی‌ها توسط میکروسکوپ معکوس در روزهای سوم، هفتم، دهم و چهاردهم به‌ازای سه تکرار، اندازه‌گیری شد. همچنین بیان ژن‌های اینتگرین β_1 و اینتگرین α_6 توسط تکنیک‌های Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) و Real Time PCR و ژن Oct-4 توسط Real Time PCR ارزیابی شد. تحلیل آماری در قالب تحلیل واریانس و آزمون‌های تعقیبی t زوجی و توکی برای مقایسه سه گروه سلول‌های سرتولی، STO و کنترل انجام شد.

* **یافته‌ها:** در هر یک از روزهای مورد بررسی، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$) و تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که در هر یک از گروه‌های هم‌کشتی با سلول سرتولی، هم‌کشتی با STO و کنترل، در تعداد و قطر کلونی‌ها، بین چهار نقطه زمانی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$)، اما تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه هم‌کشتی با سلول سرتولی نسبت به دو گروه دیگر افزایش بیشتری داشت ($p < 0.05$). نتایج به‌دست آمده RT-PCR نشان داد که بعد از دو هفته کشت، ژن اینتگرین β_1 در هر سه گروه بیان شد و در حالی که ژن اینتگرین α_6 بیان نشده. همچنین بر اساس نتایج Real Time PCR نیز سه ژن ذکر شده بیان شدند.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به اثر بهینه‌ای که سلول‌های سرتولی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با این سلول‌ها فراهم می‌کند - که این موضوع توسط سایر مطالعات نیز تایید شده است - استفاده از سلول‌های سرتولی برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیشنهاد می‌شود.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ، کلونی‌زایی، هم‌کشتی، موش

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۴۰-۲۳۱

مقدمه

مردانه به دلایل مختلفی از جمله تعداد کم آنها، مشکل است و کاهش قابل توجهی نیز در بقای سلول‌های کشت داده شده طی هفته اول ایجاد می‌شود (۴). طی چند سال اخیر مطالعات زیادی نگهداری و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی را در محیط کشت گزارش کرده‌اند که اکثر آنها در مورد هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با یک لایه تغذیه‌کننده هم‌عقیده بودند (۵، ۶). تا به حال روش‌های مختلفی برای هم‌کشتی ارائه شده است؛ برخی از محققین علاوه بر یک لایه تغذیه‌کننده از فاکتورهای رشد برای حمایت سلول‌های مورد کشت استفاده نموده‌اند (۷). البته باید در نظر داشت در محیط کشتی که فاقد سرم و لایه تغذیه‌کننده باشد، سلول‌های اسپرماتوگونی نمی‌توانند بیش از یک هفته زنده بمانند (۸).

سلول‌های سرتولی، تنها سلول‌های سوماتیک هستند که ارتباط تنگاتنگ و مستقیم با سلول‌های ژرم دارند و فاکتورهایی را ترشح می‌کنند که برای زنده ماندن و تکثیر سلول‌های ژرم ضروری هستند. به عنوان مثال Stem Cell Factor (SCF) (۸)، اکتیوین (Activin)،

اسپرم‌زایی فرایندی است که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells; SSCs) پس از انجام تقسیمات میتوزی و میوزی منظم به اسپرماتوزای بالغ تبدیل می‌شود (۱). در پستانداران، روزانه میلیون‌ها اسپرماتوزا از سلول‌های بنیادی یا اسپرماتوگونی در بیضه تولید می‌شوند (۲). در هر بیضه انسان، 10^8 سلول وجود دارد که از این تعداد، 2×10^4 سلول از نوع سلول‌های بنیادی می‌باشند (۳).

غنی‌سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت امر مهمی است و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی، منبع با ارزشی از سلول‌های ژرم را فراهم می‌آورد که می‌توانند در مواردی مثل انجماد، پیوند سلول‌های ژرم جهت درمان ناباروری، دست‌کاری ژنتیکی، ترانسفکت ژنی سلول‌ها و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه، از اهمیت خاصی برخوردار باشند. در حالت عادی، کشت سلول‌های ژرم بنیادی اسپرماتوگونی

کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ

در این روش تعلیق سلولی به پتری دیش‌های پوشیده از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از لکتین داجورا استرامونوم آگلوتینین در بافر فسفات منتقل و به مدت یک ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂، انکوبه شد. سلول‌های آزاد در تعلیق بعد از انکوباسیون جهت جمع‌آوری شدند. سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش سلول‌های سرتولی بودند (۱۲).

برای جدا کردن سلول‌های اسپرماتوسیت از تعلیق سلولی فوق، از روش ون پلت (Van Pelt)، استفاده شد (۱۳). در این روش تعلیق سلولی پس از جداسازی سلول‌های سرتولی به پتری دیش‌های پوشیده از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از PNA در بافر فسفات منتقل و به مدت یک ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂، انکوبه شد. سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش سلول‌های اسپرماتوسیت بودند. بعد از جدا کردن سلول‌های سرتولی و اسپرماتوسیت، سلول‌های اسپرماتوگونی که در تعلیق شناور بودند به همراه محیط جمع‌آوری شده و پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور (معادل ۲۲۰۰ RPM) شست‌وشو شد.

