بسم الله الرحمن الرحيم

پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات علوم سلولی
مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی جانوری گرایش تکوینی

عنوان:

مقایسه اثر همکشتی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی با سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ و نابالغ

نگارش:

فرانک توکلی فر

استاد راهنما:

دکتر عبدالحسین شاهوردی

استاد مشاور:

دکتر حسین بهاروند

تابستان۱۳۸۸

تقدیم به

روح بلند دانشمند فقید مرحوم دکتر سعید کاظمی آشتیانی

و

نازنین مادرم که به من پویایی و مهرآفرینی آموخت

مهربان پدرم که همواره مرا حامی و پشتیبانی بی نظیر است.

چکیده فارسی

سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی(SSCs)[1] تنها گروه از سلولهای بنیادی بالغ هستند که قابلیت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد را دارند و تاکنون اثر سن سلولهای غذا دهنده در حمایت از رشد و تکثیر آنها موضوعی قابل بحث است .این مطالعه به منظور مقایسه اثر هم کشتی سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ و نابالغ با سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی صورت گرفته است .SSCs از موش نابالغ جدا شده و کشت شدند و سپس روی سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ و موش نابالغ و روی سلولهای STO ، منتقل شدند. پس از ۵ روز ویژگیهای کلونیها بررسی شد از رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنت جهت بررسی کیفی بیان مارکرها استفاده شد. و از تست پیوند جهت اطمینان از بنیادی بودن سلولها استفاده شد . این سلولها ۱۰ روز پس از کشت به مدل عقیم پیوند شده و توانستند به محل غشائ پایه لوله های منی ساز[2] مهاجرت کنند . نتایج نشان میدهند که ۵ روز پس از انتقال کلونیها روی لا یه های غذا دهنده مساحت کلونیها ، تعداد آنها و تعداد سلولهای موجود در هر کلونی به نحو معنی داری در گروه سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ بیشتر بود، نتایج فلوسایتومتری نشان میدهد که تعداد سلولهای α6-Integrin مثبت روی سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ به نحو معنی داری بیشتر بود .همچنین افزایش معنی داری در تعداد سلولهای ß1 -Integrinمثبت روی سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ نسبت به سلولهای منتقل شده روی سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ و سلولهای روی STO دیده شد.بر اساس نتایج فوق تعداد SSCs روی لایه غذا دهنده

[1] Spermatogonial stem cell

[2] Seminiferous tubles

سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود، که ممکن است مربوط به تفاوت سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ و بالغ در ایجاد کنام[۳] مناسب برای SSCs باشد

* **کلید واژگان** : سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، پیوند ، لایه های غذا دهنده، سلولهای زاینده ، سلولهای سرتولی

[3] Niche

سپاسگزاری و قدردانی:

