بررسی کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده بره قزل پس از هم کشتی با سلول‌های سرتولی

معین زرگرزاده[۱]، پرویز تاجیک*[۲]، منصوره موحدین[۳]، قاسم اکبری[۲]، بابک قاسمی‌پناهی[٤]

چکیده

اسپرماتوژنز فرآیندی پیچیده، هماهنگ و وابسته به سلول‌های بنیادی به نام سلول‌های اسپرماتوگونی است. تحقیقات محدودی بر روی کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند صورت گرفته است. در این بررسی ۵-۳ نمونه بافتی اتوپسی شده از بیضه بره‌های نر ۲ ماهه نژاد قزل پس از دو مرحله هضم آنزیمی، به چهار گروه تقسیم گردید: گروه ۱: همکشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی فریز شده روز صفر پس از ذوب به مدت ۱۰ روز، گروه ۲: همکشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی فریز شده در روز چهاردهم کشت پس از ذوب به مدت ۱۰ روز، گروه ۳: ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی فریز شده ی روز صفر و کشت به مدت ۱۰ روز، گروه ٤: ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی فریز شده در روز چهاردهم کشت و کشت به مدت ۱۰ روز و گروه کنترل: همکشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی تازه روز صفر به مدت چهارده روز. میزان کلونی‌زایی و قطر کلونی‌ها در طول این ده روز مورد ارزیابی قرار گرفت. در گروه‌های ۳ و ٤ هیچ کلونی دیده نشد اما در گروه ۱ میزان کلونی‌زایی بالاتری از گروه ۲ مشاهده گردید ($P<0.05$). می‌توان نتیجه گرفت انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند راهی مناسب برای حفظ طولانی مدت آنها است و این سلول‌ها پس از ذوب توان کلونی‌زایی خود در محیط آزمایشگاه را حفظ می‌کنند. بهترین زمان برای انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند، روز صفر بعد از هضم آنزیمی است و کشت این سلول‌ها پیش از انجماد باعث کاهش قدرت کلونی‌زایی آنها می‌گردد.

واژگان کلیدی: *سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، گوسفند، هم کشتی سلول‌های سرتولی، کلونی‌زایی*

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۹

مقدمه

اسپرماتوژنز یک فرایند پیچیده و هماهنگ است که وابسته به سلول‌های بنیادی بالغی به نام سلول‌های اسپرماتوگونی است که در لوله‌های اسپرم‌ساز انجام می‌شود. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بوسیله توانایی آن‌ها برای خودسازی (self-renewal) و توانایی تولید سلول‌های تمایز یافته دیگر مشخص می‌شوند که تولید روزانه هزاران اسپرماتوزوا را در تمام طول زندگی موجود نر ممکن می‌سازد (۸).

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) سلول‌های زایای ویژه‌ای هستند که دارای دو توانایی می‌باشند هم قابلیت تکثیر دارند و هم می‌توانند به سلول‌های بنیادی تمایز یافته پیش ساز اسپرم تبدیل شوند و باعث انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد شوند. سلول‌های اسپرماتوگونی از سلول‌های جنسی اولیه (Primordial Germ Cells) منشا می گیرند. این سلول‌ها خود در روز هفتم جنینی از اپی بلاست جنینی منشاء گرفته اند و با مهاجرت به سمت طناب‌های جنسی (Genital ridge) تکثیر پیدا می کنند و در روزهای آخر جنینی به سلول‌های گونوسیت تبدیل می‌شوند. گونوسیت‌ها از لحاظ فعالیت میتوزی تا زمان تولد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شوند، غیرفعال هستند (۸).

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برای حفظ توانایی‌های خود احتیاج به قرار گرفتن در محیط خاص خود را دارند. کنام سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Niche) محیطی در طول غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز است و از سلول‌های سرتولی، سلول‌های لیدیگ و سلول‌های میوئیدی در فضای بینابینی بین لوله‌ها حضور دارد تشکیل شده است (٤).

