تأثیر هورمون گنادوتروپین کوریونی انسانی بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی

رضا نارنجی‌ثانی[1*]، پرویز تاجیک[2]، نگار دامغانیان[1]، گلشید جاودانی[2]

چکیده

اسپرماتوژنز فرایند پیچیده‌ای است که از سلول‌های اسپرماتوگونی منشا گرفته و شامل مراحل پی در پی و سازمان یافته‌ای از تکثیر وتمایز سلولی است که در نهایت منجر به تولید سلول‌های عملکردی اسپرماتوزوا می شود. جهت انجام این مطالعه ، نمونه گیری سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی از گوساله‌های ۵-۳ ماهه انجام گرفت. در گروه‌های درمانی، کشت همزمان سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی، قبل از ارزیابی کلونی تحت درمان با هورمون گنادوتروپین کوریونی انسانی (hCG: human Chorionic Gonadotropin) ۲، ۵ و ۱۰ واحد در هر میلی‌لیتر محیط کشت قرار گرفتند .برای شناسایی سلول‌های سرتولی از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی ویمنتین و کلونی‌های اسپرماتوگونی بنیادی با روش ایمونوسیتوشیمی OCT-4 شناسایی شدند. نتایج نشان داد که شناسایی کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی به خوبی به ترتیب توسط رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی OCT-4 و ویمنتین انجام گرفته و هورمون hCG تعداد و قطر کلونی را افزایش می‌دهد این مطالعه نشان داد که .hCG می‌تواند منجر به القای تکثیر و فرایند تمایز در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی شود.

واژگان کلیدی: *کشت، گنادوتروپین کوریونی انسانی، سلول‌های سرتولی، سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی*

تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۱

مقدمه

اسپرماتوژنز فرایند پیشرفته‌ای است که از سلول‌های اسپرماتوگونی (SSC: Spermatogonial Stem Cell) منشا گرفته و شامل مراحل پی‌درپی و سازمان یافته از تکثیر و تمایز سلولی است که در نهایت منجر به تولید سلول‌های عملکردی اسپرماتوزوا می‌شود (۱۲). بسیاری از فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و تعامل سلول‌های زاینده و سرتولی این فرایند را تنظیم کرده و هرگونه اختلال در این فرایند می‌تواند منجر بـه ناباروری جنس نر شود (۸). سلول‌های سرتولی به دلایل مختلف نقش حیاتی در عملکرد سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه دارند. این سلول‌های پیکری وظیفه تولید و بقای ساختار سلولی بافت پوششی زایا، تغذیه لایه زاینده و به طوراولیه ایجاد بخش سلولی سد خونی بیضوی را دارند (۵). گیرنده تیروزین کیناز c-kit) در سلول‌های زاینده ولیگاند آن، فاکتور سلول بنیادی (SCF: Stem Cell Factor) در سلول‌های بنیادی بیضه بیان می‌شود. تعامل بین c-kit و SCF برای نگهداری و یا میتوز سلول‌های تمایز یافته اسپرماتوگونی تیپ A ضروری است (۱۷ و ٦). هم‌کشتی سلول‌های جنسی و سلول‌های سرتولی به منظور نشان دادن اثرات ماندگاری فاکتورهای رشد اضافه شده به سلول‌های زاینده مورد استفاده قرار می‌گیرد(٦). در میان همه هورمون‌های مرتبط با اسپرماتوژنز هورمون محرک فولیکولی (FSH: Follicle Stimulating Factor) به عنوان هورمونی که علاوه بر افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی نقش تعیین کننده‌ای در بقای سلول‌های بنیادی دارد پیشنهاد شده است (۲). گنادوتروپین‌های جفتی و هیپوفیزی، هورمون تحریک کننده رشد فولیکول (FSH: Follicle Stimulating Factor) ، هورمون لوتیینی کننده (LH: luteinizing Hormone) و گنادوتروپین کوریونی (CG: Chorionic Gonadotropin) متعلق به خانواده‌ی هورمون گلیکوپرتئینی هستند (١٤). این گلیکوپروتئین‌های هتـرودیمـر وغیرکوالان شامل یک زیرواحد مشترک (a-GSU) و یک زیرواحد اختصاصی هورمون b می‌باشند (۱۰). گنادوتروپین‌ها اخیرا در پزشکی و دامپزشکی به منظور شبیه-سازی مکانیسم‌های اندوکرینی در چرخه‌های تولیدمثلی استفاده می‌شـونـد.

*۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران (rezasani_vet@semnan.ac.ir)
۲- گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

hCG یک گلیکوپروتیین دیمر بوده که توسط جفت انسان ترشح می‌شود (۹). زیر واحد a این هورمون یکسان است و زیر واحد b آن بین اعضای این خانواده‌ی در حدود ۸۰٪ شباهت دارد. درمیان همه هورمون‌های مرتبط با اسپرماتوژنز FSH به عنوان هورمونی که علاوه بر افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی نقش تعیین کننده‌ای در بقای سلول‌های بنیادی دارد پیشنهاد شده است (۲). سلول‌های سرتولی فقط دارای گیرنده‌های FSH هستند، بنابراین، استفاده از هورمون hCG به عنوان هورمونی که عملکردی مشابه FSH دارد می‌تواند منجر به بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی شود. هدف از مطالعه‌ی حاضر مشخص کردن اثر هورمون hCG بر تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی بعد از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی است.

مواد و روش کار

حیوانات

در این مطالعه تجربی، از ۵ راس گوساله‌ی ۳–۵ ماهه نر متعلق به فارم ابوریحان دانشگاه تهران نمونه گرفته شد. گوساله‌ها ۲۴–۱۲ ساعت قبل از جراحی از دسترسی آزاد به آب و غذا دور نگه داشته میشوند. دراین مطالعه، با استفاده از روش TESE، نمونه بیوپسی ۱×۱ سانتیمتر از بیضه گوساله‌ها گرفته شد و این نمونه‌ها داخل محیط کشت DMEM قرارداده شده و در عرض ۲ ساعت همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

جمع‌آوری سلول‌های زاینده و سرتولی

نمونه‌های بیوپسی پس از شستشو در محیط کشت DMEM حاوی اسیدهای آمینه ضروری، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، به صورت مکانیکی قطعه قطعه شدند. سپس برای هضم آنزیمی مرحله اول در محیط اصلاح شده DMEM حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تریپسین، ۱ میلی گرم در میلی‌لیتر هیالورونید از نوع II و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر DNase شناور شده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 37^{0C} انکوبه شدند. پس از طی این مرحله سه بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۳۰۰g سانتریفیوژ انجام شده و بعد از هر بار سانتریفیوژ محیط بالای رسوب سلولی با محیط DMEM تازه جایگزین شده و ماحصل این مرحله وارد مرحله دوم هضم آنزیمی می شود. در مرحله دوم هضم آنزیمی، قطعات لوله‌های اسپرم ساز در محیط DMEM حاوی کلاژناز، هیالورونیداز و DNase به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. در نهایت به منظور جداسازی جمعیت سلولی مورد نظر، تعلیق سلولی حاصل به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۳۰۰g سانتریفیوژ می‌شود. برای جدا کردن سلول‌های سرتولی از تعلیق سلولی حاصل از مرحله‌ی دوم هضم آنزیمی از روش Scarpino و همکاران استفاده شد(۱۵). در این روش از پتری دیش استریل حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر لکتین داچورا استرامونیوم آگلوتینین در بافر فسفات استفاده می شود و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در انتها سلول‌های سرتولی به کف پلیت چسبیده و سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی سلول‌های سرتولی هم کشتی داده شده و کلونی تشکیل می‌دهند.

گروه‌های آزمایشی

برای کشت، از محیط کشت DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)، پنی سیلین به میزان ۱۰۰IU/mL و ۱۰۰ mg/mL استرپتومایسین استفاده شد.

هورمون hCG به محیط هم‌کشتی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی اضافه گردیده وهرکدام ۵ بار تکرار گردیدند. سه گروه درمانی عبارتند از، گروه ۲، ۵ و ۱۰ که به ترتیب دوزهای ۲، ۵ و ۱۰ IU در میلی‌لیتر هر ۳ روز یکبار به هنگام تعویض محیط کشت سلول‌ها به آنها اضافه شد و یک گروه کنترل که در آن از هیچ هورمونی استفاده نشده است.