سپاس یزدان پاک را که مرا لایق آموختن دانست امید که این نعمت را بر من مستدام دارد.
سپاس از استاد راهنمای خوبم آقای دکتر عبدالحسین شاهوردی که صبورانه و مشفقانه راهنمای راهم بودند
سپاس از استاد مشاورعزیزم آقای دکتر حسین بهاروند که از مشاوره های علمی ایشان بهره های فراوان بردم و همراهی همیشگی شان راه را بر من هموار می نمود.
سپاس از راهنمائیهای مدیران محترم آزمایشگاه بافت شناسی و بخش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشکده رویان آقایان دکترپیریایی و دکتر دانش زاده
سپاس از مساعدت بی ریا و همراهی بی دریغ همکاران خوبم در گروه سلولهای زاینده آقای دکتر سید مرتضی کروجی، آقایان مهدی پیروز، حسین عزیزی و سرکار خانم ملک شاکری
سپاس از همه همکاران و دوستان عزیزم در آزمایشگاه تمایز (با مسولیت آقای پور نصر)که وجودشان دلیل آرامش حاکم در محیط آزمایشگاه و ایجاد شرایطی ایده آل برای کار بود
سپاس از کارشناسان و همکاران محترم: خانمها مستوره شاهسونی ، آزاده مرادمند، اعظم صمدیان درآزمایشگاه مولکولی ، سرکارخانم زهرا اژدری در آزمایشگاه بافت شناسی، آقایان احسان جان زمین و فاضل سامانی در بخش فلوسایتومتری، سرکار خانم اعظم دالمن درآزمایشگاه جنین شناسی وهمکاری صمیمانه آقایان علی فرخی وعلی رهجویی و خانم فائزه شکری که دوستانه و بی دریغ یاری ام دادند
سپاس از پدر، مادر نازنینم که هستی ام ازهست آنهاست وتا هستم مدیون مهرورزی بی پایانشان خواهم بود
سپاس از همکلاسی های خوب دوران تحصلیم، خانمها: اعظم پیلتن، شهربانو جهانگیر، لیلا حاتمی،زهرا فرزانه، سیده زهرا میرحسینی، پروانه محمدی ،سورا مردپور، ناهید نصیری و آقای ابراهیم شهبازی که با حضورشان وهمیاری بی دریغشان شریک لحظه های شادی و غمم بودند وبهترین لحظه های عمرم کنارشان شکل گرفت ،سعادت جاودان نصیبشان باد .
وسپاس از کلیه دوستان ، همکاران عزیز وپرسنل خوب وصمیمی پژوهشکده رویان که ساعات طولانی حضور درپژوهشکده را با حضورشان لذتبخش و پرخاطره ساختند .