مطالعات روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بسیار پیچیده است چون این سلول‌ها در تعداد بسیار اندک بوده و مشخصات شناسایی منحصر به فرد و خاصی از آنها تا به امروز گزارش نشده است(۱). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها سلول‌های

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، دانشجوی دکترای تخصصی مامایی دامپزشکی، تهران، ایران
۲*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، گروه مامایی، تهران، ایران ptajik@ut.ac.ir
۳- استاد دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، تهران، ایران
٤- استادیار دانشگاه تبریز، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، تبریز، ایران

بدن هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند(۷)، در نتیجه منبع ارزشمند برای آزمایشات بیولوژیکی و تحقیقات پزشکی می‌باشند (۳ و ۲).

کشت و تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به گونه ای که قابلیت های بالقوه و بالفعل آن حفظ گردد، ابزار کلیدی جهت دستیابی به توانایی های کاربردی ویژه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌باشد.

تاکنون سیستم هم کشتی که بتواند به شکل دراز مدت، تمایز و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی را حمایت کند وجود ندارد (٦) و تلاش های انجام شده برای کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه هم خیلی موفق نبوده است زیرا روش های خالص سازی سلول‌های بیضه موفقیت زیادی نداشتند، علاوه بر این، اطلاعات زیادی در مورد چگونگی تنظیم تقسیم و تمایز این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه وجود ندارد(۵). طی ۱۰ سال گذشته همه مطالعاتی که نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در محیط آزمایشگاه گزارش کرده‌اند در یک استراتژی مشترک بوده اند و آن هم، هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با یک لایه سلول تغذیه کننده بوده است (۱۱ و ۵). Nagano و همکارانش سیستم هم کشتی را به کمک رده سلولی مشتق از فیبروبلاست (STO) انجام دادند و نشان دادند که به کمک این لایه تغذیه کننده، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش می‌توانند مدت زیادی زنده بمانند (۱۲). این در حالی بود که محمدی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که هم کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی نسبت به هم کشتی با سلول‌های (STO)، تاثیر بیشتری بر کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی دارد (۱۰). در سال ۲۰۰۱ عده ای از پژوهشگران توانستند اسپرماتوگونی نوع A را در حضور سرم و هم کشتی با سلول‌های سرتولی به مدت یک ماه زنده نگه دارند. این روش های کشت هر چند سلول‌ها را زنده نگه داشت اما این سلول‌ها در طی این مدت هیچ تکثیری از خود نشان ندادند (۱۳). در مطالعه Koruji و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید هم کشتی کوتاه مدت سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ با سلول‌های سرتولی دارای افزایش معنی داری در تعداد و قطر کلونی‌های حاصله در مقایسه با گروه‌های درمانی با فاکتور های رشد (GDNF و SCF) مشاهده گردید. آنها همچنین دریافتند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ در کلونی‌های حاصل از هم کشتی با سلول‌های سرتولی پس از پیوند توانایی القاء اسپرماتوژنز در بیضه موش های گیرنده را دارا می‌باشند (۹). با توجه به اهمیت گونه پستاندار گوسفند به عنوان مدل تراریخت و نیز با توجه به عدم وجود مطالعات قبلی در زمینه کشت آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی این گونه، مطالعه حاضر به بررسی اثر شرایط همکشتی و میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند می پردازد. این مطالعه به بررسی کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد ـ ذوب شده گوسفند نژاد قزل پس از هم کشتی با سلول‌های سرتولی می‌پردازد.