شناسایی سلول‌ها

برای شناسایی سلول‌های سرتولی از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی ویمنتین استفاده شده است. همچنین کلونی‌های اسپرماتوگونی بنیادی با روش ایمونوسیتوشیمی OCT-4 شناسایی شدند.

ارزیابی کلونی

کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ٤، ١٠، ١٤ و ١٧ از نظر تعداد و قطر کلونی‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی مدرج ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

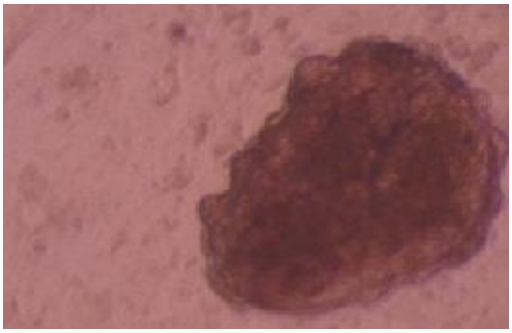
نتایج حاصل از حداقل ٥ بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد. برای آنالیز نتایج از روش آماری Anova یک طرفه و دانکن استفاده شد. $P < ٠/٠٥$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

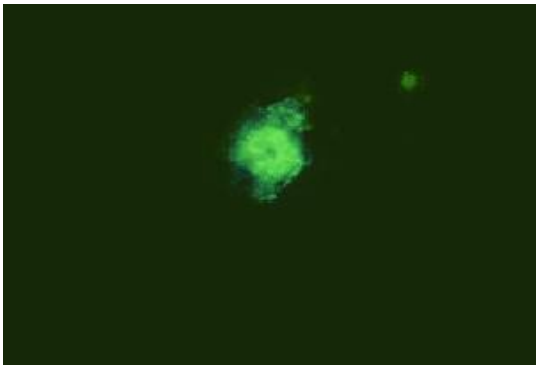
جمعیت سلولی از لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گوساله‌های ٥-٣ ماهه گرفته شده، اغلب شامل دو نوع سلول با ویژگی‌های ایمونوسیتوشیمیی مختلف است. اولین نوع آن تکثیر میشود و یک لایه سلولی را ایجاد می‌کند (نگاره ١) در حالیکه نوع دیگر آن بعد از تکثیریافتن کلونی‌هایی را به وجود می‌آورد (نگاره ٢).

نگاره ١ـ سلول‌های سرتولی گوساله. بزرگنمایی ٢٠٠X

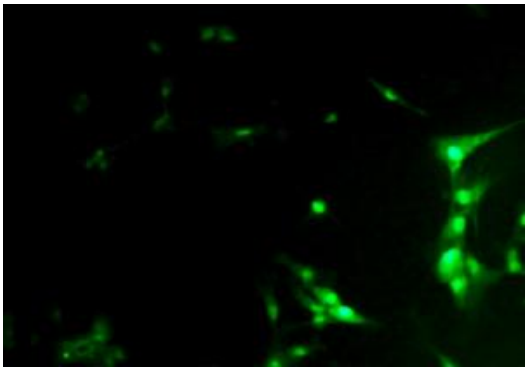
OCT-4 یک نشانگر ملکولی برای تشخیص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است (نگاره ٣). علاوه بر این ویمنتین که نشانگری برای سلول‌های سرتولی است در سلول‌های تک لایه تغذیه کننده مورد شناسایی قرار گرفت (نگاره ٤).



نگاره٢ـ کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی گوساله. بزرگنمایی ٢٠٠X



نگاره ٤ـ رنگ‌آمیزی کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی با آنتی oct-4

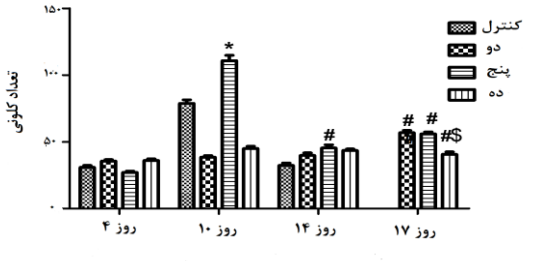


نگاره ٤ـ رنگ‌آمیزی سلول‌های سرتولی با آنتی ویمنتین کونژوکه

تاثیر hCG بر قطر و تعداد کلونی

اختلاف معنی‌داری در تعداد کلونی‌ها تا روز ١٠ هم‌کشتی بین گروه‌های مختلف دیده نشد. اما تعداد کلونی‌ها در گروه ٥ درمانی در روز ١٠ به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها بیشتر بود. در روز ١٤ تعداد کلونی در گروه ٥ درمانی از سایر گروه‌ها بیشتر بود ولی تنها این اختلاف با گروه کنترل معنی‌دار بود. در

