دانشگاه تبریز

دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه

برای دریافت درجه‌ی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

عنوان:

مطالعه اثرات پاتولوژیک آلودگی با بروسلا ملیتنسیس(*Brucella melitensis*) و متابولیت‌های آن در هم کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی گوسفند نژاد قزل

استاد راهنما:

دکتر امیرعلی شهبازفر

دکتر بابک قاسمی پناهی

استاد مشاور:

دکتر پیمان زارع

دکتر مجید مهدوی

پژوهشگر:

رویا محمدپوردونیقی

بهمن ۱۳۹۳

این کار تقدیم به:

پدرم با بوسه بر دستانش که وجودش مایه ی دلگرمی ام است.

و

مادرم با بوسه بر دستانش که وجودش برایم همه مهر است.

و

خواهران نازنینم که عطر حضورشان تکرار خوشی های من است.

و

دلخوشی همیشگی ام؛ برادران عزیزم که صفایشان مایه ی آرامشم است.

و

تقدیم به:

معلمان فرهیخته ای که صادقانه و عاشقانه تلاش می کنند تا تقالی دانسته ها را به نقادی اندیشه ها تبدیل سازند.

با سپاس فراوان از لطف خدای مهربان.

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند.

بر حسب وظیفه بر خود لازم می‌دانم از استاد دلسوز و شایسته؛ جناب آقای دکتر شهباز فرکه در کمال سعه‌ی صدر، با حسن خلق و فروتنی، هیچ گاه را در این عرصه بر من دریغ ننموده اند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند، تشکر بنمایم. همچنین از اساتید ارجمند، جناب آقای دکتر قاسمی پناهی به عنوان استاد راهنمای دوم و جناب آقای دکتر مهدوی و دکتر زارع که با مشاوره‌های ارزنده‌ی خود ایجانب را راهنمایی فرمودند، متشکرم. از استاد بزرگوار جنای آقای دکتر اشرفی که که منت نهاده و داوری این پایان نامه را تقبل فرمودند و همچنین اساتید ارجمند جناب آقایان دکتر جعفری جوزانی، کثیرایی، نعمت الهی، طلوعی، جارالمسجد، رضازاده، محمودی، حنیفه، هاشمی، مردانی، حملی، کلاهیان، حسن زاده، رجبی، نیازپور و خانم‌ها دکتر نفوذی، جوانمردی، شهبازی و شیخ زاده که سعادت شاگردی ایشان را داشتم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم. از پدر و مادر عزیزم، این دو معلم بزرگوارم که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده اند تشکری ویژه دارم. از تمامی دوستان و همکلاسی‌های عزیز و مهربانم به ویژه خانم‌ها دکتر منیره فلسفی و راضیه کیانی همراهانی همدل برایم بودند، و همچنین دکتر امید فخری و محمد حسن علی یولداشی که در انجام این پایان نامه کمک ام کردند کمال تشکر را دارم. و از اعضا و کارمندان خوب و زحمت کش دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز آقایان مفتونی، حقی، اسدی، فتوحی، ابراهیمیان، رضایی، روزرام، زمانی و خانم‌ها قانعی فر، جعفری و وکیلی به خاطر کمک و مساعدت‌های بی دریغشان سپاس و قدردانی می‌نمایم.

لازم می‌دانم از مرکز تحقیقات پشمینه و سرکار خانم نازلی سعیدی به خاطر کمک‌های فراوانی که در انجام این کار به بنده کرده اند تشکر و قدردانی ویژه داشته باشم.

در پایان از همه‌ی کسانی که به نحوی در انجام این پایان نامه مرا یاری رساندند و نامی از آنها برده نشد عذرخواهی و صمیمانه تقدیر و تشکر می‌کنم.

نام خانوادگی دانشجو: محمد پور دونیقی نام: رویا		
عنوان پایان نامه: مطالعه اثرات پاتولوژیک آلودگی با بروسلا ملیتنسیس(*Brucella.melitensis*) و متابولیت‌های آن در هم کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی گوسفند نژاد قزل		
استاد راهنما: دکتر امیر علی شهبازفر، دکتر بابک قاسمی پناهی اساتید مشاور دکتر مجید مهدوی، دکتر پیمان زارع		
مقطع تحصیلی: دکترای حرفه‌ای دانشگاه: دانشگاه تبریز تاریخ فارغ التحصیلی:	رشته: دامپزشکی دانشکده: دامپزشکی تعداد صفحه:	گرایش: دامپزشکی
کلید واژه ها: بروسلا ملیتنسیس، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های سرتولی ، سیتوپاتی		