فهرست مطالب

فصل اول ۱

مقدمه ۲

۱-۲-هدف اصلی این پژوهش ۵

۱-۳-اهداف ویژه ۵

۱-٤-فرضیات اصلی پژوهش ۵

فصل دوم ٦

۱-۲-سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی(SSCs) ۷

۱-۱-۲- ویژگیها ۷

۲-۱-۲-منشاء سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۸

۳-۱-۲-فعالیتهای بیولوژیکی SSCs ۹

٤-۱-۲- کنام سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۱۱

۵-۱-۲-اهمیت و کاربرد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۱۲

٦-۱-۲-مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۱٤

۷-۱-۲- روشهای جداسازی و غنی سازی SSC ها ۱۷

۲-۲-ارزیابی سیستمهای کشت ۱۸

۱-۲-۲- ضرورت استفاده از فاکتورهای رشد در کشت SSCs ۱۹

۲-۲-۲-استفاده از لایه های غذا دهنده در کشت SSC ها ۲۱

۳-۲- سلولهای سرتولی ۲۲

٤-۲- پیوند سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۲٤

۱-٤-۲-آماده سازی حیوان گیرنده ۲۵

۲-٤-۲-آماده سازی سلول دهنده ۲۷

۳-٤-۲- تجهیزات و مراحل انجام پیوند ۲۸

٤-٤-۲- ارزیابی موش گیرنده پس از پیوند ۲۸

فصل سوم ۳۰

۳-۱- مقدمه ۳۱
۳-۲-تجهیزات مورد نیاز ۳۷
۳-٤-حیوانات مورد استفاده در این پژوهش ۳۸
۳-۵- جداسازی و کشت سلولها ۳۸
۳-۵-۱- جداسازی سلولهای بیضه موش نوزاد ۳۸
۳-۵-۲- جداسازی سلولهای سرتولی ٤۰
۳-۵-۲-۱- آماده سازی پلیتهای پوشیده با لکتین ٤۱
۳-۵-۲-۲-تعیین هویت سلولهای سرتولی به کمک تست ایمونوسیتوشیمی برای مارکر Vimentin ٤۲
۳-۵-۳- کشت سلولهای STO ٤۳
۳-۵-٤- کشت سلولهای اسپرماتوگونی ٤٤
۳-٦- تعیین هویت سلولهای اسپرماتوگونی ٤٤
۳-٦-۱-شمارش تعداد و مساحت کلونیها ٤٤
۳-٦-۲- تست رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنت ٤۵
۳-٦-۳- فلوسایتومتری ٤٦
۳-٦-٤-تعیین ماهیت سلولهای اسپرماتوگونی به کمک پیوند ٤۷
۳-٦-٤-۱- آماده سازی موش گیرنده ٤۷
۳-٦-٤-۲- روش مطالعه ساختار بیضه به کمک میکروسکوپ نوری ٤۷
۳-٦-٤-۳-آماده سازی سلولها: تیمار سلولها Br du در محیط in vitro ٤۹
۳-٦-٤-٤- چگونگی پیوند ٤۹
۳-٦-٤-۵- ردیابی سلولهای ترکیب شده با BRDU پس از پیوند ٤۹
۳-۷- آماده سازی سلولهای سرتولی بالغ و نابالغ و STO به عنوان لایه های غذا دهنده ۵۰
۳-۸- انتقال کلونیهای اسپرماتوگونی بر روی سه لایه غذا دهنده ۵۱
۳-۸-۱- ارزیابی بازده کلونی زایی یک سلول اسپرماتوگونی منفرد در هر گروه ۵۲
۳-۸-۲- ارزیابی های کمی و کیفی بصورت مقایسه ای بین گروهها ۵۲
۳-۸-۳-بررسی بیان ژن ها به روش RT-PCR ۵۲
۳-۹- آنالیزهای آماری ۵۸

فصل چهارم ۵۹

۴-۱- نتایج حاصل از تعئین هویت کشت اولیه کلونیهای اسپرماتوگونی قبل از انتقال روی لایه‌های غذا دهنده ۶۰

۴-۱-۱- نتایج ارزیابی تعداد کلونیها ۶۰

۴-۱-۲- نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنت ۶۱

۴-۱-۳- نتایج حاصل از تست فلوسایتومتری ۶۳

۴-۱-۴- نتایج حاصل از پیوند ۶۳

۴-۱-۴-۱- آماده سازی موش گیرنده ۶۳

۴-۱-۴-۳- ارزیابی پس از پیوند ۶۵

۴-۲- نتایج حاصل از تستهای مقایسه ای انجام شده بر روی کلونیهای اسپرماتوگونی ۵ روز بعد از انتقال روی لایه های غذا دهنده مختلف (شامل STO ، سرتولی مشتق از موش بالغ، سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ) ۶۶

۴-۲-۱- ارزیابی مورفولوژیک لایه های غذا دهنده ۶۶

۴-۲-۱-۱- لایه غذا دهنده شامل دودمان سلولهای فیبروبلاستی جنینی موش (STO) ۶۶

۴-۲-۱-۲- لایه غذا دهنده شامل سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ و نابالغ ۶۷

۴-۲-۲- تعیین هویت سلولهای سرتولی از طریق رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنت ۶۸

۴-۲-۳- بررسی مورفولوژیک کلونیهای اسپرماتوگونی ۵ روز پس از انتقال به لایه های غذا دهنده ۶۸

۴-۲-۴- ارزیابی کلونیهای منتقل شده روی لایه های غذا دهنده از نظر تعداد و مساحت کلونیها و تعداد سلول در هر کلونی ۷۰

۴-۲-۵-نتایج بررسی بیان ژنهای خاص سلولهای زاینده شامل (DAZL ، Stra8 (Mvh(VASA)، در سطح mRNA از طریق RT-PCR ۷۱

۴-۲-۶- ارزیابی کیفی بیان مارکرهای α6-Integrin و C-kit در کلونیهای اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنت در گروه دوم بالایه غذا دهنده سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ و در گروه سوم بالایه غذا دهنده سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ. ۷۳