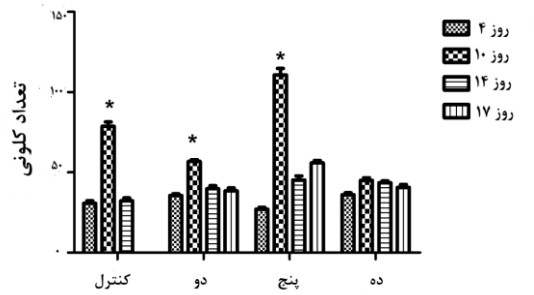
روز ۱۷ در گروه کنترل هیچ کلونی مشاهده نشد (P<۰/۰۵ ؛ نمودار۱).



نمودار ۱ـ مقایسه تعداد کلونی میان گروه کنترل و گروه‌های درمانی در یک زمان.

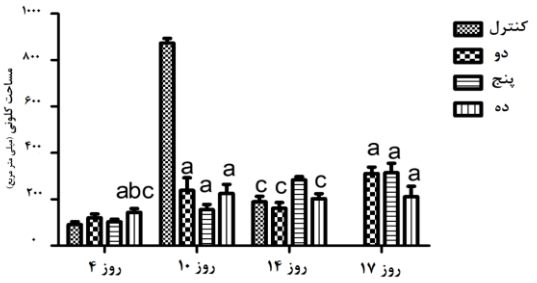
* نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با سایر گروه‌ها، # نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با گروه کنترل و c نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با گروه دو و پنج توسط آزمون آنووا یک طرفه و دانکن می‌باشد (P<۰/۰۱). داده‌ها بر اساس انحراف معیار ارائه شده است.

در روز ۱۰ هم‌کشتی در همه‌ی گروه‌ها به جز گروه ۱۰ درمانی تعداد کلونی‌ها به طور مشخص بیشتر از سایر روزها بود. روند کاهشی در تعداد کلونی‌ها در گروه‌های دو و پنج درمانی و در گروه کنترل دیده شد (P <۰/۰۵ ؛ نمودار۲). در روز ٤ گروه ۱۰ بیشترین قطر را نشان داد. گروه کنترل بیشترین قطر کلونی را در روز ۱۰ نشان داده، اما در روز ١٤ کشت گروه ۵ درمانی بیشترین قطرکلونی را دارد و در روز ۱۷ در گروه کنترل هیچ کلونی دیده نشد (نمودار ۳؛P <۰/۰۵).



نمودار ۲ـ مقایسه تعداد کلنی‌ها در روزهای مختلف (٤، ۱۰، ١٤ و ۱۷) در یک گروه.

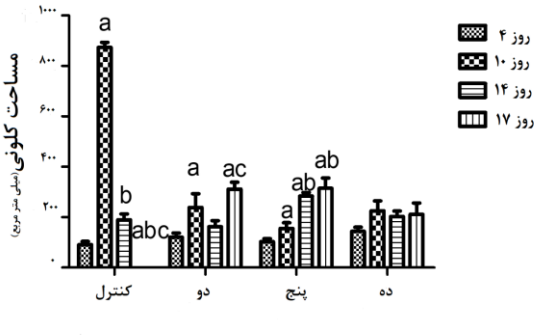
*نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با سایر گروه‌ها توسط آزمون آنوا یک طرفه و دانکن می باشد (P<۰/۰۰۱). داده‌ها بر اساس انحراف معیار ارائه شده است.



نمودار ۳ـ مقایسه سطح کلنی ها (میلی متر مربع) بین گروه‌های کنترل و آزمایشی در یک زمان.

a نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با گروه کنترل (P<۰/۰۵)، bنشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با گروه دو (P<۰/۰۱) وc نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با گروه پنج (P<۰/۰۱) توسط آزمون آنوا یک طرفه و دانکن می باشد. داده‌ها بر اساس انحراف معیار ارائه شده است.

