Original Article

The Effects of Inducer Factors on Adult Mouse Spermatogonial Cells Colony Formation *In Vitro*

S.M. Koruji, Ph.D.[1], M. Movahedin, Ph.D.[1]*, S.J. Mowla, Ph.D.[2], H. Gorabi, Ph.D.[3]
A. Jabari Arfaei, M.Sc.[4]

1. Anatomical Sciences Department, School of Medicine, Tarbiat Modares University
2. Genetic Department, School of Basic Sciences, Tarbiat Modares University
3. Genetic Department, Royan Institute
4. Radiation Oncology Department, Shohada-E- Tajrish Hospital

*Corresponding Address: P.O.Box: 14115-175, Anatomical Sciences Department, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: mansoure@modares.ac.ir

Abstract

Received: 30/Apr/2007, Accepted: 21/Jul/2007

Objective: The spermatogonial stem cells (SSCs) form the basis of spermatogenesis. In vitro culture of germ cells is useful for the purification and increasing of SSCs for transplantation. In the present study, we examined: in vitro the effects of co-culture with sertoli cells, GDNF, SCF and GM-CSF on efficiency of spermatogonial cells colony formation and spermatogenesis induction in the recipient testes after transplantation with SSCs in the colonies.

Materials and Methods: Both Sertoli and spermatogonial cells were isolated from adult mouse testes by enzymatic digestion. The identity of the cells was confirmed through analysis of alkaline phosphatase activity, immunocytochemistry against oct-4 and vimentin; and also transplantation of the cells. Isolated spermatogonial cells were treated either with various concentrations of GDNF (1, 40,100 ng/ml), SCF (1, 40,100 ng/ml) and GM-CSF (0.1, 0.1,1 ng/ml) or with co-culture with Sertoli cells during three weeks. Colony assay was done using a light microscopy. For transplantation, spermatogonial cells of the colonies were transplanted into the seminiferous tubules mouse which were irradiated with 14Gy at 10 weeks of age, via rete testis. The statistical significance between mean values was determined using repeated ANOVA test. $p<0.05$ was considered to be significant.

Results: Results indicated that GDNF is the best factor for in vitro colonization of adult mice spermatogonial cells compared with the other cytokines and growth factors. Co-culture system with Sertoli cells was chosen as colonizer. Because co culture showed a significant increase in number (25.1±5.2) and diameter (205.8±50.1µm) of colonies compared with growth factors in both treated and control groups. Spermatogonial stem cells in the colonies may induce spermatogenesis in the recipient testes after transplantation.

Conclusion: Co-culture system with Sertoli cells increases adult spermatogonial cell colony formation in vitro.

Keywords: Spermatogonia, Sertoli Cell, Co-Culture System, Cytokine, Colonization

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages: 141-150

تاثیر فاکتورهای القایی بر توان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ در محیط کشت

سیدمرتضی کروجی Ph.D.[1]، منصوره موحدین Ph.D.[1]*، سیدجواد مولا Ph.D.[2]
حمید گورابی Ph.D.[3]، علی جباری ارفعی M.Sc.[4]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک
۳. پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک
۴. بیمارستان شهدای تجریش، گروه رادیولوژی و انکولوژی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
پست الکترونیک: Email: mansoure@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۲/۱۰، پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۳۰

* **هدف:** تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ در محیط آزمایشگاه پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و تیمار با سایتوکاین‌های SCF، GM-CSF و GDNF همچنین القای اسپرماتوژنزیس در موش گیرنده مدل آزواسپرمی از طریق پیوند سلول‌های کلونی حاصل از کشت

* **مواد و روش‌ها:** با استفاده از دو مرحله هضم آنزیمی، تعلیق سلولی حاوی سلول‌های ژرم و سرتولی از بیضه موش بالغ به دست آمد. سلول‌های اسپرماتوگونی با جداسازی سلول‌های بافت بینابینی، اسپرماتید، اسپرم، اسپرماتوسیت و سرتولی خالص‌سازی شدند. سلول‌های سرتولی با استفاده از ظروف پوشیده از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لکتین داچورا استرامونیوم اگلوتینین (DSA) در بافر فسفات جدا شدند. ماهیت سلول‌ها علاوه بر ریخت‌شناسی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، از طریق نشانگرهای اختصاصی Oct-4 در سلول‌های کلونی‌های حاصل و ویمنتین در سلول سرتولی تایید شد. پس از خالص‌سازی، تعلیق سلولی حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به صورت هم‌کشتی با سلول سرتولی و افزودن سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد SCF (با غلظت‌های ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، GM-CSF (با غلظت های ۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۰/۰۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و GDNF (با غلظت‌های ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. یک هفته پس از کشت سلول‌ها پاسژ داده شد. طول دوره کشت ۳ هفته بود و ارزیابی کلونی(اندازه‌گیری قطر و شمارش تعداد کلونی) در پایان هر هفته و با میکروسکوپ نوری انجام گرفت. سلول‌های اسپرماتوگونی کلونی‌های حاصل از کشت پیوند و به کمک BrdU ردیابی و دو هفته بعد از پیوند بررسی شد.

* **یافته‌ها:** یافته‌های پژوهش نشان داد که هم‌کشتی با سلول سرتولی در مقایسه با سایر گروه‌های آزمون و گروه کنترل به طور معنی‌داری باعث افزایش قطر (۵۰/۱±۲۰۵/۸ میکرومتر) و تعداد کلونی(۵/۲±۲۵/۱) در محیط کشت می‌شود (p<۰/۰۰۱). همچنین در بین گروه‌های تیمار شده با سایتوکاین و فاکتور رشد، GDNF با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر افزایش معنی داری را در قطر کلونی (۴۶/۸±۱۴۴/۷ میکرومتر) نسبت به گروه کنترل (۲۷/۴±۹۵ میکرومتر) نشان داد (p<۰/۰۵). همچنین پیوند سلول‌های کلونی حاصل از کشت باعث القای اسپرماتوژنزیس در موش گیرنده شد.

* **نتیجه‌گیری:** تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی به کمک سیستم هم‌کشتی، راهی مناسب در افزایش تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و کمک به درمان ناباروری است.

کلیدواژگان: اسپرماتوگونی، سلول سرتولی، سیستم هم‌کشتی، سایتوکاین، کلونی زایی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۱۵۰-۱۴۱

مقدمه

اسپرم زایی فرایند تکثیر و تمایز سلول ژرم نر است که از زمان بلوغ آغاز می‌شود و در کل حیات جریان دارد (۱). اساس این فرایند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که دارای پتانسیل ویژه‌ای در خودنوسازی و یا تمایز به سایر رده‌های سلول ژرم و در نهایت اسپرم است (۲). برای بقای توانایی سلول‌های بنیادی بالغ، نیاز به محیط ویژه‌ای، نیچ، است که فاکتورها و کنش واکنش‌های لازم را برای حفظ و پتانسیل آنها فراهم آورد. نیچ به ریزمحیطی گفته می‌شود که سرنوشت سلول بنیادی را با جلوگیری از تمایز آنها حفظ کند و غالبا شامل: سلول‌های تمایز یافته مجاور، سلول‌های بنیادی مجاور و ماتریکس خارج سلولی اطراف این سلول‌ها است. ریزمحیط سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در

طول غشا پایه لوله‌های منی ساز قرار دارد و سلول‌های سرتولی در تشکیل این ریزمحیط نقش به سزایی دارد. این سلول‌ها تکوین سلول‌های ژرم را با ترشح فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها (۳) و برخی فاکتورها نظیر لاکتات و پیروات تنظیم می‌کنند (۴).