چکیده:بروسلا ملیتنسیس(*Brucella melitensis*) عامل بروسلوز گوسفند و بز، دارای قدرت بیماری زایی بیشتری نسبت به سایر انواع بروسلاها می‌باشد و از بین همه‌ی بروسلاها شایع‌تر می‌باشد. بروسلا ملیتنسیس با ایجاد ارکیت و اپیدیدیمیت باعث ایجاد ناباروری در قوچها می‌شود، سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه تنها سلول‌های بنیادی بدن هستند که هم دارای قدرت خود افزایی (*self renewal*) و هم قدرت انتقال ژن به نسل‌های بعدی هستند. این سلول‌ها در طول حیات مرتباً تقسیم شده و با تولید اسپرماتوزوئیدها قدرت باروری جنس نر را حفظ می‌کنند. آسیب‌های وارد شده به بافت بیضه با تحت تأثیر قرار دادن سلول‌های ژرم، باروری جنس نر را متأثر می‌سازند. در این مطالعه جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه ی گوسفند در DMEM، انجام گرفت. سلول‌ها با باکتری بروسلا و متابولیت های آن تیمارشدند. و اثر سیتوپاتیک احتمالی باکتری و متابولیت‌های آن از طریق MTT، بررسی پاتولوژیکی و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج این مطالعات نشان داد که بروسلا ملی تنسیس روی سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اثر سیتوپاتیک را به صورت نکروز و مرگ سلولی ایجاد می‌کند.

فهرست مطالب

۲-۱ ساختمان بیضه ۵
۲-۱-۱- بیضه ۵
۲-۱-۲-لوله‌های منی ساز ۶
۲-۱-۳-سلول‌های اسپرماتوگونی ۷
۲-۱-۴- سلول‌های سرتولی ۸
۲-۱-۵-سد خونی- بیضوی ۹
۲-۱-۶- بافت بینابینی ۱۱
۲-۱-۷- سلول‌های لیدیگ یا بینابینی ۱۲
۲-۲ فرآیند اسپرم سازی یا اسپرماتوژنز ۱۳
۲-۲-۱- اسپرماتوژنز ۱۳
۲-۲-۲ -اسپرمیوژنز ۱۴
۲-۲-۳ - اسپرمیشن ۱۵
۲-۲-۴ - زمان اسپرماتوژنز ۱۶
۲-۳- سلول‌های بنیادی ۱۷
۲-۳-۱-انواع سلول‌های بنیادی ۱۷
۲-۳-۲ -کاربرد سلول‌های بنیادی ۱۸
۲-۳-۳-کنام و ارتباط بین سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی ۱۹
۲-۴ -کشت و جداسازی سلول ها ۲۱
۲-۴-۱ -انواع سیستم‌های کشت در روند تکوین اسپرم‌زایی ۲۱
۲-۴-۲ -کشت کوتاه‌مدت ۲۲
۲-۴-۳- کشت طولانی‌مدت ۲۲
۲-۵-روش‌های شناسایی سلول‌ها ۲۳
۲-۶ - انواع آسیب سلولی ۲۷
۲-۶-۱ -ریخت شناسی آسیب سلولی ۲۸
۲-۶-۲ -آسیب برگشت پذیر ۲۸

۲-۶-۳ - آسیب برگشت ناپذیر ۲۹
۲-۶-۴ -پاسخ های تحت سلولی به آسیب ۲۹
۲-۷ -بررسی باکتری بروسلا ۳۰
۲-۸-ورود و بقای بروسلا در سلول (فاگوزوم) ۳۱
۲-۹-بروسلا ملی تنسیس ۳۲
۲-۹-۱-گونه بیماری‌زای گوسفندی و بزی ۳۲
۲-۹-۱- بیماری زایی در گوسفند ۳۳
فصل سوم: مواد و روش کار ۳۵
۳-۱-جداسازی و هم کشتی سلول های اسپرماتوگونی وسرتولی ۳۶
۳-۱-- اخذ نمونه ۳۶
۳-۱-۲- جداسازی سلول‌ها ۳۶
۳-۱-۳ - کشت و پاساژسلولی ۳۷
۳-۱-۴ - شمارش سلول‌ها ۳۸
۳-۲- تائید ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی به وسیله‌ی ایمنوسیتوشیمی ۴۰
۳-۳- کشت باکتری‌ها و استحصال متابولیت‌ها ۴۱
۳-۳-۱- باکتری‌ها ۴۱
۳-۳-۲-فعال‌سازی باکتری‌ها ۴۲
۳-۳-۳- شرایط کشت باکتری‌ها ۴۲
۳-۳-۴- شمارش کلنی‌های باکتری‌ها ۴۲
۳-۳-۵ -استحصال مایع رویی محیط کشت باکتری‌ها ۴۳
۳-۳-۶ - استریل‌سازی مایع رویی ۴۳
۳-۳-۷-ذخیره‌سازی باکتری‌ها ۴۴
۳-۴-بررسی تعداد کلنی‌ها، مساحت کلنی‌ها و میزان زنده مانی سلول‌ها بعد از مواجهه‌ی باکتری و مایع رویی ۴۴
۳-۴-۱-گروه بندی مطالعه ۴۴
۳-۴-۲-بررسی تعداد کلنی‌ها ۴۵
۳-۴-۳-بررسی میزان زنده مانی سلول‌ها با روش MTT ۴۶
۳-۵- مطالعه‌ی پاتولوژیکی ۴۷
۳-۵-۱- رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین ۴۷
۳-۶ -فلوسایتومتری ۴۸
۳-۶-۱-آماده سازی نمونه ۴۹
۳-۶-۲ دستگاه فلوسایتومتر و رایانه برای آنالیز داده ها ۵۰
۳-۷ -آنالیزآماری ۵۰