مواد و روش کار

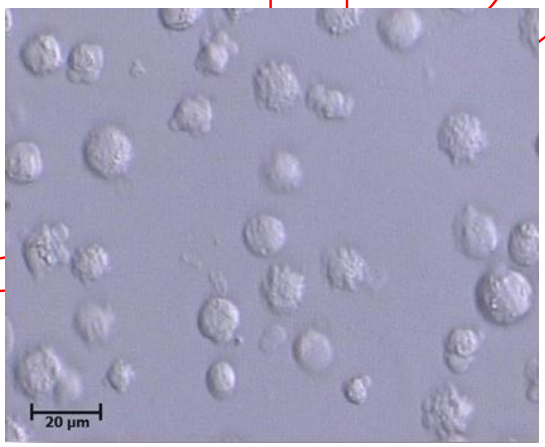
استخراج سلول‌های بیضه

۵-۳ نمونه بافتی اتوپسی شده از بیضه بره‌های نر ۲ ماهه نژاد قزل کشتار شده در کشتارگاه دریافت گردید. این نمونه‌ها در داخل محیط کشت (DMEM) (جدول ۱) در عرض ۲ ساعت، همراه با یخ، به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشو در محیط کشت (DMEM) حاوی اسیدآمینه‌های غیرضروری، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و ٤٠ میلی‌گرم بر میلی لیتر جنتامایسین، بدون وجود سرم ابتدا هضم مکانیکی نمونه بیضه صورت گرفته و سپس در محیط کشت (DMEM) حاوی ۱(mg/ml) هیالورونیداز، ۱(mg/ml) کلاژناز، ۱(mg/ml) تریپسین و ۵(µg/ml) (DNase) به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد و طی این مدت هر ۱۰ دقیقه یک بار به

آرامی توسط سمپلر تکان داده شد. پس از طی این مرحله، به منظور حذف بافت‌های بینابینی، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های اسپرم‌ساز سه بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با دور (rpm)۲۰۰۰ –۱۵۰۰ در دمای ٤ درجه سانتریفیوژ گردید و بعد از هر بار سانتریفیوژ محیط بالای رسوب سلولی با محیط (DMEM) تازه جایگزین شد. قطعات لوله‌های اسپرم‌ساز حاصل از اولین مرحله هضم آنزیمی، جهت هضم بیشتر و جدا کردن سلول‌ها از قطعات لوله‌های اسپرم‌ساز، در محیطی مشابه مرحله اول به مدت ٤٥ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و تا حد امکان جداسازی شد. به منظور خالص سازی بیشتر تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی از صفحات جداسازی (mesh, 70µm) استفاده گردید(نگاره ۱).

جدول ۱ـ مواد لازم برای ساخت محیط کشت (DMEM)

ردیف	نام ماده	مقدار	شرکت سازنده
۱	پودر (DMEM)	۱/۳٤۸ گرم در (ml)۹۷ آب ٤ بار تقطیر	(Gibco, UK)
۲	بی کربنات سدیم	۱/۳۷ گرم در (ml)۱۰۰ محیط کشت	(Sigma, USA)
۳	آمینواسیدهای غیرضروری	(µl) ۱۰۰۰ در (ml)۱۰۰ محیط کشت	(Gibco, UK)
٤	پنی سیلین	۱۰۰ (IU/ml)	(Gibco, UK)
٥	استرپتومایسین	۱۰۰ (µg/ml)	(Gibco, UK)
٦	گلوتامکس	(µl) ۱۰۰۰ در (ml) ۱۰۰ محیط کشت	(Gibco, UK)



نگاره ۱ـ تعلیق سلولی حاصل از هضم آنزیمی، شامل سلول‌های اسپرماتوگونی وسرتولی

انجماد سلول‌های بیضه

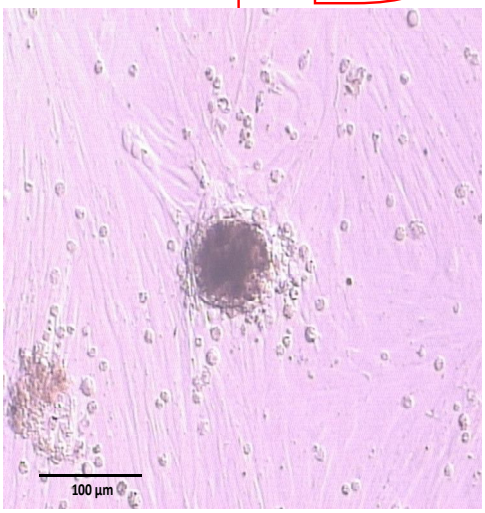
انجماد با ترکیب ۱۰٪ (DMSO) + ۹۰٪ (FBS) و با روش انجماد آهسته (۲ساعت در ٤درجه، ٤ساعت در ۲۰– درجه، ۳ دقیقه در بخار ازت، و سپس انتقال به تانک ازت) انجام گردید.