هم‌کشتی سلول‌های سرتولی، STO و کنترل با سلول‌های اسپرماتوگونی

یک هفته بعد از کشت، سلول‌های سرتولی کف پتری دیش توسط سلول‌ها پر شده و برای هم‌کشتی با سلول‌های اسپرماتوگونی و به عنوان لایه تغذیه‌کننده مناسب شدند. تعلیق سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی روی این لایه تغذیه‌کننده در حضور محیط DMEM دارای ۱۰ درصد سرم در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته کشت شدند. از مرکز تحقیقاتی پاستور، رده (Line) سلول‌های STO تهیه و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. زمانی که Confluency آنها به حد قابل قبول رسید، به عنوان لایه تغذیه‌کننده مورد استفاده قرار گرفتند. پس از شکل‌گیری لایه‌ی تغذیه‌کننده سلول‌های STO، به مدت ۲ تا ۳ ساعت در حضور DMEM حاوی Mytomyocin C (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند تا سلول‌های STO غیرفعال شوند. سپس سلول‌ها چند بار با PBS شست‌وشو داده شدند. پس از غیرفعال شدن سلول‌های STO با Mytomyocin C تعلیق سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی روی این لایه تغذیه‌کننده در حضور محیط DMEM دارای ۱۰ درصد سرم در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته کشت داده شدند. تعلیق حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم و بدون هیچ لایه تغذیه‌کننده، به عنوان گروه کنترل کشت داده شدند. برای هر یک از گروه‌ها و مقاطع زمانی مورد بررسی آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد.

ارزیابی کلونی‌زایی در سلول‌های اسپرماتوگونی

کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در طول دو هفته کشت و در هر سه گروه مورد مطالعه، در روزهای ۳، ۷، ۱۰ و ۱۴ از نظر تعداد و قطر کلونی‌ها با میکروسکوپ معکوس (Zeiss, Germany, Invert-Phase Microscope) مجهز به عدسی چشمی مدرج ارزیابی شدند.

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی با آزمون‌های ایمنو‌هیستوشیمی

ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی با تعیین نشانگر اختصاصی ویمنتین (Vimentin) برای سلول‌های سرتولی و نشانگر

فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (Insulin Like Growth Factor-1)، فاکتور رشد تبدیل‌کننده Beta، فاکتور رشد تبدیل‌کننده Alpha (۹) و Lukemia Inhibitory Factor (LIF) از جمله فاکتورهایی هستند که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شوند. بنابراین برای نگهداری و کشت سلول‌های ژرم در محیط کشت به صورت دراز مدت، وجود سلول‌های سرتولی ضروری به نظر می‌رسد (۱۰). با توجه به مطالعات مختلف مبنی بر سودمند بودن لایه‌ی تغذیه‌کننده در کشت سلول‌های ژرم، هدف از انجام این پروژه، مقایسه میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و سلول‌های رده فیبروبلاست موشی (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line; STO) است.

مواد و روش‌ها حیوانات آزمایشگاهی

در پژوهش حاضر از موش‌های بالغ ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. موش‌های بالغ (نژاد NMRI) از موسسه رازی کرج خریداری و در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نگهداری شدند. این پژوهش بر اساس مصوبه اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

برای هر بار جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی جهت کشت، بیضه‌های ۶ سر موش خارج شدند. کپسول بیضه‌ها بعد از شست‌وشو با Phosphate Buffer Serum (PBS) جدا گردید و سپس به محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی آنزیم (۵/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز-دیسپاز، ۵/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپسین ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دناز) جهت هضم آنزیمی مرحله اول منتقل گردیدند. در این مرحله، بیضه‌های بدون کپسول در محیط کشت حاوی آنزیم‌های هضم آنزیمی به طور مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در طی این مدت، هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی توسط سمپلر و به مدت ۱ دقیقه تکان داده می‌شدند. پس از طی این مرحله، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز، چند بار (تا زمانی که محیط روی رسوب قطعات بیضه‌ها شفاف شود) و هر بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور (معادل ۱۲۰۰ RPM) سانتریفیوژ شدند (۴-۳ بار). بعد از هر بار سانتریفیوژ محیط بالای رسوب ته لوله با محیط DMEM تازه جایگزین شد. این کار باعث حذف بافت بینابینی، اسپرم‌ها و اسپرماتیدها از قطعات بیضه شد و قطعات لوله‌های منی‌ساز که حاصل اولین مرحله از هضم آنزیمی بودند، وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شدند (۱۱). در این مرحله، لوله‌ها در محیطی مشابه مرحله اول به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس تعلیق فوق جهت جداسازی قطعات هضم نشده با سرعت ۳۰ دور (معادل ۴۰۰ RPM) سانتریفیوژ شد. قطعات هضم نشده لوله‌های منی‌ساز در ته لوله رسوب کرده و سلول‌های جدا شده و برخی از تجمعات سلولی، در بالای تعلیق قرار گرفتند. به طور عمده تعلیق حاصل حاوی سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی اسپرماتوسیت و اسپرماتید و تعداد کمی سلول‌های بافت بینابینی بود.

از روش اسکارپینو (Scarpino)، برای جدا کردن سلول‌های سرتولی از تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌های $\alpha 6$ Integrin، $\beta 1$ Integrin و OCT-4 به روش Real-Time PCR

برای تعیین میزان بیان ژن‌های $\alpha 6$ Integrin، $\beta 1$ Integrin و OCT-4 در گروه‌های مورد مطالعه از تکنیک Real Time RT-PCR استفاده شد. همه مراحل Real Time PCR مانند RT-PCR است، با این تفاوت که در مرحله PCR از SYBR Green هم استفاده می‌شود. برای هر گروه ژن رفرنس GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) و ژن هدف یکسانی در نظر گرفته شد. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $2^{-CT\Delta\Delta}$ محاسبه گردید.