۳-۸- لیست مواد و تجهیزات مورد استفاده ۵۰
فصل چهارم: نتایج ۵۴
۴-۱ -نتایج جدا کردن و هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی ۵۴
۴-۲-تائید ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی ۵۵
۴-۳- نتیجه‌ی شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها ۵۶
۵-۳- نتیجه‌ی شمارش کلنی‌ها بعد از تیمار کردن گروه‌ها ۵۶
۴-۶- نتیجه‌ی بررسی تاثیر باکتری و متابولیت‌های بر اندازه‌ی کلنی‌های اسپرماتوگونی ۵۷
۴-۷- نتیجه‌ی تست MTT ۵۷
۴-۸-نتیجه‌ی بررسی‌های پاتولوژیکی ۵۸
۴-۹-نتایج فلوسایتومتری ۵۹
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۷۰
منابع ۷۶

فهرست تصاویر

فهرست جداول

صفحه

جدول۲-۱: زمان اسپرماتوژنز در گونه‌های مختلف ۲۷
جدول۲-۲: مارکرهای سطح سلول‌های لوله‌های منی‌ساز ۳۸
جدول۲-۳: خصوصیات کلی گونه‌ها ۴۴
جدول۲-۴: مدت زمان بقای باکتری بروسلا ملی‌تنسیس در محیط‌های مختلف ۴۸
جدول۳-۱: لیست مواد و تجهیزات مورد استفاده ۷۱
جدول۴-۱: نتایج حاصل از آنالیز آماری تعداد کلونی‌های هر گروه ۸۲
جدول۴-۲: نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به مساحت کلونی‌ها ۸۳
جدول۴-۳: نتایج آنالیز آماری مربوط به تست MTT ۸۴

صفحه

شکل۳-۱ هود لامینار(سمت راست)، انکوباتور CO_2 (سمت چپ) ۵۸

شکل۳-۲ میکروسکوپ اینورت ۶۰

شکل۳-۳ آمپول لیوفیلیزه حاوی باکتری بروسلا ملی تنسیس ۶۲

شکل۳-۴ دستگاه کلنی‌کانتر ۶۴

شکل۳-۵ فیلتر سرسُرنگی یک‌بارمصرف با اندازه‌ی منفذ ۰/۲۲ میکرومتر ۶۴

شکل۳-۶ پلیت ۹۶ خانه‌ی مربوط به تست MTT ۶۶

شکل۳-۷ دستگاه میکروپلیت‌ریدر ۶۷

شکل۳-۸ پلیت ۶ خانه رنگ‌آمیزی شده ۶۸

شکل۳-۹ دستگاه فلوسایتومتری و رایانه ۷۱

شکل۴-۱: نمای میکروسکوپیک از هم کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی درزیر میکروسکوپ اینورت ۷۵

شکل ۴-۲ رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی با آنتی‌ویمنتین کونژوگه با FITC ۷۶

شکل۴-۳ رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با آنتی Oct-4 کونژوگه با FITC. ۷۶

شکل ۴-۴ پلیت‌های Brucella Agar مربوط به شمارش کلنی باکتری‌ها ۷۷

شکل ۴-۵ نمودارهای مربوط به فلوسیتومتری ۸۱

شکل۴-۶ کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با گروه‌های کنترل(C)، تیمار باکتری (B)، تیمار متابولیت (M) بعد از ۲۴ ساعت تیمار. ۸۶