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

گروه‌های مورد مطالعه، به چهار گروه آزمون و یک گروه کنترل تقسیم شدند: گروه آزمون ۱: هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی فریز شده ی روز صفر پس از ذوب به مدت ۱۰ روز، گروه آزمون ۲: هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی فریز شده در روز چهاردهم کشت پس از ذوب به مدت ۱۰ روز، گروه آزمون ۳: ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی فریز شده ی روز صفر و کشت به مدت ۱۰ روز، گروه آزمون ٤: ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی فریز شده در روز چهاردهم کشت و کشت به مدت ۱۰ روز و گروه کنترل: هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی تازه روز صفر به مدت چهارده روز.

بعد از یک ماه هر دو گروه یخ زدایی شده و در دو گروه، یک گروه مستقیم با سلول‌های سرتولی و یک گروه بدون هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و به صورت خالص کشت

داده شد. برای تخلیص سلول‌های اسپرماتوگونی از روش Differential Plating استفاده گردید. بدین ترتیب که سلول‌های اولیه به مدت ٤-٢ ساعت بر روی پلیت کد شده با ژلاتین ریخته شدند و پس از اتصال سلول‌های سوماتیک سلول‌های معلق در محیط کشت به پلیت کد شده دیگری منتقل گشتند، این بار پس از گذشت ٤-٣ ساعت سلول‌های معلق جداسازی شده و به عنوان پلیت خالص کشت داده شدند. کشت هر دو گروه به مدت ١٠ روز در پلیت‌های ٣cm^2 ، در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد و میزان ٥٪ CO_2، انجام گردید. بعد از ٥-٤ روز سلول‌ها پاساژ داده شد و به طور مساوی به دو پلیت ٣ cm^2 منتقل گردید. سلول‌های تکثیر شده پس از گذشت این مدت از نظر کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند(نگاره ٢). نتایج حاصل از مطالعه با روش آماری Anova با کمک نرم افزار (SPSS) بررسی گردید(مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار برای ٣ بار تکرار در هر گروه ارائه شده است).



نگاره ٢ـ مورفولوژی یک کلونی به دست آمده از همکشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی

ارزیابی ایمنوسیتوشیمی

جهت تعیین ماهیت کلونی‌ها، از آنتی بادی (PLZF) به عنوان نشانگر سلول‌های اسپرماتوگونی استفاده شد. پس از فیکس کردن نمونه‌ها با پارافرمالدهید ٤٪، نفوذ پذیر کردن با تریتون ٠/٢٪ (100X-Sigma) و بلاک کردن گیرنده‌های غیر اختصاصی با سرم بز ١٠٪ (Sigma)، سلول‌ها به مدت ١٨-١٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد با آنتی‌بادی‌های PLZF (Anti-mouse antibody-Sigma) با رقت ١:١٠٠ مجاورت داده شدند. پس از شستشو با (PBS)، آنتی‌بادی ثانویه، (goat anti mouse) نشان‌دار شده با ایزوتیوسیانات فلورسنت (FITC) با رقت ١:١٠٠ برای PLZF به مدت ٢ ساعت انکوبه گردید. از نمونه های رنگ شده به کمک میکروسکوپ فلوروسنت عکسبرداری شد.

نتایج

انجماد زدایی سلول‌های بیضه

میزان زنده مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلولی در گروه‌های مختلف پس یخ زدایی محاسبه گردید(جدول ٢). میزان زنده مانی بالای ٧٠٪ در همه گروه‌ها پس از ذوب قابل مشاهده بود.

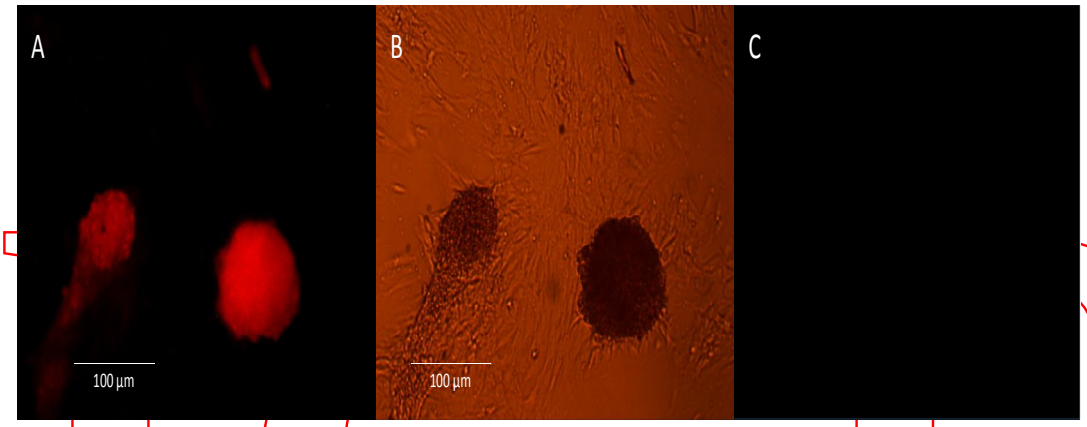
جدول ٢- میزان زنده مانی سلول‌های بیضه منجمد شده در روز صفر و ١٤ کشت پس از یخ زدایی