مقایسه میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها در روزها و گروه‌های مختلف به ترتیب، تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری، تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون‌های زوجی و با تعدیل بونفرونی و توکی، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. همچنین بر اساس یک مطالعه مقدماتی با سه تکرار روی قطر و تعداد کلونی‌ها، اطلاعات اولیه شامل انحراف معیار ادغام شده سه گروه و اختلاف میانگین بین گروه‌ها به دست آمد، سپس با در نظر گرفتن سطح خطای ۰/۰۵ و مقدار اسمی ۰/۸ برای توان آزمون، حجم نمونه به ازای هر یک از دو کمیت با استفاده از نرم‌افزار Minitab 15 برابر ۳ به دست آمد که در این حالت توان واقعی آزمون‌ها به تقریب برابر ۰/۹ شد (۱۴).

یافته‌ها

جداسازی و تایید ماهیت سلول‌های اسپرمانوگونی و سرتولی
سلول‌های بنیادی اسپرمانوگونی در گروه‌های مختلف ایجاد کلونی نمودند که این سلول‌ها به نسبت گرد و حدود سلولی آنها در، کلونی قابل تشخیص بود (شکل ۲A). شکل‌های B و 1A مربوط به سلول‌های سرتولی و STO می‌باشند که کف پتری دیش را به طور کامل پر نموده بودند. نشانگر اختصاصی ویمنتین در سیتوپلاسم اطراف هسته سلول‌های سرتولی بیان تثبیت شد (شکل 1C). نتایج حاصل از بررسی شناسایی سلول‌های اسپرمانوگونی جداسازی شده، توسط نشان‌گرهای اختصاصی OCT-4، C-Kit، PLZF و CDH1، نشان داد که نشان‌گرهای OCT-4، PLZF و CDH1 به طور بارز و مشخص و C-kit به صورت ضعیف در سلول‌های اسپرمانوگونی بیان شد (شکل‌های ۲ و ۳). همچنین از بیضه موش بالغ جهت بررسی نشان‌گرهای مورد نظر به عنوان کنترل استفاده شد.

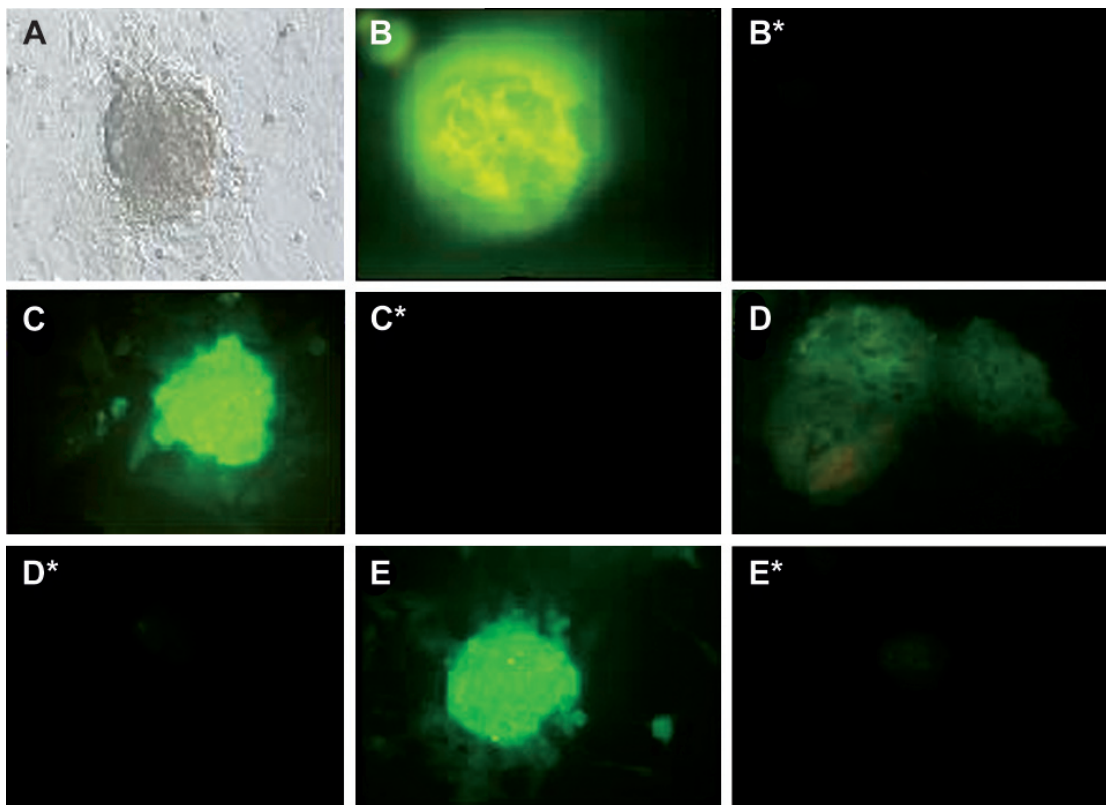
اختصاصی Oct-4، C-Kit، PLZF و CDH1 برای سلول‌های اسپرمانوگونی انجام شد. برای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ویمنتین سلول‌های سرتولی، ابتدا سلول‌ها دو بار به مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات شست‌وشو شدند و جهت ثبوت به مدت ۲۰ دقیقه در پارافمالدئید ۴ درصد قرار گرفتند. برای تسهیل نفوذ آنتی‌بادی به داخل سلول از تریتون ۱۰۰×۲ (درصد) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. مهار آنتی‌بادی‌های برونزاد (Extraneous) نیز به وسیله سرم بز (Goat serum) (Burlingame, CA) ۱۰ درصد به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض آنتی‌ویمنتین موشی (Mouse Monoclonal Anti-Vimentin Antibody) (Sigma, USA) رقیق شده با غلظت ۱/۲۰۰ قرار گرفتند. بعد از این مرحله شست‌وشو با بافر فسفات (هر بار به مدت ۵ دقیقه)، روی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه (Goat FITC-conjugated Anti mouse IgM) (Sigma, USA) با غلظت ۱/۱۰۰ در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد. پس از شست‌وشو با بافر فسفات (هر بار به مدت ۵ دقیقه)، نمونه‌ها با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. نشانگرهای اختصاصی Oct-4، C-Kit، PLZF و CDH1 در سلول‌های اسپرمانوگونی کلونی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که پس از مراحل ثبوت تسهیل نفوذپذیری آنتی‌بادی و مهار آنتی‌بادی‌های برونزاد به نمونه‌ها، آنتی‌بادی‌های اولیه Mouse anti-Oct-4، Mouse Anti-c-kit، Mouse Anti-PLZF و Mouse Anti-CDH1 با غلظت ۱/۱۰۰ اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از این مرحله و شست‌وشو با بافر فسفات روی نمونه‌ها به مدت دو ساعت با آنتی‌بادی ثانویه با غلظت ۱/۱۰۰ برای دو نشانگر Oct-4 و C-kit و ۱/۲۰۰ برای دو نشانگر PLZF و CDH1 در تاریکی و در دمای اتاق پوشیده شد. پس از شست‌وشو با بافر فسفات، نمونه‌ها با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. در کنار نمونه‌های آزمون، یک نمونه کنترل نیز رنگ آمیزی شد با این تفاوت که مرحله آنتی‌بادی اولیه از فرایند رنگ آمیزی حذف شد.