یکی از این فاکتورهای رشد، فاکتور سلول بنیادی (SCF)، لیگاند گیرنده c-kit، با دامنه وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی است که توسط سلول سرتولی و سلول لیدیگ بیان شده (۵) و با گیرنده c-kit روی سلول‌های اسپرماتوگونیای نوع A و لیدیگ کنش واکنش دارد. افزودن SCF به سلول‌های اسپرماتوگونی بیان کننده c-kit (A1-A4) و سلول‌های اسپرماتوگونی موش نابالغ در محیط کشت نیز باعث پیشرفت سیکل میتوزی می‌شود و آپاپتوز را در این سلول‌ها کاهش می‌دهد (۶). فاکتور مهم دیگر افزاینده خودنوسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (۷)، فاکتور نوروتروفیکی سلول گلیال (GDNF) است که در بافت عصبی یافت می‌شود و حیات نورون‌ها را افزایش می‌دهد (۸). GDNF در لوله‌های منی‌ساز بیضه نیز توسط سلول‌های سرتولی تولید می‌شود (۹) و با اتصال به گیرنده‌های خود (GFR-alpha وc-Ret) بر سطح سلول‌های اسپرماتوگونی باعث پاسخ‌های درون سلولی می‌شود (۷، ۱۰). در محیط کشت (۷، ۱۱) و محیط بدن موجود زنده (۱۲)، این فاکتور باعث خودنوسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شده است.

علاوه بر فاکتورهای رشدی که توسط سلول‌های سرتولی بیان می‌شود، عوامل میتوژنی دیگری نیز در مجاورت سلول‌های اسپرماتوگونی تولید می‌شود که بر حیات و تکثیر آنها موثر است. فاکتورهای تولید شده توسط بافت بینابینی از تمایز سلول‌های بنیادی جلوگیری می‌کنند (۱۳). GM-CSF یکی از فاکتورهایی است که از ماکروفاژهای بیضه بیان شده و قادر به عبور از سد خونی- بیضه‌ای است. تاکنون اثر GM-CSF بر تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونی، سلول‌های الوئولی تیپ II و سلول‌های استئوبلاست استخوان تایید شده است (۱۴). با توجه به تاثیرات آن در تکثیر برخی رده‌های سلولی، ممکن است که این فاکتور بر خودنوسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی نیز موثر باشد.

تاکنون تلاش‌های زیادی جهت بهبود شرایط محیط کشت به منظور افزایش بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات نوزاد و نابالغ صورت گرفته است و کمتر به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغین توجه شده است این سیستم شامل: هم کشتی با سلول‌های لایه تغذیه کننده سرتولی و STO (نوعی فیبروبلاست) (۱۵)، افزودن سرم (۱۶)، استفاده از محیط‌های بدون سرم و غنی از پتاسیم KSOM (۱۴) و همچنین افزودن سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد بوده است (۱۷).

در بیضه موش بالغ تعداد سلول‌ها بنیادی اسپرماتوگونی کم است و به ۳۵۰۰۰ عدد می‌رسد که ۰/۰۳ کل سلول‌های ژرم را تشکیل می‌دهد (۱۸). هنگامی که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط مناسب قرار می‌گیرند برخی از آنها به مدت طولانی زنده می‌مانند و بعد از پیوند به بیضه گیرنده قادر به تکثیر هستند. با افزایش سن، تعداد و فعالیت آنها نیز کاهش می‌یابد. افزایش تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ در محیط آزمایشگاه جهت موفقیت پیوند این سلول‌ها به ویژه در درمان ناباروری بیماران سرطانی حائز اهمیت است (۱۹).

اهداف این مطالعه تکثیر و افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت با استفاده از سیستم هم‌کشت با سلول‌های سرتولی و افزودن فاکتورهای رشد GNDF، SCF و GM-CSF، همچنین القای اسپرماتوژنزیس در موش آزواسپرمی با استفاده از این سلول‌های تکثیر یافته است. بدین منظور سلول‌های ژرم موش بالغ پس از جداسازی و خالص‌سازی در محیط آزمایشگاه کشت داده شد و پس از ایجاد کلونی به بیضه موش آزواسپرمی پیوند زده شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

موش‌های بالغ ۸-۶ هفته‌ای (نژاد NMRI)، از مؤسسه رازی کرج خریداری و در حیوان خانه دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نگهداری شدند.

جداسازی و خالص سازی سلول‌های اسپرماتوگونی

برای هر بار جداسازی سلولی، از بیضه‌های حداقل ۵ سر موش بالغ استفاده شد. بیضه‌ها پس از جدا شدن از حیوان تا انتقال آنها به محیط کشت جهت شستشو، روی یخ نگهداری می‌شدند. بعد از شستشو در محیط کشت DMEM حاوی اسیدآمینه‌های غیرضروری، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین، کپسول بیضه جدا و در محیط کشت DMEM حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز-دیسپاز و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Dnase به طور مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و طی این مدت هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی توسط سمپلر و به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. پس از طی این مرحله، به منظور حذف بافت بینابینی، اسپرم‌ها و اسپرماتیدها، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز سه بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۳۰۰g سانتریفوژ شد. بعد از هر بارسانتریفوژ محیط بالای رسوب سلولی با محیط DMEM تازه جایگزین شد. قطعات لوله‌های منی‌ساز حاصل از اولین مرحله هضم آنزیمی، جهت هضم بیشتر و جدا کردن سلول‌ها از قطعات لوله‌های منی‌ساز، در محیطی مشابه مرحله اول به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و تا حد امکان جداسازی شد. تعلیق حاصل عمدتا حاوی سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و تعداد کمی سلول‌های بافت بینابینی بود. برای جدا کردن سلول‌های سرتولی از تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی، از روش اسکارپینو و همکاران استفاده شد (۲۰). در این روش از پتری دیش‌های پوشیده از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر لکتین داچورا استرامونیوم اگلوتینین (DSA, Sigma, USA) در بافر فسفات استفاده شد. تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی به این پتری دیش‌ها منتقل و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵درصد CO_2، انکوبه شد. بعد از طی زمان انکوباسیون، سلول‌های آزاد در تعلیق جمع‌آوری

شدند. سلول‌های سرتولی چسبیده به کف پتری دیش نیز با درجه خلوص بیش از ۹۵ درصد جداسازی شدند. برای جدا کردن سلول‌های اسپرماتوسیت از تعلیق سلولی فوق، از روش ون‌پلت و همکاران، استفاده شد (۲۱). در این روش از پتری دیش‌های پوشیده شده با ۱۰میکروگرم بر میلی‌لیتر PNA (Sigma, USA) در بافرفسفات دارای کلسیم استفاده شد. تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی پس از جداسازی سلول‌های سرتولی، به این پتری دیش‌ها منتقل و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۲درجه سانتی‌گراد و میزان ۵درصد CO_2، انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، سلول‌های آزاد در تعلیق جمع‌آوری شدند. سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش سلول‌های اسپرماتوسیت بودند.