نمونه بیضه	زمان انجماد	متوسط تعداد سلول‌ها	درصد زنده‌مانی
	روز صفر	٥٤ ١٠^{٤}	٨٥٪
١	١٤ روز پس از کشت	٥٢ ١٠^{٤}	٧٤٪
	روز صفر	٤٩ ١٠^{٤}	٧٧٪
٢	١٤ روز پس از کشت	٥٠ ١٠^{٤}	٨٥٪
	روز صفر	٥٢ ١٠^{٤}	٧٩٪
٣	١٤ روز پس از کشت	٥١ ١٠^{٤}	٨٣٪
	روز صفر	٥٢ ١٠^{٤}	٧٨٪
٤	١٤ روز پس از کشت	٤٨ ١٠^{٤}	٨٤٪
	روز صفر	٥٢ ١٠^{٤}	٩٠٪
٥	١٤ روز پس از کشت	٥١ ١٠^{٤}	٨٣٪

ارزیابی‌های ایمنوسیتوشیمی

بررسی نشانگرهای اختصاصی PLZF برای سلول‌های اسپرماتوگونی

برای حصول اطمینان از ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده، از نشانگرهای اختصاصی (PLZF) استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی ها نشان داد که نشانگر های PLZF به طور بارز و مشخص در سلول‌های اسپرماتوگونی بیان و در نتیجه ماهیت این سلول‌ها تثبیت شد (نگاره۳).



نگاره ۳ـ بیان نشانگر (PLZF) در کلونی‌های به دست آمده (A). نگاره‌های (B) و (C) به ترتیب تصاویر فاز و کنترل منفی هستند.

- نتایج کلونی‌زایی گروه‌های مورد مطالعه

در گروه کشت خالص سلول‌های اسپرماتوگونی (گروه‌های آزمون ۳ و ٤) هیچ کلونی در هیچ یک از تکرار ها دیده نشد اما در گروه‌های هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی کلونی اسپرماتوگونی مشاهده گردید که از لحاظ قطر و تعداد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعداد کلونی‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

در مقایسه تعداد کلونی‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، بیشترین تعداد کلونی در گروه آزمون ۱ و کمترین میزان در گروه‌های آزمون ۳ و ٤ دیده شد. در مقایسه تعداد کلونی‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، گروه آزمون ۱ اختلاف معنی داری با سایر گروه‌های مورد مطالعه دارد. همچنین در گروه‌های آزمون ۲، ۳ و ٤ نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۳ـ مقایسه تعداد کلونی در گروه‌های مختلف

گروه	روز پنجم	روز دهم
آزمون ۱	٢٤/٦٧ ± ٤/٥^{a,b,c}	٢١/٣٣ ± ٣/٧^{a,b,c}
آزمون ۲	٦/٦٧ ± ٢/٥^{d}	٢/٣٣ ± ١/٥^{d}
آزمون ۳	٠٠/٠٠ ± ٠/٠^{d}	٠٠/٠٠ ± ٠/٠^{d}
آزمون ٤	٠٠/٠٠ ± ٠/٠^{d}	٠٠/٠٠ ± ٠/٠^{d}
کنترل	٢٦/٣٣ ± ٣/٥	٢٢/٦٧ ± ٢/٨

مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار برای ۳ بار تکرار در هر گروه ارائه شده است.

a: در مقایسه با گروه آزمون ۲ در همان ستون از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۵).

b: در مقایسه با گروه آزمون ۳ در همان ستون از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۵).

c: در مقایسه با گروه آزمون ٤ در همان ستون از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۵).

d: در مقایسه با گروه کنترل در همان ستون از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۵).