بررسی بیان ژن‌های اینتگرین $\beta 1$ و $\alpha 6$ به روش RT-PCR نیمه کمی

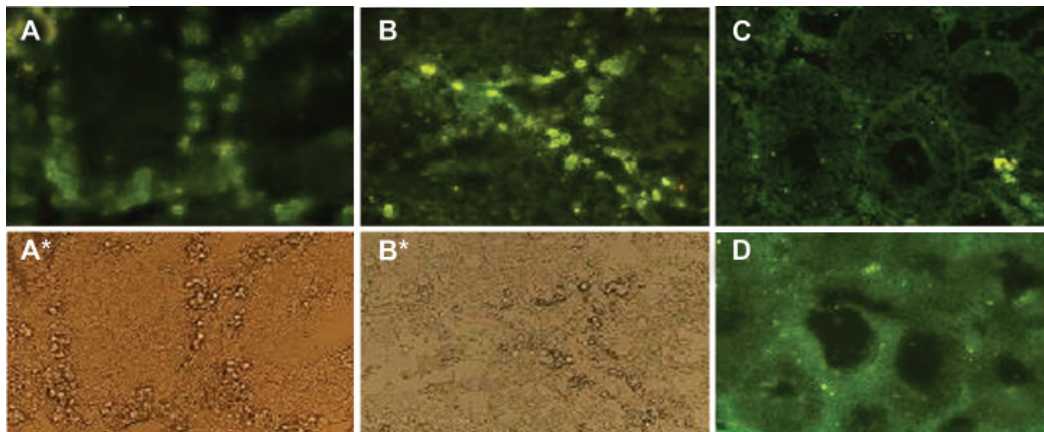
برای بررسی بیان ژن‌های $\alpha 6$ Integrin، $\beta 1$ Integrin از RT-PCR استفاده شد. در این تحقیق از ژن Actin-Beta به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. پس از پایان واکنش PCR، حدود ۶ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.



شکل ۱: لایه تغذیه کننده سلول‌های سرتولی (A و B) (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×) و بیان سیتواسکتون ویمنتین در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰×) (C).



شکل ۲: مورفولوژی یک کلونی به دست آمده از هم‌کشتی سلول‌های ژرم و سلول‌های سرتولی (A). سلول‌های کلونی نشان‌گرهای PLZF (B)، Oct 4 (C)، CDH1 (E) را بیان نمودند. ولی بیان نشان‌گر C-kit (D) در آنها ضعیف بود (بزرگ‌نمایی A: $\times 100$ ، B, D, E: $\times 200$ و C: $\times 400$). شکل‌های که با «*» نشان داده شده‌اند، شکل‌های کنترل منفی هستند (بزرگ‌نمایی همه شکل‌ها کنترل منفی $\times 200$ است).



شکل ۳: بررسی نشان‌گرهای CDH1 (A) و PLZF (B) در بیضه موش بالغ به عنوان گروه کنترل (بزرگ‌نمایی A و B: $\times 400$). شکل‌های C و D به ترتیب شکل‌های کنترل منفی نشان‌گرهای CDH1 و PLZF هستند (بزرگ‌نمایی C و D: $\times 200$).

ارزیابی نتایج حاصل از کشت مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها به‌ازای هر گروه شامل ۳ تکرار در جدول ۱ ارائه شده است. در روز سوم پس از کشت، بین میانگین تعداد کلونی‌ها در سه گروه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p = 0/630 > 0/05$) و $p = 0/038 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) ولی در روزهای هفتم ($p = 0/038 < 0/05$) و $p = 0/000 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) = ۵/۹۲، دهم ($p = 0/000 < 0/05$) و چهاردهم ($p = 0/001 > 0/05$) میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه کنترل و STO بیشتر بود. اگرچه میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه STO نسبت به گروه کنترل تا اندازه‌ای کمتر بود ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