تغییرات قطر کلونی در گروه‌های درمانی به ویژه در گروه ۲ و ۵ روند افزایشی را نشان داده است، اما در گروه کنترل روند کاهشی مشاهده شد (نمودار ٤؛P <۰/۰۵).



نمودار ٤ـ مقایسه مساحت کلونی‌ها (میلی‌متر مربع) میان گروه کنترل و گروه‌های درمانی در روزهای مختلف (٤، ۱۰، ١٤ و ۱۷).

a نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با روز ٤، b نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با روز ۷، c نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار با روز ۱۰ توسط آزمون آنوا یک طرفه و دانکن می‌باشد(P<۰/۰۰۱). داده‌ها بر اساس میانگین انحراف معیار ارائه شده است.

بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که هورمون hCG روند تکثیر و تمایز را در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی القا می‌کند. در این تحقیق سلول‌ها از لوله‌های اسپرم‌ساز گوساله‌های ۵-۳ ماهه جدا شده است. زیرا اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گوساله‌ها شامل دو نوع سلولی متمایز است: سلول بنیادی اسپرماتوگونی نوع A و سلول‌های سرتولی. مناسبترین سن گوساله‌ها برای جداسازی نوع A اسپرماتوگونی ۳-۵ ماه است. اغلب بخش‌های لوله شامل سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A بودند و این بیضه بهترین منبع برای جداسازی این نوع از سلول‌های اسپرماتوگونی است. جمعیت خالص شده سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A با خلوص نهایی ۷۵٪ می‌تواند به طور معمول جداسازی شوند. بازیابی سلولی حدود ۱×۱۰۶ اسپرماتوگونی نوع A در هر گرم از بیضه بود و قابلیت زنده مانی سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده همیشه بیش از ۸۰٪ بود (۹). سلول‌های نابالغ سرتولی قابلیت تکثیر دارند، بنابراین تعداد نهایی سلول‌های سرتولی قبل از بلوغ آن‌ها تعین می‌شوند (۱۱ و ۷). شاخص اختصاصی جداسازی سلول‌های سرتولی رنک‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیی ویمنتین است (۱). برای تایید وجود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شاخص OCT-4 در سلول‌های کلونی شناسایی شد. سلول‌های تمایزنیافته‌ی SCC نوع A، OCT-4 را بیان می کنند (۱۶). در این پژوهش دو نوع سلول با ویژگی‌های ایمونوسیتوشیمی متمایز، مشابه سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی نوع A جدا شد.

درگروه‌های درمانی، تعداد کلونی‌ها بیشتر از گروه کنترل بود. بنابراین، سلول‌های بنیادی تکثیر شونده می‌توانند کلونی‌ها را ایجاد کنند و مسیر تکثیر را انتخاب کنند. این مسیر می تواند توسط فاکتورهای رشد ترشح شده از سلول‌های سرتولی ایجاد شود. به دلیل شباهت ساختاری FSH و hCG، هورمون hCG می‌تواند به گیرنده‌های سلول‌های سرتولی متصل شود و اثری مشابه FSH بر آن‌ها بگذارد. هورمون FSH در شرایط *in vitro* و *in vivo* محرک تکثیر سلول‌های سرتولی است (۳). مهمترین عامل رشد میتوزی برای سلول‌های سرتولی محسوب می شود (۱۳). به‌دنبال تحریک سلول‌های سرتولی فاکتورهای رشدی از آن‌ها ترشح می شوند که تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A را تحریک می‌کند(٤). Tajik و همکاران در مطالعه ای (١٦) نشان دادند که هورمون FSH اثر تکثیری بر سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی دارد و سبب افزایش تعداد کلونی‌های SSCطی هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که هورمون hCG نه تنها تعداد کلونی‌های SSC را افزایش می دهد بلکه قطر کلونی‌ها را نیز افزایش می‌دهد. بنابراین این هورمون هم اثر تمایزی و هم اثر تکثیری بر سلول‌های اسپرماتوگونی دارد. از آن جایی که تستوسترون از سلول‌های لیدیک تحت اثر LH ترشح می‌شود، و hCG نسبت به سایر گنادوتروپین‌ها شباهت بیشتری از نظر فعالیت به LH دارد، بنابراین، محتمل است که این ارتباط دلیل اثر تمایزی hCG باشد. در مجموع، این مطالعه نشان داد که هورمون hCG، که تعداد زیادی از کلونی‌ها را با قطر زیاد ایجاد می‌کند، می‌تواند به عنوان فاکتوری مناسب برای تشکیل و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی در شرایط *in vitro* باشد.