شکل ۴-۷ کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با گروه‌های کنترل(C)، تیمار باکتری (B)، تیمار متابولیت (M) بعد از ۴۸ساعت تیمار. ۸۷

شکل۴-۸ کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با گروه‌های کنترل(C)، تیمار باکتری (B)، تیمار متابولیت (M) بعد از ۷۲ ساعت تیمار. ۸۸

شکل۴-۹ کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی با گروه‌های کنترل(C)، تیمار باکتری (B)، تیمار متابولیت (M) بعد از ۹۶ ساعت تیمار. ۸۹

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱: درصد زنده‌مانی ۸۵

فصل اول

مقدمه

فصل اول: مقدمه

تب مالت یا بروسلوزیس[1] به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و حیوانات با بیش از نیم میلیون آلودگی انسانی در سال می‌باشد. عامل ایجاد کننده‌ی این بیماری کوکوباسیل‌های گرم منفی بروسلا هستند. این باکتری انگل داخل سلولی اختیاری در سیستم رتیکلو-اندوتلیال است. که باعث سقط، ناباروری، ارکیت، آرتریت، و هیگروما در حیوانات مبتلا می‌شود. بیماری زاترین گونه برای انسان، که بیش‌ترین ارتباط را با حیوانات اهلی دارد *Brucella melitensis* می‌باشد، که در بز، گوسفند و شتر بیماری ایجاد می‌کند. و از عوامل ایجاد کننده‌ی ارکیت و ناباروری در قوچ می‌باشد. علایم بیماری شامل کیفیت پایین منی، کاهش حرکت اسپرم، کاهش تعداد اسپرماتوزوئید وافزایش اسپرم‌های غیر طبیعی و در موارد شدید بیماری ضایعات نکروزه‌ی مشخص در اپی‌دیدیم و اسکروتوم می‌باشد. سلول‌های اپی‌تلیال عمدتاً بعنوان مدل آزمایشگاهی مناسبی برای مطالعه‌ی بروسلا و تداخل آن با سلول‌های غیرفاگوسیته میزبان مورد مطالعه قرار می‌گیرد. اسپرم سازی فرایند تکثیر و تمایز سلول ژرم نر است که از زمان بلوغ آغاز شده و در کل حیات ادامه دارد. اساس این فرآیند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که دارای پتانسیل ویژه‌ای در خود نوسازی و یا تمایز به سایر رده‌های سلول ژرم و در نهایت اسپرم است. برای بقای سلول‌های بنیادی، نیاز به محیط ویژه نیچ[2] است. نیچ ریز محیطی است که سرنوشت سلول بنیادی را با جلوگیری از تمایز آن حفظ کند و غالباً شامل سلول‌های تمایز یافته مجاور، سلول‌های بنیادی مجاور و ماتریکس خارج سلولی اطراف این سلول‌ها است. ریز محیط سلول‌های بنیادی در طول غشای پایه لوله‌های منی ساز قرار دارد و سلول‌های سرتولی در تشکیل این ریز محیط نقش بسزایی دارند. تکنولوژی کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و توانایی هم کشتی این سلول‌ها با سلول‌های سرتولی جهت شبیه سازی لوله‌های منی‌ساز در محیط آزمایشگاه زمینه را برای تحقیقات بر روی این سلول‌ها و تولید مثل ایجاد کرده است. مطالعه‌ای در رابطه با بررسی سیتوپاتی بروسلا بر روی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی و اینکه دقیقاً این باکتری در بافت بیضه کدام سلول‌ها را مورد هدف قرارمی دهد و آسیب سلولی آن چگونه

[1] - Brucellosis
[2] -nich

است انجام نگرفته‌است. هدف ما از این مطالعه بررسی اثر باکتری بروسلا برروی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی در محیط کشت آزمایشگاهی می‌باشد. نگهداری حیوانات نر از نظر تولید مثلی دارای اهمیت است و ابتلا به بروسلوزیز باعث ناباروری می‌شود در این مطالعه سعی شد سیتوپاتی باکتری روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی بررسی گردد و اینکه این آسیب سلولی برگشت پذیر یا برگشت ناپذیراست تا در صورت برگشت پذیر بودن بتوانیم عوارض را به بالین تعمیم دهیم و حیوانات نر نابارور در اثر بیماری را درمان کنیم و در صورت برگشت ناپذیر بودن برای جلوگیری از ضرر اقتصادی حیوانات نابارور را حذف نماییم.