بعد از جدا کردن سلول‌های سرتولی و اسپرماتوسیت، سلول‌های اسپرماتوگونی شناور در تعلیق به همراه محیط جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰g شستشو شد. به منظور خالص‌سازی بیشتر سلول‌های تعلیق فوق از صفحات تمایزی استفاده شد؛ بدین ترتیب که تعلیق سلولی به مدت ۲۴ ساعت در پتری‌دیش ۳ سانتی‌متری کشت شد. سلول‌های سرتولی و سلول‌های بافت بینابینی در این مدت چسبیده به کف ظرف قرار گرفتند و سلول‌های آزاد حاوی اسپرماتوگونی از محلول خارج و کشت شدند. از این سلول‌هاجهت کشت، شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها به کمک محلول ۰/۰۴ درصد تریپان بلو استفاده شد.

هم‌کشتی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی

سلول‌های سرتولی بعد از یک هفته کشت، کف پتری‌دیش را پر کردند و در این زمان برای هم‌کشتی با سلول‌های اسپرماتوگونی مناسب بودند. بعد از شکل‌گیری لایه تغذیه کننده سلول‌های سرتولی، تعلیق سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A روی این لایه تغذیه کننده در حضور محیط DMEM دارای ۱۰درصد سرم در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته کشت داده شد.

استفاده از سایتوکاین و فاکتورهای رشد در طی کشت

سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد به تنهایی و با دوزهای مشخص به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. فاکتورهای رشد عبارت بودند از:

۱. GDNF نوترکیب انسانی (Invitrogen Tech-line, USA): با دوزهای ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت۳ هفته که هر ۳ روز یک بار به هنگام تعویض محیط کشت سلول‌ها به آنها اضافه شد.

۲. SCF نوترکیب موشی (Sigma, USA): با دوزهای ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و به مدت ۳ هفته که هر ۳ روز یک بار به هنگام تعویض محیط کشت سلول‌ها به آنها اضافه شد.

۳. GM-CSF (Sigma, USA): با دوزهای ۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۰/۰۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳ هفته هر ۳ روز یک بار به هنگام تعویض محیط کشت سلول‌ها به آنها اضافه شد.

در طی هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی و افزودن سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد، در پایان هفته اول یک بار پاساژ داده شدند. ارزیابی کلونی از نظر تعداد و قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در پایان هفته اول، دوم و سوم انجام شد.

ارزیابی کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت

ارزیابی کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در پایان هفته‌های اول، دوم و سوم از نظر تعداد و قطر کلونی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد و اندازه‌گیری قطر کلونی‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس (Ziess, Germany) که به عدسی چشمی مدرج مجهز شده بود انجام شد. نتایج حاصل از حداقل پنج بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی با آزمون‌های ایمونوسیتوشیمی

ویمنتین یک پروتیین سایتواسکلتون است که درسیتوپلاسم سلول سرتولی بیان می‌شود. ویمنتین در سلول‌های سرتولی با روش مشابه آنوی و همکاران (۲۲) رنگ‌آمیزی شد. به طور خلاصه نمونه‌ها پس از شستشو با بافرفسفات به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدئید ۴درصد ثابت شد. پس از شستشوی مجدد با بافرفسفات، برای تسهیل نفوذ آنتی بادی به داخل سلول و مهار آنتی‌بادی‌های برونزاد از محلول حاوی تریتون X۱۰۰ (۲ درصد) و سرم بز (Burlingame, CA) ۱۰ درصد به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سپس نمونه به مدت۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض آنتی ویمنتین موشی (Sigma, USA) رقیق شده با غلظت ۱/۲۰۰ قرار گرفتند. بعد از ۱۵ دقیقه شستشو با بافر فسفات، روی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه (Sigma, USA) با غلظت ۱/۱۰۰ در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد. پس از شستشو با بافر فسفات هسته سلول‌ها با propidium iodide (Sigma, USA) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌ها پس از شستشو با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. در کنار نمونه‌های آزمون، یک نمونه کنترل نیز رنگ‌آمیزی شد. با این تفاوت که مرحله آنتی‌بادی اولیه از فرایند رنگ‌آمیزی حذف شد.

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونی با روش مشابه پالومبی و همکاران (۲۳) و بر طبق راهنمای کارخانه سازنده آن انجام شد. بدین ترتیب که: نمونه‌ها پس از شستشوی با بافر فسفات در محلول ثبوتی حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر سیترات، ۶/۵ میلی‌لیتر استون، ۰/۶ میلی‌لیتر فرمالدئید (در آب مقطر) به مدت ۱۰ دقیقه ثابت شد. سپس در محلول حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاست رد ویولت و ۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آلفا- نفتول فسفات ۰/۲۵درصد، به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از شستشو در آب و آب‌گیری و همچنین شفاف سازی با چسب انتالن چسبانده شد.

در کنار نمونه‌های آزمون، یک نمونه کنترل مثبت (روده) و بافت بیضه نیز رنگ‌آمیزی شد.

همچنین نشانگر اختصاصی Oct-4 در سلول‌های اسپرماتوگونی کلونی‌ها با روش کابوتا و همکاران (۱۷) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که پس ازمراحل ثبوت، تسهیل نفوذپذیری آنتی‌بادی و مهار آنتی‌بادی‌های برونزاد، به نمونه‌ها آنتی‌بادی اولیه (R&D System) Mouse anti-hOct-3/4 با رقت ۱/۱۰۰ اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از این مرحله و شستشو با بافر فسفات، روی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه (Sigma, USA) با غلظت ۱/۱۰۰ در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد. پس از شستشو با بافرفسفات نمونه‌ها با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. در کنار نمونه‌های آزمون، یک نمونه کنترل نیز رنگ‌آمیزی شد.