قطر کلونی‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

در مقایسه قطر کلونی‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، گروه آزمون ۱ در مقایسه با گروه‌های مورد مطالعه بیشترین قطر و گروه آزمون ۳ و ٤ کمترین میزان قطر کلونی را دارند. در مقایسه قطر کلونی‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، اختلاف معنی داری میان گروه آزمون ۱ و ۲، نسبت به گروه‌های آزمون ۳، ٤ و کنترل وجود داشت (جدول ٤).

جدول ٤ـ مقایسه قطر کلونی‌ها (µm) در گروه‌های مختلف

گروه	روز پنجم	روز دهم
آزمون ۱	۷۲/۷۱ ± ۱/۳^{b,c,d}	٦٥/٣٧ ± ٢/٩^{b,c,d}
آزمون ۲	٦٧/١٤ ± ٤/٨^{b,c,d}	٥٩/٠٤ ± ٢/٦^{b,c,d}
آزمون ۳	۰۰/۰۰ ± ۰/۰^{d}	۰۰/۰۰ ± ۰/۰^{d}
آزمون ٤	۰۰/۰۰ ± ۰/۰^{d}	۰۰/۰۰ ± ۰/۰^{d}
کنترل	۹۲/۳۲ ± ٥/٨	۸۲/٦۷ ± ٦/۷

مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار برای ۳ بار تکرار در هر گروه ارائه شده است.

a: در مقایسه با گروه آزمون ۲ در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰٥).

b: در مقایسه با گروه آزمون ۳ در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰٥).

c: در مقایسه با گروه آزمون ٤ در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰٥).

d: در مقایسه با گروه کنترل در همان ستون از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰٥).

بحث

مطالعات اندکی پیرامون کشت و بررسی ویژگی‌ها و نشانگرهای سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند انجام شده است. نتایج حاصل از انجماد و ذوب سلول‌های بیضه گوسفند به روش ایزدیار نشان داد که این روش، روشی مناسب برای انجماد سلول‌های بیضه گوسفند است. قدرت زنده مانی بالا (بالای ۷۰٪) و همچنین حفظ خاصیت تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌ها پس از ذوب نشان دهنده کارا بودن این نوع روش انجماد در گوسفند است.

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه نیازمند شرایط خاصی است. در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش در آزمایشگاه یا بر روی لایه ی غذا دهنده که تمایز آنها را مهار می کند، انجام می‌گردد و یا به صورت خالص با اضافه نمودن فاکتور های رشدی مانند GDNF انجام گیرد (۷). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که کشت خالص سلول‌های اسپرماتوگونی بره در محیط کشت فاقد فاکتور های رشد (گروه‌های ۳ و ٤) به تکثیر و ایجاد کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی منجر نگردید. در صورتی که در همه گروه‌های هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی، کلونی‌زایی اتفاق افتاد. این موضوع تایید کننده نقش تغذیه ای و حمایتی سلول‌های سرتولی بر روی تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه است. این نتایج با مطالعه دیگری که هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی موش را ارزیابی کرده بود نیز تطابق داشت. در آن تحقیق سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی را از موش های ۱۵-۱٤ روزه جدا کردند و با هم کشت دادند. بعد از ۲٤ ساعت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شروع به تکثیر و تمایز کردند(۱٤). همچنین مطالعه Koruji و همکارانش نیز تاثیر سلول‌های سرتولی بر کشت سلول‌های اسپرماتوگونی موش را نشان داد. آن ها دریافتند هم کشتی کوتاه مدت سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ با سلول‌های سرتولی دارای افزایش معنی داری در تعداد و قطر کلونی‌های حاصل در مقایسه با گروه‌های درمانی با فاکتور های رشد (GDNF و SCF) است و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ در کلونی‌های حاصل از هم کشتی با سلول‌های سرتولی پس از پیوند توانایی القاء اسپرماتوژنز در بیضه موش های گیرنده را دارا می‌باشند(۹). همچنین در مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو مشاهده شد که وجود سلول‌های سوماتیکی بیضه (سلول‌های سرتولی، سلول‌های میوئید و اندکی سلول‌های

لیدیک) برای رشد مناسب سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت ضروری است(۱).