فصل دوم

کلیات

فصل دوم : کلیات

۲-۱ ساختمان بیضه

۲-۱-۱- بیضه[1]

بیضه‌ها غدد نر یا اندام‌های اولیه‌ی جنسی هستند که دارای دو وظیفه هستند: تولید گامت‌های نر(اسپرماتوزوآ) و تولید هورمون‌های جنسی نر یا آندروژن‌ها. از آن جا که تولید اسپرماتوزوا به تولید اندروژن‌ها بستگی دارد، این دو عمل مکمل هم هستند. بیضه‌های قوچ خیلی بزرگ است و وزن هر کدام در حیوان بالغ و سالم به ۱۰۰تا ۳۰۰ گرم می رسد(Rowen D. Frandson 2013).

اندازه‌ی بیضه‌ها، که با توجه به فصل تولیدمثل تغییر می‌کند و در اواسط فصل تولیدمثل به حداکثر می‌رسد، در میزان تولید اسپرم نیز موثر است. هربیضه با پوششی فیبری به نام تونیکا آلبوژینا[2] پوشیده شده است که در برگیرنده‌ی سرخرگ‌ها و سیاهرگ‌ها است و در قسمت زیرین آن پارانشیم قرار دارد. پارانشیم دارای چند لوب است وهر لوب لوله‌های مارپیچی زیادی به نام لوله‌های اسپرم ساز[3] دارد که با بافت بینابینی احاطه شده است. لوله‌های اسپرم ساز بافت پوششی مطبق دارد و از سلول‌های اسپرم ساز و سرتولی تشکیل شده است. لوله‌های اسپرم ساز بیش از ۹۰٪ از حجم بیضه را تشکیل می‌دهند(Rowen D. Frandson 2013).

..... طول این لوله‌ها در قوچ ۴ هزار متر، در گاو نر۵ هزار متر و در انسان ۲۵۰ متر است(Rowen D. Frandson 2013). اسپرماتوزوا پس از تولید در لوله‌های اسپرم‌ساز، به مرکز بیضه منتقل می‌شود و از طریق شبکه‌ی بیضوی و سپس لوله‌های آوران به ناحیه‌ی سر اپیدیدیم می‌رود. بافت بینابینی شامل رگ‌های خونی، اعصاب و بعضی سلول‌های ویژه به نام لایدیک است که وظیفه‌ی تولید آندروژن را برعهده دارد. بعضی اعمال آندروژن‌ها در بیضه موضعی است، ولی بیش‌تر آن‌ها از طریق رگ‌های خونی به جریان

1-testis
2-tunica albogina
3-seminiferous

خون وارد و باعث تسریع رشد، بروز خصوصیات بدنی نرها و بروز خصوصیات ثانویه‌ی جنسی می‌شود، همچنین برمرکز رفتاری در مغز اثر می‌گذارد و رفتارهای جنسی نر را افزایش می‌دهد(Rowen D. Frandson 2013).

۲-۱-۲-لوله‌های منی ساز

اسپرم‌ها در لوله‌های منی ساز با میزان روزانه حدود ۲×۱۰^{۸} در مردان بزرگسال تولید می‌شوند. هربیضه دارای ۱۰۰۰-۲۵۰ لوله‌ی منی ساز است، که قطر هریک در حدود ۲۵۰-۱۵۰ میکرومتر و طول آن در حدود ۲۵۰ متر است. هرلوله یک قوس پیچ خورده است که از طریق قطعه‌ی باریک‌تر به نام لوله‌ی مستقیم به شبکه‌ی بیضه متصل می‌شود. شبکه‌ی بیضه توسط ۱۰ تا ۲۰ مجراچه‌ی وابران به سر اپی‌دیدیم متصل می‌شود.