بررسی ماهیت اسپرماتوژنیک سلول‌ها به کمک پیوند

توانایی سلول‌های کلونی حاصل از کشت در ایجاد فرایند اسپرم‌زایی در موش گیرنده بعد از پیوند مورد بررسی قرار گرفت. لذا ۲۴ساعت قبل از پیوند به کمک هضم آنزیمی و روش مکانیکی سلول‌ها جدا شده و پس از افزودن BrdU مجددا کشت داده شد. جهت بررسی نفوذ BrdU به داخل سلول‌ها در کف پتری دیش یک لامل ژلاتینه شده قرار گرفت. بلافاصله قبل از پیوند، لامل دارای سلول از پتری‌دیش خارج و با Anti-BrdU رنگ‌آمیزی شد. پس از اطمینان از نفوذ BrdU به داخل سلول‌ها و جداسازی سلول‌های سرتولی توسط DSA لکتین، تعداد 10^5 سلول کلونی در ۱۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM سرم دار ۱۰درصد و مقداری رنگ حیاتی (۲-۱ میکرولیتر) به وسیله یک میکروپیپت با قطر مناسب از طریق مجرای وابران به رت بیضه تزریق شد. کلونی‌های پیوندی از گروه هم کشت با سلول سرتولی انتخاب شدند.

ارزیابی بیضه گیرنده بعد از پیوند

بیضه پیوند شده موش گیرنده دو هفته بعد از پیوند مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی پیوند بعد از آنکه بیضه‌ها در پارافرمالدئید ۴درصد ثابت شدند و پس از طی مراحل آب‌گیری و آغشتگی با پارافین به کمک آنتی بادی اولیه علیه BrdU رنگ شدند. با این کار سلول‌های پیوند شده ردیابی شدند.

بررسی آماری

تجزیه و تحلیل اطلاعات به کمک آزمون repeated measure ANOVA (آزمون Tuky-Test) انجام شد. معنی داری در حدود $p<0/05$ تعیین شد.

یافته‌ها

جداسازی و تایید ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی

تعلیق سلولی جدا شده از لوله‌های منی‌ساز موش بالغ حاوی انواع رده‌های مختلف سلولی ژرم با اندازه و شکل متفاوت بود. سلول سرتولی قطری حدود ۱۴-۱۲ میکرومتر، حاشیه‌ای ناصاف و نامنظم و به خاطر قطرات چربی ظاهری گرانولار داشت. این سلول پس از تقسیم با ایجاد زوایه متعدد یک لایه سلول در کف پتری دیش ایجاد کرد (شکل ۱a-c-b).

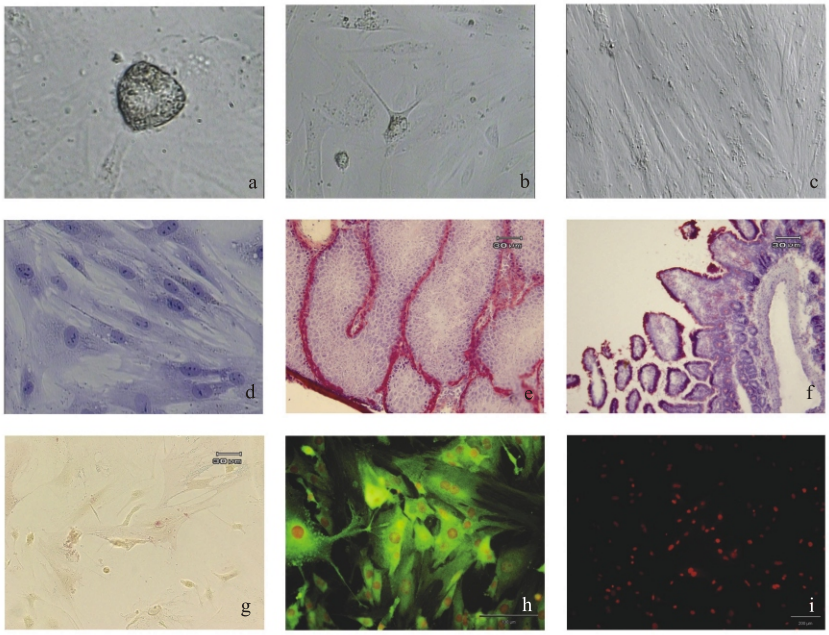
در رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین این سلول‌ها دارای چند هستک بودند (شکل ۱d). قطر سلول اسپرماتوگونی بین ۱۰-۸ میکرومتر بود و در این سلول ۳-۲ هستک خارج مرکزی وجود داشت. این سلول پس از تقسیم، کلونی سلولی ایجاد کرد (شکل ۲a). سلول اسپرماتوسیت بزرگترین سلول بیضه بود. این سلول‌های کروی قطری حدود ۱۸-۱۶ میکرومتر و ظاهری تقریبا صاف و گاهی داشتند و دو توده برجسته بر روی سلول بود. این سلول‌ها در دومین روز کشت می‌مردند که با شستشو از محیط خارج می‌شدند.

برای فعالیت آلکالین فسفاتاز، ابتدا به عنوان کنترل مثبت بافت روده موش که دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز زیاد است مورد بررسی قرار گرفت (شکل b و ۱c). به منظور تعیین خلوص سلول‌های سرتولی فعالیت آلکالین فسفاتاز آنها در تک لایه سرتولی بررسی شد. بررسی نشان داد سلول‌های لایه تغذیه کننده فاقد فعالیت آلکالین فسفاتاز هستند و در موارد نادر سلول‌های میوئیدی در کف ظرف مشاهده می‌شود (شکل ۱d). بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های اسپرماتوگونی نشان داد سلول‌های تشکیل دهنده کلونی‌ها (سلول‌های اسپرماتوگونی) دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز مثبت هستند (شکل ۲b).

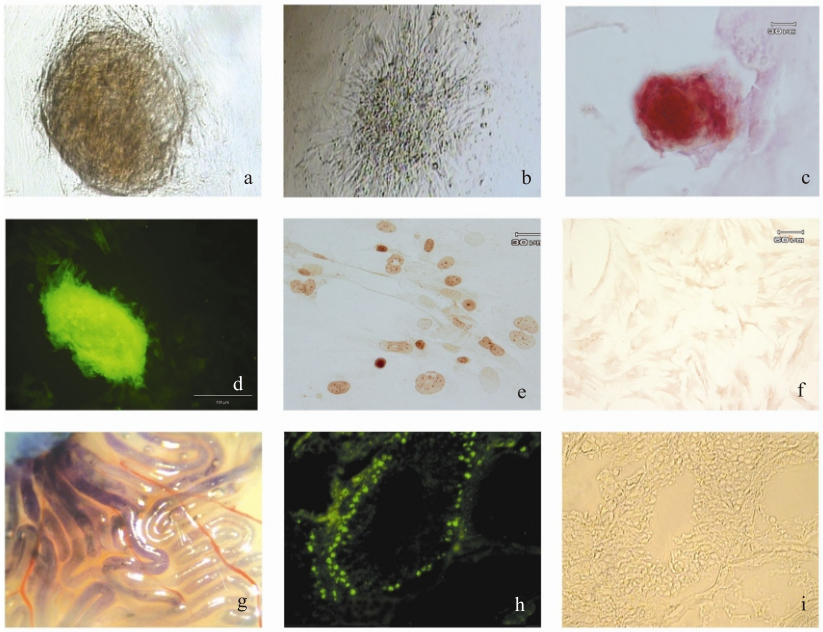
ویمنتین جهت شناسایی سلول‌های سرتولی و Oct-4 جهت شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مورد بررسی قرار گرفت. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی نشان داد در سیتوپلاسم اطراف هسته سلول‌های لایه تغذیه کننده، ویمنتین بیان می‌شود (شکل ۱e). از طرف دیگر سلول‌های تشکیل دهنده کلونی Oct-4 را بیان کردند (شکل ۲c).