ارزیابی نتایج حاصل از کشت مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها به‌ازای هر گروه شامل ۳ تکرار در جدول ۱ ارائه شده است. در روز سوم پس از کشت، بین میانگین تعداد کلونی‌ها در سه گروه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p = 0/630 > 0/05$) و $p = 0/038 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) ولی در روزهای هفتم ($p = 0/038 < 0/05$) و $p = 0/000 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) = ۵/۹۲، دهم ($p = 0/000 < 0/05$) و چهاردهم ($p = 0/001 > 0/05$) میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه کنترل و STO بیشتر بود. اگرچه میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه STO نسبت به گروه کنترل تا اندازه‌ای کمتر بود ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

جدول ۱: مقایسه تعداد کلونی‌ها در گروه‌های مختلف به تفکیک روزها (به‌ازای 2×10^6 تعداد سلول اولیه)

روز سوم	روز هفتم	روز دهم	روز چهاردهم
کنترل	$1/33 \pm 0/58$	$3/00 \pm 1/00$	$1/53 \pm 5/67$
سرتولی	$7/00 \pm 4/36^a$	$3/00 \pm 18/00^a$	$7/94 \pm 26/00^a$
STO	$0/33 \pm 0/58^b$	$0/58 \pm 1/33^b$	$0/58 \pm 1/67^b$
P-value	$p(ک-س) = 0/035$	$p(س-اس) < 0/0001$	$p(ک-س) = 0/002$
	$p(س-اس) = 0/019$	$p(ک-س) < 0/0001$	$p(س-اس) = 0/001$

* (انحراف معیار \pm میانگین) مربوط به تعداد کلونی‌ها گزارش شده است.

آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شده است.

a: در مقایسه با گروه کنترل در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

b: در مقایسه با گروه سرتولی در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

c: مقدار P-value مربوط به مقایسه‌های معنی‌دار دو گروه با حروف مخفف مورد نظر؛ ک: گروه کنترل، س: گروه سرتولی، اس: گروه STO

جدول ۲: مقایسه قطر (میکرومتر) کلونی‌ها در گروه‌های مختلف به تفکیک روزها

روز سوم	روز هفتم	روز دهم	روز چهاردهم
کنترل	$0/23 \pm 0/13^0$	$0/40 \pm 0/13$	$0/77 \pm 0/11$
سرتولی	$0/32 \pm 0/18$	$0/21 \pm 1/17^a$	$1/74 \pm 0/2^a$
STO	$0/00 \pm 0/00$	$0/17 \pm 0/29^b$	$1/28 \pm 0/33^{ab}$
P-value	$p(ک-س)^c = 0/005$	$p(ک-س) = 0/005$	$p(ک-س) = 0/001$
	$p(س-اس) = 0/001$	$p(ک-اس) = 0/042$	$p(س-اس) = 0/010$
		$p(س-اس) = 0/047$	$p(س-اس) = 0/049$

* (انحراف معیار \pm میانگین) مربوط به تعداد کلونی‌ها گزارش شده است.

آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شده است.

a: در مقایسه با گروه کنترل در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

b: در مقایسه با گروه سرتولی در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

c: مقدار P-value مربوط به مقایسه‌های معنی‌دار دو گروه با حروف مخفف مورد نظر؛ ک: گروه کنترل، س: گروه سرتولی، اس: گروه STO

این روند افزایش در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر شیب قابل ملاحظه‌ای داشت و در روز چهاردهم به بیشترین مقدار ($7/20 \pm 1/74$) خود رسید. این افزایش در گروه STO به این ترتیب بود که در روز هفتم میانگین قطر کلونی‌ها از گروه کنترل کوچکتر بود ولی در روزهای دهم و چهاردهم با یک افزایش قابل ملاحظه، میانگین آن از گروه کنترل بزرگتر شد ($p < 0/05$).

نتایج حاصل از RT-PCR

بیان ژن‌های Alpha6 integrin و Beta1 Integrin با استفاده از تکنیک RT-PCR در گروه‌های هم‌کشتی و گروه کنترل بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ژن Beta1 Integrin در هر سه گروه بیان شد ولی ژن Alpha6 Integrin در آنها بیان نشد. بیان ژن‌های Alpha6 Integrin، Beta1 Integrin در بیضه موش بالغ به عنوان گروه کنترل بررسی و هر دو ژن مزبور در آن بیان شد (شکل‌های B و ۴A).

ارائه نتایج حاصل از Real Time PCR

مقایسه بیان ژن‌های مختلف در گروه‌های کنترل، سرتولی و STO

تغییرات زمانی میانگین تعداد کلونی‌ها در هر سه گروه کنترل ($p = 0/000 < 0/05$)، سرتولی ($F_{(3,18)} = 53/36$)، $p = 0/001 < 0/05$ و STO ($F_{(3,18)} = 27/88$)، $p = 0/004 < 0/05$ و $F_{(3,18)} = 13/60$) یک روند افزایشی معنی‌دار را نشان داد؛ به‌طوری که در روزهای دهم و چهاردهم، میانگین تعداد کلونی‌ها نسبت به روزهای سوم و هفتم بیشتر بود ولی این روند افزایش در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر، شیب قابل ملاحظه‌ای داشت و در روز چهاردهم به بیشترین مقدار ($26/00 \pm 7/94$) خود رسید. نتایج مقایسه میانگین قطر کلونی‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

در روز سوم، بین میانگین قطر کلونی‌ها در سه گروه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$). ولی در روزهای هفتم، دهم و چهاردهم، میانگین قطر کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه کنترل و STO بیشتر بود ($p < 0/05$). اگرچه میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه STO نسبت به گروه کنترل تا اندازه‌ای کمتر بود ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). تغییرات زمانی میانگین قطر کلونی‌ها در هر سه گروه، یک روند افزایشی معنی‌دار را نشان داد ($p < 0/05$)؛ به‌طوری که در روزهای دهم و چهاردهم، میانگین قطر کلونی‌ها نسبت به روزهای سوم و هفتم بیشتر بود ولی

شده است. ون پلت و همکاران برای افزایش خلوص سلول‌های اسپرماتوگونی و جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی A از رت بالغ، از نقص ویتامین A استفاده کردند (۱۳). شینوهارا و همکاران، ذره‌های مغناطیسی و آنتی‌بادی‌هایی را علیه نشان‌گرهای Beta1 Integrin و Alpha6 Integrin، برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی به کار بردند (۱۵).