هر لوله‌ی منی ساز از یک اپی‌تلیوم پیچیده‌ی مطبق تخصص یافته به نام اپیتلیوم زایا یا اپیتلیوم منی‌ساز مفروش شده‌است. غشای پایه این اپی‌تلیوم توسط بافت همبند رشته‌ای پوشیده شده‌است؛ داخلی‌ترین لایه این بافت حاوی سلول‌های مسطح و شبیه عضله‌ی صاف به نام سلول‌های میوئید یا شبه عضلانی هستند. اپی‌تلیوم منی ساز حاوی دو نوع سلول است، سلول‌های پرستار یا پشتیبان(سلول‌های سرتولی)که تقسیم نمی‌شوند و سلول‌های رده اسپرماتوژنز سلول‌های رده‌ی اسپرماتوژنز ۸-۴ لایه‌ی سلولی متحدالمرکز تشکیل می‌دهند و کار آن‌ها تولید سلول‌های است که به اسپرم تبدیل می‌شوند. بخشی از روند تولید اسپرم که شامل تقسیم سلولی از طریق میتوز و میوز است، اسپرماتوژنز نامیده می‌شود. تمایز نهایی سلول‌های زایای هاپلوئید در جنس مذکر اسپرمیوژنز نام دارد (Mescher 2009). سلول‌های رده اسپرماتوژنز شامل سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های اولیه، اسپرماتوسیت‌های ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآها می‌باشند. سلول‌های سرتولی که در طول دوران جنینی از اپیتلیوم سطحی گنادهای در حال تکامل تمایز پیدا می‌کنند، به وسیله اتصالات محکم به هم متصل شده و در نهایت موجب تقسیم لوله‌های منی ساز به دو بخش قاعده‌ای و مجاور مجرایی می‌شوند. این اتصالات محکم اساس سد خونی بیضوی را تشکیل می‌دهند. سلول‌های اسپرماتوژنیک طی تکامل در مرحله پره لپتوتن با عبور از این سد در قسمت مجاور مجرایی قرارگرفته و ادامه تکامل‌شان را در محیطی دور از

دسترس عوامل ایمنی ادامه می‌دهند. البته تا موقع بلوغ جنسی لوله‌های سمینی‌فر به صورت توپر و منحصراً متشکل از سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی می‌باشند که این سلول‌ها پس از بلوغ جنسی و آغاز روند اسپرماتوژنز، تکثیر و تمایز می‌یابند(Skiner 1991).

۲-۱-۳-سلول‌های اسپرماتوگونی[1]

سلول‌های زایای بیضه در داخل نزدیک غشای پایه به صورت برجسته قراردارند؛ هنگام بلوغ دوباره فعال شده و وارد چرخه میتوزی می‌شوند و از آن پس تحت عنوان سلول‌های اسپرماتوگونی A1 نامیده‌می‌شوند، شروع مجدد میتوز در سلول‌های اسپرماتوگونی نشانگر آغاز پروسه اسپرماتوژنز می‌باشد. تمام سلول‌های اسپرماتوگونی در طی بلوغ فعال نمی‌شوند بلکه برخی از آن‌ها در وضعیت غیرفعال و استراحت باقی‌می‌مانند که توانایی بعداً فعال شدن را دارا می‌باشند. اسپرماتوگونی A1 یکسری تقسیمات میتوزی کمی انجام می‌دهند و این تقسیمات منجر به پدید آمدن یک کلونی از سلول‌های دختری می‌شود. شکل سلول دختری حاصله از تقسیم میتوز با سلول مادری فرق می‌کند و برای همین می‌توان نوع اسپرماتوگونی ویژه‌ای که در هر مرحله از تقسیم میتوزی قرار دارد را مشخص نمود. اسپرماتوگونی‌های حاصل از سه تقسیم اول میتوزی A1, A2 ,A3 ,A4، پس از تقسیم چهارم میتوزی، اسپرماتوگونی بینابینی و پس از تقسیم پنجم، اسپرماتوگونی نوع B خوانده می‌شوند و جمعیتی را به وجود می آورند که وارد تقسیم میوزی می‌شوند. سلول‌های میوزی رشد می‌کنند و تحت سیناپس کروموزومی قرار می‌گیرند تا به اسپرماتوسیت‌های اولیه تبدیل شوند که به مدت ۳ هفته در پروفاز نخستین تقسیم میوز متوقف می‌شوند که طی آن نوترکیبی روی می‌دهد. در تمامی این تقسیم‌ها، تقسیم هسته کامل بوده ولی تقسیم سیتوپلاسم بطور ناکامل انجام می‌گیرد و به همین دلیل تمامی اسپرماتوسیت‌های حاصله از تقسیم اسپرماتوگونی A1 به وسیله پل‌های سیتوپلاسمی به یکدیگر متصل می‌باشند. در بعضی مقاطع یکی از سلول‌های دختری کلونی تقسیم نشده و به صورت اسپرماتوگونی A باقی مانده و به عنوان سلول اجدادی بنیادی عمل می‌کند. این مکانیسم موجب حفظ و نگهداری تعداد سلول‌های بنیادی در بیضه شده و همچنین باعث تولید کلونی‌های جدید می‌گردد (Adler 1996 2013).