مقایسه بین گروه هم‌کشت با سلول سرتولی و گروه‌های مختلف تیمار شده با سایتوکاین و فاکتور رشد

ارزیابی کمی کلونیزاسیون در تعلیق سلولی کشت شده (2×10^6 سلول) در گروه کنترل نشان داد بعضی از سلول های اسپرماتوگونی موجود در تعلیق قادربه تولید کلونی سلولی به میزان بسیار کم (۰/۸±۲/۱) در پایان هفته اول هستند. تقسیمات سلولی جهت تشکیل کلونی در سلول‌های اسپرماتوگونی با گذشت زمان افزایش معنی‌داری را نشان نداد. علاوه بر این میانگین قطر آنها نیز افزایش معنی‌داری نداشت به طوری که در پایان هفته سوم ارزیابی کمی کلونیزاسیون تعداد کلونی‌ها ۳/۱±۲/۲ و قطر آنها نیز ۹۷±۲۷/۴ میکرومتر بود (جدول ۱ و ۲).



شکل ۱: خصوصیات سلول‌های تک‌لایه تغذیه کننده: **a**) سلول‌های جدا شده با استفاده از **DSA-lectin** یک روز پس از کشت، **b**) چهار روز پس از کشت، **c**) این سلول‌ها تکثیر شدند و یک هفته پس از کشت تک لایه تغذیه کننده را ایجاد کردند. **d**) رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین. بررسی فعالیت آلکالین فسفاتازی در گروه‌های کنترل شامل: **e**) بافت بیضه موش بالغ **f**) روده و **g**) سلول‌های تک لایه. **h**) بیان سایتواسکلتون ویمنتین در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی **i**) گروه کنترل همان سلول‌ها بدون افزودن آنتی بادی اولیه است.
بزرگنمایی: (۴۰۰× **a, f, g**)، (۲۰۰× **b-d, h**)، (۱۰۰× **e, i**) (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات)



شکل ۲: خصوصیات سلول‌های اسپرماتوگونی: **a, b**) مورفولوژی یک کلونی حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با سلول سرتولی، **c**) واکنش آلکالین فسفاتازی در سلول‌های کلونی **d**) بیان نشانگر **e. oct-4**) بعد از اضافه کردن **BrdU** به منظور ردیابی سلول‌های پیوندی و رنگ‌آمیزی قبل از پیوند با آنتی **BrdU**، **f**) گروه کنترل بدون افزودن آنتی **BrdU**، **g**) پیوند سوسپانسیون سلولی با تزریق از طریق مجرای وابران، **h**) ردیابی این سلول‌ها با رنگ‌آمیزی آنتی **BrdU** پس از دو هفته در با فت بیضه **i**) تصویر فازکنتراست از همان تصویر. بزرگنمایی: (۴۰۰× **c-e, h, i**)، (۴۰× **b**)، (۲۰۰× **a, f**) (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات)

جدول ۱: مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها در زمان‌های مختلف بین گروه کنترل و گروه‌های آزمون

گروه‌های آزمایش	هفته او ل	هفته دوم	هفته سوم
کنترل (سلول تازه)	۲/۱±۰/۸	۳/۱±۱/۳	۳/۱±۲/۲
هم کشتی با سلول سرتولی	۲۸/۳±۵/۹ [a]	۲۷/۸±۷ [a]	۲۵/۱±۵/۲ [a]
۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF	۶/۲±۱/۴ [b]	۴/۳±۲/ ۴ [b]	۴/۹± ۲ [b]
۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF	۴/۲±۱/ ۳ [b]	۳/۳±۱/۲ [b]	۳/۹±۱/۱ [b]
۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF	۳/۲±۰/۹ [b]	۳±۱/۵ [b]	۳/۵±۱/۶ [b]
۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF	۴/۲±۱/ ۸ [b]	۲±۱/۱ [b]	۴±۲ [b]
۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF	۴/۵±۱ [b]	۳/۶±۱/۲ [b]	۳/۱±۰/۸ [b]
۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF	۵/۶±۱/ ۱ [b]	۴/۵±۰/ ۹ [b]	۳/۷±۱/۳ [b]
۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF	۴/۱±۱/۶ [b]	۳/۸±۱/۴ [b]	۶±۳/۹ [b]
۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF	۳/۷±۱/۵ [b]	۴/۷±۰/ ۶ [b]	۴/۳±۰/۷ [b]
۰/۰۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF	۴/۶±۱/۷ [b]	۵/۹±۲/۳ [b]	۳/۸±۱/۷ [b]

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. (p<۰/۰۰۱)
انجام آزمایش برای هر گروه حداقل ۵ بار تکرار شد.
a : در مقایسه با گروه کنترل در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است.
b: در مقایسه با گروه هم‌کشتی با سلول سرتولی در همان ستون از نظر آماری معنی دار است.

مقایسه بین گروه هم کشت با سلول سرتولی و سایر گروه‌های آزمون نشان داد همکشتی با سلول سرتولی به طور معنی‌داری باعث افزایش قطر و تعداد کلونی در محیط کشت می‌شود (p<۰/۰۰۱). در گروه هم کشت با سلول سرتولی، بیشترین تعداد کلونی به دست آمده در هفته اول کشت (۲۸/۳±۵/۹) و کمترین آن در پایان هفته سوم (۲۵/۱±۵/۲) مشاهده شد که تقریبا هشت برابر افزایش را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.همچنین بیشترین اندازه قطر کلونی به دست آمده در هفته سوم کشت (۲۰۵/۸±۵۰/۱میکرومتر) مشاهده شد که قطر کلونی‌های به دست آمده تقریبا ۲ برابر نسبت به گروه کنترل بزرگتر بود (جداول شماره۱ و ۲).

شمارش تعداد کلونی‌های حاصل از سلول‌هایی که در معرض GDNF قرار گرفته بودند نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما مطالعه قطر کلونی‌ها نشان داد قطر کلونی‌های گروه‌های تیمار شده با ۱۰۰نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود(p<۰/۰۵) که بیشترین اندازه قطر کلونی به دست آمده در هفته سوم کشت در غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF (۱۴۴/۸±۴۶/۸ میکرومتر) مشاهده شد(جداول ۱ و ۲).