در این پژوهش، از سلول‌های بیضه موش‌های بالغ ۶-۸ هفته‌ای استفاده شد. جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی A تمایز نیافته، از موش بالغ مشکل است، زیرا بیضه موش بالغ حاوی انواع مختلفی از سلول‌های ژرم می‌باشد. برای به دست آوردن یک بازده بالا از اسپرماتوگونی A تمایز نیافته، بهتر است سایر سلول‌های ژرم حذف شوند (۱۶). برای جداسازی سلول‌های بیضه از روش هضم آنزیمی استفاده شد. کروجی و همکاران برای جداسازی و کشت سلول‌های موش بالغ از این روش استفاده کردند (۱۷).

در سیستم کشت مطالعه حاضر، سلول‌های با حاشیه نامنظم و ظاهر گرانولار، سلول‌های سرتولی بودند که ایجاد تک لایه کرده و به عنوان لایه تغذیه کننده برای هم‌کشتی با سلول‌های اسپرماتوگونی استفاده شدند. برای تایید ماهیت این سلول‌ها نشان‌گر اختصاصی ویمنتین به کار رفت. پروتئین سایتواسکتون ویمنتین در سیتوپلاسم اطراف هسته سلول‌های سرتولی بیان شد. یافته‌های این بررسی با نتایج پژوهش‌های انجام شده در این زمینه مطابقت دارد (۱۱، ۱۸، ۱۹ و ۲۰). ویمنتین یک پروتئین سایتواسکتون است که در سلول‌های اسپرماتوگونی یافت شده و این نشان‌گر از روز چهاردهم به بعد در سلول‌های سرتولی و در اطراف هسته آنها بیان می‌شود (۱۲).

برای حصول اطمینان از ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده، از نشان‌گرهای اختصاصی CDH1، c-kit، Oct-4 و PLZF استفاده شد. نشان‌گر Oct-4 در کلونی‌های تشکیل شده، بیان شد. بنابراین با توجه به اینکه Oct-4 نشان‌گر خاص سلول‌های بنیادی است، کلونی‌های تشکیل شده نیز ماهیت سلول‌های بنیادی را دارند. مطالعات دیگر در این زمینه نشان دادند که سلول‌های اسپرماتوگونی نشان‌گر Oct-4 را بیان می‌کنند (۱۱، ۲۴-۲۰).

در کلونی‌های مطالعه حاضر، بیان شدن نشان‌گر CDH1 نشان دهنده این موضوع است که کلونی‌های مزبور حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A بودند. ماسوتاکا توکودا و همکاران، نیز در مطالعه خود نشان دادند که نشان‌گر CDH1 در سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A موش بیان می‌شود. آنها به این نتیجه رسیدند که سلول‌هایی که نشان‌گر CDH1 را بیان نمودند، نشان‌گر PLZF را نیز بیان کردند (۲۵).

نشان‌گر PLZF برای خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی ضروری است. این نشان‌گر در سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته ضروری است. این نشان‌گر در سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته ضروری است. این نشان‌گر در سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته ضروری است. این نشان‌گر در سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته ضروری است.

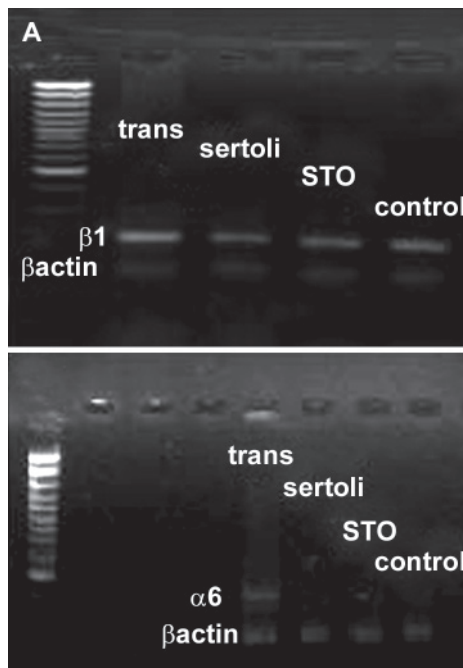
نشان‌گر C-kit، یکی از اعضای خانواده گیرنده تیروزین کیناز است که در Aal Late و اسپرماتوگونی‌های تمایز یافته بیان می‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر نیز این نشان‌گر به صورت ضعیف در بعضی از کلونی‌ها و در حاشیه آنها بیان شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های موجود در حاشیه این کلونی‌ها، به

پس از اصلاح آنها نسبت به ژن مرجع در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: مقایسه بیان ژنی ژن‌های Alpha6 Integrin، Beta1 Integrin و OCT-4 در گروه‌های مختلف بر اساس Real Time-PCR

Oct-4	Beta1 integrin	Alpha6 integrin	
0/038 ± 0/021	7/43 ± 2/47	0/04 ± 0/00 ^a	کنترل
0/058 ± 0/069	0/57 ± 0/72	0/02 ± 0/003	سرتولی
0/018 ± 0/022	13/37 ± 21/16	0/02 ± 0/002	STO

* (انحراف معیار ± میانگین) مربوط به بیان ژنی ژن‌ها پس از اصلاح آنها نسبت به ژن مرجع گزارش شده است. آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شده است.