تشکر و سپاسگزاری

ضمن تشکر ویژه از فارم ابوریحان دانشگاه تهران، این پروژه با حمایت مالی دانشگاه سمنان از نویسنده اول مقاله جهت انجام پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای انجام شد.

فهرست منابع

1. Anway, M.D., Folmer, J., Wright, W.W., Zirkin, B.R. (2003): Isolation of Sertoli Cells from Adult Rat Testes: An Approach to Ex Vivo Studies of Sertoli Cell Function. Biol. Reprod. 68: 996-1002.
2. Baarends, W., Grootegoed, J., 1999. Molecular biology of male gametogenesis. Molecular biology in reproductive medicine. New York, USA: Parthenon Publishing Group, 271-295.

3. De Franca LR, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L. (2005): Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. Theriogenology 63: 300-318.
4. De Franca LR, L.R., Silva, V.A., Chiarini-Garcia, H.l., Garcia, S.K., Debeljuk, L. (2000): Cell Proliferation and Hormonal Changes During Postnatal Development of the Testis in the Pig. Biol. Reprod. 6: 1629-1636.
5. Dym, M., Cavicchia, J.C. (1977): Further Observations on the Blood-Testis Barrier in Monkeys. Biol. Reprod. 17: 390-403.
6. Enders, G.C., May Ii, J.J. (1994): Developmentally Regulated Expression of a Mouse Germ Cell Nuclear Antigen Examined from Embryonic Day 11 to Adult in Male and Female Mice. Develop. Biol. 163: 331-340.
7. Izadyar, F., Matthijs-Rijsenbilt, J.J., Ouden, K.D., Creemers, L.B., Woelders, H., de Rooij, D.G. (2002): Development of a Cryopreservation Protocol for Type A Spermatogonia. J. Androl. 23: 537-545.
8. Kojima, Y., Kominami, K., Dohmae, K., Nonomura, N., Miki, T., Okuyama, A., Nishimune, Y., Okabe, M. (1997). Cessation of Spermatogenesis in Juvenile Spermatogonia! Depletion (jsd/jsd) Mice. Inter. J. Urol. 4: 500-507.
9. Kubota, H., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (2004): Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proceedings of the Nation. Acad. Sci. U. S. A. 101: 16489-16494.
10. Kumar, T.R (2005). What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? Reproduction. 130: 293-302.
11. Lamb, D.J., Spotts, G.S., Shubhada, S., Baker, K.R. (1991): Partial characterization of a unique mitogenic activity secreted by rat Sertoli cells. Mol. Cell. Endocrinol. 79: 1-12.
12. McLean, D.J., Russell, L.D., Griswold, M.D. (2002): Biological Activity and Enrichment of Spermatogonial Stem Cells in Vitamin A-Deficient and Hyperthermia-Exposed Testes from Mice Based on Colonization Following Germ Cell Transplantation. Biol. Reprod. 66: 1374-1379.
13. Meehan, T., Schlatt, S., O'Bryan, M.K., de Kretser, D.M., Loveland, K.L. (2000): Regulation of Germ Cell and Sertoli Cell Development by Activin ,Follistatin, and FSH. Develop. Biol. 220: 225-237.
14. Pierce, J.G., Parsons, T.F. (1981): Glycoprotein hormones: structure and function. Ann. Rev. Bioch. 50: 465-495.
15. Scarpino, S., Morena, A.R., Petersen, C., Fröysa, B., Söder, O., Boitani, C. (1998): A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. Mol. Cell. Endocrinol. 146(1): 121-7.
16. Tajik, P., Sani, R.N., Moezifar, M., Yousefi, M., Movahedin, M., Qasemi-Panahi, B., Shafiei, S., Fili, P.R. (2014): Effect of follicle-stimulating hormone and testosterone on colony formation of bovine spermatogonial stem cell. Comp. Clin. Pathol. 23: 901-906.
17. Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T. (1991): Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. Development 113: 689-699.