مقایسه قطر و تعداد کلونی‌های گروه‌های تیمار شده با SCF وGM-CSF تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد. زمان ظهور کلونی در دو گروه هم کشتی با سرتولی و GDNF ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر نیز زودتر از بقیه گروه‌ها بود (جداول شماره۱ و ۲).

پیوند سلول‌های کشت شده و ارزیابی پیوند

در محیط کشت، سلول‌هایی که BrdU در آنها نفوذ کرده بود دارای هسته قهوه‌ای تا سیاه بودند (شکل e۲). شمارش سلول‌های رنگ شده و رنگ نشده در زیر میکروسکوپ مجهز به گرید مدرج چشمی مشخص کرد که حدود ۷۰ درصد آنها با BrdU ترکیب شده‌اند. سپس پیوند سلولی به منظور ارزیابی وجود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در کلونی‌های حاصل از کشت و عملکرد آنها در ریز محیط بیضه از طریق مجرای وابران به (Rete) بیضه انجام شد (شکل g۲). ردیابی سلول‌های پیوندی نشان داد که در هفته دوم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در قاعده لوله‌های منی‌ساز جای گیری کرده (شکل i۲) و تقسیمات خود را بعد از پیوند در بیضه گیرنده آغاز کردند.

جدول۲: مقایسه میانگین قطر کلونی‌ها (میکرومتر) در زمان‌های مختلف بین گروه کنترل و گروه‌های آزمون

گروه‌های آزمایش	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
کنترل (سلول تازه)	۹۰/۸±۲۲/۴	۹۰±۲۲/۸۴	۹۵±۲۷/۴
هم کشتی با سلول سرتولی	۱۹۸/۳±۵۱/۱ [a]	۱۸۷/۹±۴۱/۹ [a]	۲۰۵/۸±۵۰/۱ [a]
۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF	۱۳۸/۵±۴۳/۷ [b]	۱۱۵/۵±۴۲/۲ [b, e*]	۱۴۴/۷±۴۶/۸ [b]
۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF	۹۶/۲±۳۱/۵ [b,e**]	۱۰۸/۹±۴۱/۴ [b]	۱۳۲/۵±۴۶/۶ [b,d*]
۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF	۷۹/۵±۱۹ [b,c,e**]	۷۷/۸±۱۷/۵ [b]	۱۲۰±۵۰/۴ [b]
۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF	۱۲۹/۱±۱۸ [b,c*]	۱۳۵±۲۵/۲ [b]	۱۳۳/۳±۳۵/۴ [a**,b]
۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF	۹۷/۵±۱۹/۷ [b]	۱۰۵±۱۶/۶ [b]	۱۰۳/۲±۳۱/۱ [b,c*,d]
۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF	۹۷/۵±۱۷/۶ [b]	۱۰۵±۱۶/۶ [b]	۱۰۹±۳۴/۵ [b,d*]
۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF	۸۳±۹/۷ [b,e**]	۱۰۸±۲۸/۶ [a*]	۱۱۳±۱۲/۵ [b]
۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF	۹۰/۵±۱۴/۲ [b,c*]	۱۳۱/۶±۲۰/۷ [b]	۱۳۸±۲۳/۹ [b]
۰/۰۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF	۹۹/۱±۲۰/۱ [b]	۹۸/۶±۱۴/۵ [b]	۱۱۹±۲۳/۱ [b]

p<۰/۰۱، p<۰/۰۵***

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.
انجام آزمایش برای هر گروه حداقل ۵ بار تکرار شد.
a: در مقایسه با گروه کنترل در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱).
b: در مقایسه با گروه هم‌کشتی با سلول سرتولی در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱).
c: در مقایسه با گروه ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۵).
d: در مقایسه با گروه ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱).
e: در مقایسه با هفته سوم در همان ردیف از نظر آماری معنی‌دار است.

بحث

در این مطالعه تاثیر سیستم‌های مختلف کشت از جمله هم‌کشتی با سلول سرتولی و افزودن فاکتورهای رشد بر افزایش تشکیل کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ در محیط آزمایشگاه و کارایی آنها پس از پیوند بررسی شد و نتیجه‌گیری گردید که هم کشتی با سلول سرتولی نسبت به افزودن فاکتور رشد تاثیر بیشتری بر کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ دارد و GDNF نیز در بین فاکتورهای استفاده شده در این پژوهش تاثیر بیشتری دارد. همچنین سلول‌های کلونی‌های حاصل از کشت توانست در موش مدل آزواسپرمی اسپرماتوژنزیس ایجاد کند.

انتخاب نوع سایتوکاین و فاکتورهای رشد در این مطالعه بر اساس وجود آنها و گیرنده‌شان در بیضه موش بالغ بوده است. مطالعات گذشته

نشان داده است تمامی فاکتورهای به کار رفته در این مطالعه و گیرنده‌های آنها در سلول‌های بیضه موش بالغ بیان می‌شود (۲۴).

خالص‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ نسبت به موش نابالغ به مراتب مشکل‌تر است. چون که بیضه موش بالغ دارای انواع مختلف سلول ژرم است ولی در موش نوزاد و نابالغ تنوع سلولی محدود است و ممکن است سلول‌های پره اسپرماتوگونیا نیز در بین سلول‌های جدا شده وجود داشته باشد که پتانسیل کلونی‌زایی آنها بیشتر از اسپرماتوگونی است. نوع A اسپرماتوگونی با خلوص ۹۰درصد از موش (۲۵)، رت (۲۶) و خوک نابالغ (۱۴) جداسازی شده است.

ایزدیار و همکاران ۸۷–۶۵ درصد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A را از بیضه‌های گوساله ۷–۵ ماهه (نابالغ) خالص‌سازی کردند (۲۷). با توجه به موارد فوق در این تحقیق، سلول‌های بیضه موش بالغ ۸–۶ هفته بر اساس روش ناگانو و همکاران (۱۶) و جوئینگ و همکاران (۲۸) کشت داده شدند.

در سیستم کشت مطالعه حاضر، سلول‌های با حاشیه نامنظم و ظاهر گرانولار (سلول سرتولی) ایجاد تک لایه کردند که به عنوان لایه تغذیه کننده مورد استفاده قرار گرفت. برای تایید بیشتر ماهیت این سلول‌ها علاوه بر ریخت‌شناسی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و نشانگرهای اختصاصی نیز در این سلول‌ها بررسی شد. به کمک ایمونوسیتوشیمی، وجود سایتواسکلتون ویمنتین در آنها بررسی شد و نتایج نشان داد سلول‌ها دارای این پروتیین هستند. ویمنتین یک پروتیین سایتواسکلتون است که در سلول‌های اپی‌تلیالی یافت می‌شود و این نشانگر از روز ۱۴ به بعد در سلول‌های سرتولی (۲۰) و در اطراف هسته آن (۲۹) بیان می‌شود. نتایج این آزمون با یافته‌های دیگر پژوهشگران مطابقت دارد (۲۲). بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های لایه تغذیه کننده نشان داد این سلول‌ها فاقد فعالیت آلکالین فسفاتازی هستند. همچنین اسکارپینو و همکاران ثابت کردند که سلول‌های سرتولی فعالیت آلکالین فسفاتازی ندارند (۲۰).