شکل ۴: ژل بیان ژن Beta1 Integrin (A) و Alpha6 Integrin (B) برای انجام RT-PCR

برای ژن‌های Beta1 Integrin، Alpha6 Integrin و Oct-4 بین هیچ یک از گروه‌های کنترل، سرتولی و STO اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p > 0/05). به عبارت دیگر، میانگین بیان ژنی پس از اصلاح آن نسبت به ژن مرجع در گروه‌های کنترل، سرتولی و STO به تقریب یکسان بود.

بحث

در این مطالعه، جهت ایجاد محیط کشت بهینه، سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه موش بالغ با سلول‌های سرتولی و STO هم‌کشتی داده شدند. سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت، کلونی‌زایی کردند. سپس بعد از دو هفته کشت، بیان ژن‌های Oct-4، Beta1 Integrin و Alpha6 Integrin در کلونی‌ها بررسی شد.

تاکنون روش‌های مختلفی برای جداسازی و غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی A در محیط کشت ارایه شده است که به دلیل عدم وجود نشان‌گرهای اختصاصی این سلول‌ها همچنان ناخالصی دیده

سمت تمایز رفتند. بعضی از مطالعات نیز به نتیجه‌ی مشابهی دست یافته بودند (۱۷، ۱۸).

در ارزیابی تاثیر سیستم هم‌کشتی سرتولی و STO بر تشکیل کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ در محیط آزمایشگاه، این نتیجه حاصل شد که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی نسبت به هم‌کشتی با سلول‌های STO باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد و قطر کلونی‌ها شده است. به عبارت دیگر یافته‌های این مطالعه، روند تغییرات میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها را رو به افزایش نشان داد و این افزایش در گروه‌های کنترل و STO به صورت غیر قابل ملاحظه و در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر برجسته و معنی‌دار بود. همچنین این افزایش به صورت یکنواخت در تمام مدت هم‌کشتی ادامه یافت. نتایج مطالعات مشابه انجام شده در این زمینه نیز یافته‌های مطالعه‌ی حاضر را تایید می‌کند (۱۱، ۱۸، ۲۸-۳۱).

کروچی در مطالعه خود (با هدف بررسی سیستم‌های هم‌کشتی برای غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ)، به این نتیجه دست یافت که بعضی از سیستم‌های هم‌کشتی (یعنی هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و فاکتورهای رشد) در نیل به هدف مطالعه به شکل قابل توجهی موثر بودند، به طوری که بعضی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این سیستم‌های کشت با انجام تقسیمات زیاد توانستند کلونی ایجاد کنند و تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان افزایش یافت که نشان‌دهنده تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است (۱۱). سلول‌های سرتولی با ترشح فاکتورهایی از بقاء، تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی حمایت می‌کنند. یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود، Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) است. این فاکتور، یک محرک قوی برای تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی است (۳۲). در جوندگان، خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی به شدت تحت تاثیر GDNF است (۳۳).

بنابراین همان‌طور که در یافته‌های مطالعه حاضر و همچنین در یافته‌های مطالعات ذکر شده ملاحظه شد، سیستم هم‌کشتی سرتولی توانست تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را حمایت نماید.

یکی از فاکتورهای مهمی که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود، GDNF است. این فاکتور نقش مهمی در خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی دارد. ناگانو و همکاران با افزودن GDNF به محیط کشت، مشاهده نمودند که میزان زنده ماندن و تکثیر آنها در محیط افزایش می‌یابد (۶). کروچی و همکاران نیز به این نتیجه دست یافتند (۱۷، ۳۴). این فاکتور از طریق تنظیم بیان ژن‌های *etv5* و *bcl6b*، خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

بنابراین سلول‌های سرتولی با ترشح GDNF، از خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی حمایت می‌کنند. به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر یکی از دلایل حمایت سلول‌های سرتولی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این مدت زمان کوتاه (دو هفته کشت)، ترشح GDNF باشد.

فرآوردی دیگر سلول سرتولی، فاکتور رونویسی ERM است و به طور منحصر در سلول‌های سرتولی بالغ بیان می‌شود. نتایج مطالعه دادونه، نشان داده است که فاکتور ERM برای خودنوزایی و تدوام

اسپرم‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش بالغ ضروری است (۳۵).

نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات ناگانو و همکاران و هاستورپ و همکاران، هم‌خوانی ندارد. آنها نشان دادند که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی، تعداد و قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی را افزایش نمی‌دهد (۶، ۳۶).

در هم‌کشتی سلول‌های STO با سلول‌های اسپرماتوگونی، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که STO میزان زنده ماندن سلول‌های اسپرماتوگونی را افزایش می‌دهد ولی حمایت آنها از کلونی‌زایی (تکثیر) سلول‌های اسپرماتوگونی قابل ملاحظه نبود. این موضوع با یافته‌های ناگانو و همکاران، هم‌خوانی دارد (۵). در مطالعه حاضر وجود سلول‌های گرد زنده بر روی سلول‌های STO مشاهده شد که شاید مدت دو هفته کشت، زمان کافی برای تکثیر آنها نبوده برای بررسی بیان ژن‌های *Beta1* و *Alpha6 Integrin* از تکنیک RT-PCR استفاده شد. ژن *Beta1 integrin* در هر یک از گروه‌های کنترل، سرتولی و STO بیان شد ولی ژن *Alpha6 Integrin* در گروه‌های مزبور بیان نشد. از آنجا که ژن *Alpha6 Integrin* یکی از ژن‌هایی است که در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود و توسط تکنیک RT-PCR معمولی در گروه‌های مورد مطالعه بیان نشد، بنابراین جهت بررسی بیان ژنی این ژن به همراه ژن‌های *Beta1 Integrin* و *Oct-4*، تکنیک قوی‌تر *Real Time PCR* به کار رفت.