1-spermatogonial stem cell(ssc)

اسپرماتوسیت‌های اولیه بزرگترین سلول‌های اسپرماتوژن هستند و معمولادر تمام سطوح میان غشای پایه و مجرا به فراوانی یافت می‌شوند. هریک از آن‌ها تقسیم و به دو اسپرماتوسیت ثانویه تبدیل می‌شود، که به ندرت در برش‌ها دیده می‌شوند زیرا به سرعت تحت تقسیم دوم میوز قرار می‌گیرند تا دو اسپرماتید هاپلوئید ایجاد کنند.

۲-۱-۴- سلول‌های سرتولی

سلول‌های سرتولی به افتخار انریکو سرتولی فیزیولوژیست ایتالیایی در سال ۱۸۶۵ (نخستین بار اهمیت فیزیولوژیکی آن رانشان داد) بدین نام خوانده می‌شود، برای عملکرد بیضه بسیار اهمیت دارند آن‌ها سلول‌های هرمی شکلی یا استوانه‌ای هستند که تا حد زیادی سلول‌های رده اسپرماتوژنز را احاطه و به صورت سلول‌های پشتیبان یا سلول‌های پرستار عمل می‌کنند. قاعده‌ی سلول‌های سرتولی به تیغه‌ی قاعده‌ای می‌چسبد، و انتهای راسی آن‌ها معمولاً تا مجرای لوله‌ی منی ساز امتداد می‌یابد. در زیر میکروسکوپ نوری حدود سلول سرتولی به خوبی مشخص نیست، که این امر به علت وجود استطاله‌های جانبی متعددی است که سلول‌های اسپرماتوژن را احاطه می‌کنند. هر سلول سرتولی از ۵۰-۳۰ سلول زایا در مراحل مختلف تکامل پشتیبانی می‌کند. بررسی این سلول‌ها به وسیله‌ی TEM نشان داده‌است که این سلول‌ها حاوی مقادیر زیادی شبکه‌ی اندوپلاسمیک صاف، مقداری شبکه‌ی اندوپلاسمیک خشن، کمپلکس گلژی تکامل یافته، تعدادی میتوکندری و لیزوزوم هستند. هسته‌ی کشیده که می‌تواند مثلثی شکل باشد، حاوی تعدادی فرورفتگی و یک هستک مشخص و غالبا هتروکروماتین بسیار اندکی هستند. اعمال زیادی را به سلول‌های سرتولی نسبت می‌دهند از جمله: عملکرد حفاظتی و تغذیه سلول‌های ژرمینال، تحویل اسپرماتوزوآهای بالغ به مجرای لوله‌های سمینی‌فر، تولید مواد آندوکرینی و پاراکرینی برای تنظیم اسپرماتوژنز، ترشح پروتئین‌های متصل شونده به آندروژن برای تغلیظ تستوسترون دردرون لوله‌های سمینی‌فر، واکنش متقابل با سلول‌های لیدیگ، سنتز و ترشح ماده آنتی‌مولرین در دوره جنینی که تکامل مجاری ناقل اسپرم و عدم تشکیل رحم و لوله رحم را باعث می‌شود، سنتز و ترشح اینهیبین که ترشح FSH را مهار می‌کند و اکتیوین، ترشح مایع غنی از فروکتوز که به تغذیه و انتقال اسپرم کمک می‌کند، سنتز و ترشح ترنسفرین که با جذب آهن به بلوغ گامت‌ها کمک می‌کند، تبدیل تستوسترون

به استرادیول و ایجاد سد خونی بیضوی که مهم‌ترین عامل در دور نگه داشتن عوامل ایمنی از سلول‌های در حال تقسیم میوزی می‌باشد (Adler 1996, Cheng and Mruk 2002).

سلول‌های سرتولی از غشاء پایه تا مجرای میانی لوله‌های سمینی‌فر کشیده شده‌اند، پس با هر نوع سلول اسپرماتوژنیک، از آغاز تا پایان، در تماس می‌باشند که این تماس‌ها به سه صورت انجام می‌گیرند.

۱. تماس با اسپرماتوسیت‌های پاکی تن از طریق اتصالات روزنه‌دار

۲. تماس با اغلب اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها از طریق اکتوپلاسمیک تخصص یافته

۳. تماس با اسپرماتیدهای دراز از طریق فرو رفتگی‌های عمیقی که شبکه لوله‌ای پیازی نامیده می‌شوند(Adler 1996, Holstein 1999).