برای تایید ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی علاوه بر ریخت شناسی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و نشانگر اختصاصی Oct-4 در سلول‌های کلونی بررسی شد. نتایج نشان داد که سلول‌های کلونی در محیط کشت، Oct-4 را بیان کرده‌اند و دارای فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز هستند. این یافته با مطالعات قبلی که ثابت کرده بودند سلول‌های اسپرماتوگونی کلونی Oct-4 را بیان کرده و دارای فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است تطبیق داشت (۱۷، ۲۸، ۳۰). اما با مطالعات ایچارد و همکاران مطابقت نداشت (۳۱). آنها نشان داده‌اند که سلول‌های ژرم ابتدایی آلکالین فسفاتاز مثبت بوده و از مرحله گنادوسیت به بعد، فعالیت آلکالین فسفاتازی خود را از دست می‌دهند. با این وجود فرض بر تولید کلونی‌ها از سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی گذاشته شد و برای تایید ماهیت اسپرماتوژنیکی این کلونی‌ها از خاصیت ایجاد اسپرماتوژنزیس آنها پس از پیوند در موش گیرنده استفاده شد.

مطالعات مختلف نشان داده است سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (از زیر شاخه اسپرماتوگونی نوع A) دارای نشانگر اختصاصی بیوشیمیایی خاص و منحصر به فرد نیست (۳۲) و حضور قطعی آن، از طریق پیوند به گیرنده آزواسپرمی امکان‌پذیر است (۳۳). پیوند این سلول‌ها نشان داد آنها توانایی شروع و حفظ فرایند اسپرم‌زایی را دارند و ماهیت اسپرماتوژنیک آنها تایید شد. از آنجایی که بر اساس گزارش‌های قبلی تنها سلول بنیادی اسپرماتوگونی است که ظرفیت شروع و حفظ فرایند اسپرم‌زایی را دارد (۳۴)، لذا می‌توان ادعا کرد کلونی‌های حاصل از کشت دارای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند. این نتایج با یافته‌های دیگر پژوهشگران که نشان داده‌اند سلول‌های بنیادی کشت شده پس از پیوند منجر به اسپرم‌زایی می شود، مطابقت دارد (۱۶، ۲۸، ۳۵).

در پژوهش حاضر، تعداد کلونی‌ها در گروه هم کشت با سلول سرتولی نسبت به گروه کنترل و گروه‌های درمانی دیگر بیشتر بود و علاوه بر کلونی‌های گرد که نشان دهنده خود نوسازی سلول‌های اسپرماتوگونی است، تعدادی کلونی‌های شعاعی نیز همانند مطالعه ایزدیار و همکاران مشاهده شد (۳۶). بر طبق مطالعه ایزدیار و همکاران حضور کلونی‌های شعاعی شکل نشانی از شروع تمایز در کلونی‌های به دست آمده است. در تحقیق حاضر تعداد کلونی طی هفته دوم و سوم کاهش یافت که احتمالا به دلیل پاساژ (زیر کشت) کلونی‌ها در پایان هفته اول و یا همان‌گونه که قبلا گزارش شد (۳۶) ممکن است نتیجه آپوپتوز یا جداشدن سلول‌های ژرم تمایز یافته از کلونی باشد.

بر طبق مطالعات پیشین طی فرایند اسپرم‌زایی چندین فاکتور رشد و سایتوکاین دخالت دارد که به طریق پاراکرینی و ژوکستاکرینی عمل می‌کنند. سلول‌های سرتولی کنش واکنش فیزیکی نزدیکی با سلول‌های اسپرماتوگونی دارد و دامنه زیادی از فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های تنظیم‌کننده حیات و حفظ و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به انواع سلول‌های ژرم را ترشح می‌کند (۳). تماس فیزیکی و فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های مترشحه بر حیات این سلول‌ها تاثیر می‌گذارد و ریزمحیط مناسبی را جهت تکثیر و تشکیل کلونی فراهم می‌آورد (۳). این مطالعه با مطالعات گذشته خود که نشان دادند تک لایه سلول سرتولی تکثیر و تمایز سلول‌های ژرم را حمایت می‌کند مطابقت دارد (۷۶–۷۸). تاکنون بهترین نتایج هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی در موش (۲۳) و گاو (۳۶) مشاهده شده است. برخی مطالعات اخیر، حضور سلول سرتولی را به لحاظ القای تمایز سلول بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت مضر دانسته‌اند (۲۲، ۳۶).

به منظور تعیین شرایط کشت مناسب به مقایسه اثرات GNDF، SCF و GM-CSF و هم‌کشتی سلول سرتولی با سلول ژرم بر توانایی تشکیل کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی پرداخته شد. نشان داده شد سیستم هم‌کشتی با سلول سرتولی در مقایسه با فاکتورهای اثرات GNDF، SCF و GM-CSF تشکیل کلونی را در سلول‌های اسپرماتوگونی بالغ در محیط آزمایشگاه افزایش داد. در گروه تیمار شده با GNDF غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر قطر کلونی‌ها را طی کشت نسبت به گروه کنترل افزایش داد. نتایج مطالعات مختلف از جمله مطالعه زیر، این فرضیه را تقویت می‌کند که GNDF فاکتور مهم خودنوسازی

یا تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است.

کوبوتا و همکاران، سلول‌های بنیادی غنی شده اسپرماتوگونی را از موش نهان بیضگی به روش FACS و MACS با استفاده از آنتی‌ژن Thy-1 به عنوان نشانگر اختصاصی جدا کردند و در محیط کشت MEM-α سرم‌دار بر روی تک لایه سلول‌های STO و فاکتورهای رشد کشت دادند و اثر مثبت GDNF را مشاهده کردند. اما این اثر بر روی تکثیر سلول‌ها معنی‌دار نبود و علت را اثرات پوششی سرم بر روی فاکتورهای رشد دانستند (۱۷). پس از آن، در مطالعه دیگری GDNF به محیط بدون سرم با شرایط فوق اضافه شد. آنها گسترش جمعیت سلولی را مشاهده نکردند و فقط سلول‌ها زنده باقی ماندند. اما هنگامی که GFR1 محلول (گیرنده GDNF) و bFGF را به محیط کشت اضافه کردند، در مدت زمان کوتاهی (۱۰-۸ روز) گسترش جمعیت سلولی را مشاهده کردند. بیشترین افزایش در تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی زمانی رخ داد که GDNF با غلظت ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، GFRα1 با غلظت ۳۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و bFGF با غلظت ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر در هم‌کشتی سلول ژرم با لایه تغذیه کننده STO استفاده شد. نتایج این تحقیق، مطالعات پیشین را مبنی بر اهمیت نقش تنظیم‌کنندگی GDNF بر روی خودنوسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تایید می‌کند (۱۴، ۱۶، ۱۷).