ژن‌های *Beta1 Integrin* و *Alpha6 Integrin* از نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند (۳۷). برخی از مطالعات در این زمینه نشان دادند که نشان‌گر *Oct-4* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود (۲۱، ۳۸).

در حالت کلی، برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی بین گروه‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. ولی هر سه ژن که از نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند، در کلونی‌های حاصل از کشت در هر سه گروه بیان شد که نشان می‌دهد کلونی‌ها حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند و اختلاف معنی‌داری در بیان ژن‌ها مشاهده نشد. به نظر می‌رسد، سیستم هم‌کشتی توانسته در بیان این ژن‌ها از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حمایت لازم را بنماید.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر بهینه‌ای که سلول‌های سرتولی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با این سلول‌ها فراهم می‌کنند - که این موضوع توسط سایر مطالعات نیز تایید شده است - استفاده از سلول‌های سرتولی برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیشنهاد می‌شود. همچنین در مطالعات آتی می‌توان پس از پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هم‌کشت شده با لایه تغذیه کننده به بیضه موش نابارور، تاثیر لایه‌های تغذیه کننده را بررسی کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله در راستای پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح و از محل بودجه پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و تنظیم شده است.

References

- de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*. 1998; 79(2): 67-80.
- Meistrich ML, Van Beek MEAB. In: Cell and molecular biology of testis, eds. Desjardins C. and Ewing L.L. Oxford University Press, New York. 1993; 266-295.
- Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(25): 9524-9529.
- Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl*. 1996; 17(6): 708-717.
- Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue cell*. 1998; 30(4): 389-397.
- Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in-vitro. *Biol Reprod*. 2003; 68(6): 2207-14.
- Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, et al. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(3): 229-259.
- Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effect of stem cell factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol Reprod*. 1999; 61(1): 225-230.
- Kojima Y, Kominami K, Dohmae K, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, et al. Cessation of spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (jsd/jsd) mice. *Int J Urol*. 1997; 4(5): 500-507.
- Hofmann MC, Van Der Wee KS, Dargart JL, Dirami G, Dettin L, Dym M. Establishment and characterization of neonatal mouse sertoli cell lines. *J Androl*. 2003; 24(1): 120-130.
- Koruji M. Autograft of fresh and freezed spermatogonial cells of adult mouse after coculture with sertoli cells and treatment with GDNF, SCF and GM-CSF cytokines to the azoospermic mice with Gamma-Ray. Presented for the Ph.D., Tehran. Tarbiat Modares University. 2007.
- Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Fröysa B, Söder O, Boitani C. A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 146(1-2): 121-127.
- Van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol Reprod*. 1996; 55(2): 439-444.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 5th ed. New York: Pearson Press; 1998; 235-260.
- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(10): 5504-5509.
- Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc*. 2009; 4(2): 143-154.
- Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. In: *Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009; 45(5-6): 281-289.
- Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod*. 2003; 68(1): 272-281.
- Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function. *Biol Reprod*. 2003; 68(3): 996-1002.
- Absalan F, Movahedin M, Mowla SJ. Combination of in vivo cryptorchid testis and In vitro co-culture system to obtain high purification and proliferation of mouse spermatogonial stem cells. *Int J Fertil & Steril*. 2008; 2(3): 115-120.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*. 1998; 71(1-2): 89-98.
- Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl*. 2003; 24(5): 661-669.
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn*. 1997; 208(1): 125-136.
- Oke BO, Suarez-Quian CA. Localization of secretory, membrane-associated and cytoskeletal proteins in rat testis using an improved immunocytochemical protocol that employs polyester wax. *Biol Reprod*. 1993; 48(3): 621-631.
- Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod*. 2007; 76(1): 130-141.
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 2004; 36(6): 653-659.
- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2004; 36(6): 647-652.
- Aponte PM, Van Braget MP, de Rooij DG, Van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*. 2005; 113(11-12): 727-742.
- Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla S. Graft efficiency of co-cultured spermatogonial stem cells using sperm assay in epididymal lumen of recipient mice. *Yakhteh*. 2006; 7(4): 242-249.
- Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*. 1993; 290(2): 193-200.
- Zhang DY, He DW, Wei GH, Song XF, Li XL, In T. Long-term coculture of spermatogonial stem cells on sertoli cells feeder layer in vitro. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2008; 39(1): 6-9.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol*. 2005; 279(1): 114-124.
- Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonia

- nial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24: 263-286.
34. Koruji SM, Movahedin M, Mowla SJ, Gorabi H, Arfaei Aaj. The effect of inducer factors on adult mouse spermatogonial cells colony formation in vitro. *Yakhteh Med J.* 2007; 9(2): 141-150.
35. Dadune JP. New insights into male gametogenesis what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobial.* 2007; 45(3): 141-147.
36. Hasthorpe S, Barbic S, Farmer PJ, Hutson JM. Growth factor and somatic cell regulation of mouse gonocyte-derived colony formation in vitro. *J Reprod Fertil.* 2000; 119(1): 85-91.
37. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(10): 5504-5509.
38. He Z, Jiang J, Hofmann MC, Dym M. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod.* 2007; 77(4): 723-733.
-