در خود سلول‌های سرتولی در طی چرخه اسپرماتوژنز از نظر مورفولوژیک و بیوشیمیایی نیز تغییراتی قابل مشاهده می‌باشد، از جمله حجم لیپید، مورفولوژی هسته و تعداد و توزیع لیزوزوم‌های ثانویه به صورت دوره‌ای در سلول‌های سرتولی تغییر می‌کند. همچنین ساخت پروتئین‌های بیضه‌ای مثل پروتئین‌های متصل شونده به آندروژن، ترنسفرین، پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن تغییر می‌کند و ترشح پروتئین‌های ذکر شده بویژه هنگام اسپرمیشن وعبور اسپرماتوسیت‌های پره لپتوتن به قسمت مجاور لوله‌ای افزایش می‌یابد؛ بنابراین این نظریه وجود دارد که برخی از این مواد دارای خاصیت پروتئولیتیکی می‌باشند. تغییرات دوره‌ای در سلول‌های سرتولی موقع بلوغ و درست قبل از اسپرماتوژنز بیانگر دخالت سلول سرتولی در روند اسپرماتوژنز و تنظیم آن می‌باشد (Johnson 2013).

۲-۱-۵-سد خونی- بیضوی[1]

اتصالات انسدادی محکم ظریف و ساخته و پرداخته میان غشاهای قاعده‌ای –جانبی سلول‌های سرتولی همسایه یک سد خونی – بیضه‌ای در اپی‌تلیوم منی ساز تشکیل می‌دهند، که سخت‌ترین سد خونی–بافتی در پستانداران است. این سد فیزیکی بخشی از سامانه‌ای است که جلوی حملات خود ایمن برعلیه سلول‌های منحصر به فرد اسپرماتوژن را می‌گیرد(که مدت زیادی پس از بلوغ دستگاه ایمنی و استقرار روند مرکزی تحمل خودی برای نخستین بار پدیدار می‌شوند). اسپرماتوگونی‌ها در یک محوطه‌ی

1- Blood-testise barrier

قاعده‌ای قرار می‌گیرند که زیر اتصالات واقع شده‌است و به بافت بینابینی پر رگی که محتوی لنفوسیت‌ها و سلول‌های ارائه کننده‌ی آنتی ژن است راه دارد. در اوایل میوز، اسپرماتوسیت‌های تازه تشکیل شده موقتاً ملکول‌های چسبندگی سلولی بیش تر اتصالات قاعده‌ای را می‌گسلند و به صورت گذرا اتصالات جدیدی میان فاکتورهای چسبندگی در غشا های خود وغشاهای سلول های سرتولی ایجاد می‌کنند، و بدون صدمه زدن به سد خونی–بیضه ای به درون محوطه‌ی جنب مجرایی نقل مکان می‌کنند. اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها محکم به سلول‌های سرتولی می‌چسبند و در فرو رفتگی‌های عمیق غشاهای جانبی و راسی این سلول‌ها در بالای سد، قرار می‌گیرند. حرکت سلول‌های اسپرماتوژن میان سلول‌های پشتیبان در عین حفظ اتصالات انسدادی موثر و کارآمد میان تمام سلول‌ها، هنگامی بیش‌تر جلب توجه می‌کند که بیاد بیاوریم سلول‌های زایا توسط پل‌های سلولی متصل به هم باقی می‌مانند. اسپرماتیدها در حین تکامل شبیه به دسته‌های مویی هستند که از انتهای راسی سلول‌های سرتولی خارج شده‌اند. سلول‌های سرتولی خارج می‌شوند. سلول‌های سرتولی همچنین به وسیله‌ی اتصالات شکاف‌دار متعدد به هم متصل و از نظر یونی مرتبط شده‌اند؛ این امر ممکن است به تنظیم تغییرات گذرا در اتصالات انسدادی و ایجاد هماهنگی در چرخه‌ی اپی‌تلیوم منی ساز کمک کند. سلول‌های سرتولی کارکردهای خاص مختلفی درون اپی‌تلیوم منی ساز دارند که بیش‌تر آن‌ها به کمک سد خونی بیضه‌ای به انجام می‌رسند:

۱- پشتیبانی، حفاظت و تغذیه‌ی سلول‌های در حال تکامل. چون اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و اسپرم‌ها به وسیله‌ی سد خونی–بیضه‌ای از موادغذایی و پروتئین‌های پلاسما جدا نگه داشته می‌شود این سلول‌های اسپرماتوژن جهت تولید متابولیت‌ها و عوامل مغذی(مانند پروتئین ناقل یون ترانسفرین) یا انتقال آن‌ها به درون مجرا به سلول‌های سرتولی وابسته هستند. بدین ترتیب، سلول‌های سرتولی در عین حال که از سلول‌های اسپرماتوژن در برابر اجزای ایمنی موجود در پلاسما محافظت میکنند، باید فاکتورهای پلاسمایی مورد نیاز برای رشد و تمایز را نیز فراهم کنند.