در گروه‌هایی که فاکتورهای SCF و GM-CSF استفاده شد، تعداد کلونی‌ها در پایان کشت هیچ تغییر معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اثر این فاکتورها بر تشکیل کلونی صورت نگرفته است. کریمرس و همکارانش اثرات فاکتور های مختلف رشد TNF-α، GM-CSF، SCF، GDNF و ترکیب GDNF با TGF-β را بر سلول‌های اسپرماتوگونی بالغ بررسی کردند و دریافتند که SCF،GM-CSF به تنهایی و یا در ترکیب با سایر فاکتورهای رشد اثر معنی‌داری بر افزایش درصد حیات سلول‌ها ندارد (۳۷).

به طور کلی، یافته‌ها مؤید گزارش‌های مختلفی است (۱۰، ۱۷) که نشان می‌دهد اکثر فاکتورهای رشد دارای اثرات طبیعی و حتی کاهنده تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. افزایش تعداد سلول‌ها احتمالا خودنوسازی را نشان می‌دهد و حالت پایدار نشانه حیات و کاهش تعداد احتمالا نشان دهنده مرگ سلول‌های بنیادی و تمایز آنها است (۳۸).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی بر تکثیر آنها در محیط آزمایشگاه موثر است؛ به گونه‌ای که این کلونی‌ها علاوه بر تکثیر می‌توانند در محیط موجود زنده، اسپرم زایی را القا کنند. بنابراین در مطالعه حاضر، هم کشتی با سلول سرتولی در مقایسه با افزودن فاکتور های رشد، راهی مناسب برای تشکیل کلونی در محیط کشت از سلول بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ است.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه های پژوهش حاضراز محل اعتبارات دانشگاه تربیت مدرس و شبکه سلول‌های بنیادی در قالب طرح تحقیقاتی مصوب پرداخت شده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از آقای پرفسور دکتر de Rooij و خانم دکتر Ans van Pelt (گروه باروری بیمارستان AMC دانشگاه آمستردام هلند)، به خاطر همکاری‌های علمی ابراز می‌کنند. همچنین از همکاری آقای شهرام پوربیرانوند و همکاران پژوهشکده رویان به ویژه آقای دکتر عبدالحسین شاهوردی قدردانی و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Ogawa T. Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. J Mol Med, 2001; 79: 368-374

2. Meistrich ML, van Beek MEAB. Spermatogonial stem cells, assessing their survival and ability to produce differentiated cells. Methods Toxicol, 1993; 3:106-123

3. Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. Int Rev Cytol, 1993; 147: 25-96

4. Boussouar F, Benahmed M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. Terndes Endocrinol Metab, 2004; 15: 345-350

5. Manova K, Huang EJ, Angeles M, de Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P , Bacharova RF. The expression of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. Dev Biol, 1993; 15758-15799

6. Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. J Biol Chem, 2001; 276: 40225-40233

7. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science, 2000; 287: 1489-1493

8. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science, 1993; 260: 1130-1132

9. Viglietto G, Dolci S, Bruni P, Baldassarre G, Chiariotti L, Melillo R, Salvatore G, Chiappetta G, Sferratore F, Fusco A, Santoro M. Glial cell line-derived neutrotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret expressing spermatogonia. Int J Oncol, 2000; 16: 689-694

10. Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, McLean DJ. Testis tissue explant culture supports survival and

proliferation of bovine spermatogonial stem cells. Biol Reprod, 2004; 70: 625-631
11. Yomogida K, Yagura Y, Tadokoro Y, Nishimune Y. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells s. Biol Reprod, 2003; 69: 1303-1307
12. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor Theriogenology, 2006; 65: 1828-1847
13. Rooij de DG, van Pelt AMM. Spermatogonial Stem Cell Biology. Annu Rev Biomed Sci, 2003; 5:105-114
14. Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod, 1999; 61: 225-230
15. Maekawa M, Nishimune Y. In-vitro proliferation of germ cells and supporting cells in t he neonatal mouse testis. Cell Tissue Res, 1991; 265: 551-554
16. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell, 1998; 30, 389-397
17. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Prroc Natl Accad Sci, USA 2004; 101: 16489-16494
18. Tegelenbosch RAJ, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H: 101 F1 hybrid mouse. Mutat Res, 1993; 290: 193-200
19. Brinster RL. Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. Cell Dev Biol, 1998; 9: 401-409
20. Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Froysa B, Soder O, Boitani CA. Rapid method of Sertoli cells isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. Mol Cell Endocrinol, 1998; 146: 121-127
21. Van Pelt AMM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. Biol Reprod, 1996; 55: 439-444
22. Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirk BR. Isolation of Sertoli cells from Adult Rat Testes: An Approach to Ex Vivo Studies of Sertoli cells Function. Biol Reprod, 2003; 68: 996-1002
23. Palombi F, Dicarlo C. Alkaline Phosphatase is a Marker for Myoid Cells in Cultures of Rat Peritubular and Tubular Tissue. Biol Reprod, 1988; 39: 1101-1109
24. Cancilla B, Davies A, Ford-Perriss M, Risbridger GP. Discrete cell- and stage-specific localization of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development. J Endocrinol, 2000; 164, 149-159
25. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse Isolation and morphological characterization. J Cell Biol, 1977; 74: 68-85
26. 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: 708-717
27. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction, 2002; 124: 85-94
28. Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. J Androl, 2003; 24: 661-669
29. Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. Dev Dyn, 1997; 208:125-136
30. Shi YQ, Wang QZ, Liao SY, Zhang Y, Liu YX, Han CS. In vitro propagation of spermatogonial stem cells from KM mice. Front Biosci, 2006; 11: 2614-2622
31. Richards AJ, Enders GC, Resnick JL. Differentiation of murine premigratory primordial germ cells in culture. Biol Reprod, 1999; 61: 1146-1151
32. Ryu BY, Orwig K, Kubota H, Avarbock M, Brinster RL. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. Dev Biol 2004; 274: 158-170
33. McLean DJ, Johnston DS, Russell LD, Griswold MD. Germ cell transplantation and the study of testicular function. Trends Endocrinol Metab, 2001; 12: 16-21
34. Johnston DS, Russell LD, Griswold MD. Advances in spermatogonial stem cell transplantation Rev Reprod, 2000; 5: 183-188
35. Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. Reprod Fertil Dev, 2006; 18, 709-720
36. Izadyar F, Ouden KD, 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: 272-281
37. Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AMM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction, 2002; 124: 791-799
38. Aponte PM, van Bragt MPA, de Rooij DG, van Pelt AMM. Spermatogenic stem cells: characteristics and experimental possibilities. AMPIS, 2005; 113: 727-774