در گروه آزمون ۱ (هم کشتی ۱۰ روزه سلول‌های منجمد–ذوب شده روز صفر) میزان کلونی‌زایی بالاتر از گروه آزمون ۲ (هم کشتی ۱۰ روزه سلول‌های منجمد–ذوب شده روز چهارده کشت) بود ($P<۰/۰۵$). این موضوع می‌تواند ناشی از تمایز یافتن سلول‌های اسپرماتوگونی و یا کاهش قدرت کلونی‌زایی آنها با افزایش مدت زمان کشت باشد. اما قطر کلونی‌های گروه‌های آزمون ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، که بیانگر این موضوع است که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی باقی مانده پس از ۱٤ روز کشت، توانایی کلونی‌زایی مشابهی با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روز صفر را دارا می‌باشد. از آنجا که اختلاف معنی‌داری میان کلونی‌زایی گروه آزمون ۱ و گروه کنترل وجود نداشت، بهترین زمان برای انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی روز صفر می‌باشد و کشت دو هفته‌ای این سلول‌ها باعث کاهش قدرت کلونی‌زایی و تکثیر آنها می‌گردد.

تشکر و سپاسگزاری

با سپاس فراوان از خانم دکتر زهره مظاهری دانشجوی فرا دکترای دانشگاه تربیت مدرس بخش علوم تشریح که کمک شایانی در انجام این تحقیق نمودند. پژوهش حاضر با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به انجام رسیده است.

REFERENCES

1- Aponte, P., Soda, T., Teerds, K., Mizrak, S.C., Van de Kant, H., De Rooij, D.G. (2008): Propagation of Bovine Spermatogonial Stem Cells In Vitro. Reproduction. 136:543-557.

2- Bart, T., Kathrin, G., Kyle, E. (2010): Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Phil. Trans. R. Soc. 365:1663-1678.

3- Brinster, R.L., Nagano, M. (1998): Spermatogonial Stem Cell transplantation, cryopreservation and culture. Semin. Cell. Dev. Biol. 9:401-409.

4- De Rooij, D. G. (2001): Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction. 121(3):347-54.

5- Hasthorpe, S. (2003): Clonogenic culture of normal spermatogonia: in vitro regulation of post natal germ cell proliferation. Biol. Repord. 68(4):1354-60.

6- Izadyar, F., Den ouden, K., Creemers, L.B., Posthuma, G., Parvinen, M., De Rooij, D.G. (2003): Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. Biol. Repord. 68(1):272-81.

7- Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, Sh., Ogura, A., Shinohara, T. (2005): Long-Term Culture of Mouse Male Germline Stem Cells Under Serum or Feeder-Free Conditions. Biol. Repord. 72: 985-991.

8- Khaira, H., Mclean, D., Ohl, D. A., Smith, G. D. (2005): Spermatogonial stem cell isolation, storage, and transplantation. J. Androl. 26(4):442-50.

9- Koruji, M., Movahedin, M., Mowla, S.J., Gourabi, H., Arfaee, A.J. (2009): Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal. 45:281-289.

10- Mohamadi, S.M., Movahedin, M., Asghari Jafarabadi, M., Makoolati, Z. (2012): Comparison of colony formation in adult mouse spermatogonial stem cells developed in Sertoli and STO coculture systems. Andrologia. 44:431-437.

11- Nagano, M., Avarbock, M.R., Leonida, E.B., Brinster, C.J., Brinster, R.L. (1998): Culture of mouse spermatogonial stem cell. Tissue Cell. 30(4):389-97.

12- Nagano, M., Ryu, B.Y., Brinster, C.J., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (2003): Maintenace of mouse male germ line stem cell in vitro. Biol. Repord. 68(6):2207-14.
13- Van der Wee, K.S., Johnson, E.W., Dirami, G., Dym, T.M., Hoffman, M.C. (2001): Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. J. Androl. 22(4):696-704.
14- Zhang, D.Y., He, D.W., Wei, G.H., Song, H.F., In, T. (2008): Long-term coculture of spermatogonial stem cells on sertoli cells feeder layer in vitro. J. Sichuan Uni. 39(1):6-9.

JCP