۴-۲-۷- ارزیابی بازده کلونی زایی یک سلول اسپرماتوگونی منفرد در هر گروه ۷۵

۴-۲-۸- ارزیابی کمی بیان مارکرهای α6-Integrin،β1-Integrin و C-kit در کلونیهای اسپرماتوگونی با استفاده از تست فلوسایتومتری درهر سه گروه ۷۶

۴-۲-۹-نتایج انالیزهای پس از پیوند ۷۸

فصل پنجم ۸۰

۵-۱- بررسی روش جداسازی وکشت سلولهای اسپرماتوگونی ۸۱
۵-۲- بررسی یافته های حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنت..... ۸۳
۵-۳- بررسی یافته های حاصل از فلوسایتومتری ۸۳
۵-٤ - بررسی تاثیر استفاده از لایه های غذا دهنده در کشت SSCs..... ۸٤
۵-٤-۱- بررسی ارزیابی کمی و کیفی کلونیها..... ۸۷
۵-۵- بررسی یافته های مولکولی..... ۸۷
۵-٦- بررسی روش آماده سازی موش گیرنده پیوند..... ۸۸
۵-۷- بررسی نتایج پیوند..... ۸۸
۵-۸- نتیجه گیری ۸۹
۱۰-۹- پیشنهادات ۹۰
منابع..... ۹۱
ABSTRACT..... ۹۸

فهر ست جداول

جدول۱-۲- لیست انواع مارکرهای اختصاصی SSCs **۱۵**
جدول ۱-۳- لیست مواد مورد استفاده در طرح **۳۲**
جدول ۲-۳- نام ومشخصات ژنهای خاص سلولهای زاینده **۵۳**

فهرست شکل ها

شکل۱-۲ : طرح شماتیک از فرایند اسپرماتوژنز ۷

شکل۲-۲ : انواع سلولهای اسپرماتوگونی طی فرایند اسپرماتوژنز..... ۹

شکل۳-۲: تقسیم متقارن و نا متقارن در سلول اسپرماتوگونی منفرد(As)..... ۱۰

شکل ٤-۲ : برش‌عرضی شماتیک از لوله منی‌ساز وترتیب قرارگیری سلولهای‌جنسی و سوماتیک..... ۱۲

شکل۵-۲: طرح شماتیک از جداسازی و کشت وانجماد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۱۳

شکل٦-۲- : میزان بیان ژنهای مختلف در طی تکوین PGC ها تا ایجاد سلولهای اسپرماتوگونی..... ۱٦

شکل ۷-۲- طرح شماتیک بخشی از مقطع لوله‌های منی‌ساز قبل و بعدازتیمار با داروی‌بیوسولفان ۲۷

شکل۱-۳- مراحل جدا سازی محتویات سلولی بیضه موش نوزاد از طریق هضم آنزیمی..... ۳۹

شکل ۲-۳- مراحل جدا سازی محتویات سلولی بیضه موش بالغ از طریق هضم آنزیمی..... ٤۱

شکل۱-٤-کلونیهای اسپرماتوگونی حاصل از کشت اولیه سلولهای بیضه موش ٦ روزه ٦۰

شکل ۲-٤ رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلولها..... ٦۲

شکل۳-٤-تصویر برش عرضی از بافت بیضه..... ٦٤

شکل٤-٤- برش بافتی بیضه موشهای دریافت کننده سلولهای SSC نشاندارشده با BRDU..... ٦۵

شکل۵-٤ سلولهای STO ۲٤ ساعت پس ازغیر فعال سازی ٦٦

شکل٦-٤-سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ ۱۰ روز پس از کشت(الف) سلولهای سرتولی مشتق از موش نابالغ ۵ روز پس از کشت(ب)..... ٦۷

شکل۷-٤- تصویر ایمونوسیتوشیمی سلولهای سرتولی VIMENTIN مثبت. ٦۸

شکل۸-٤ - مورفولوژی کلونیهای اسپرماتوگونی ٦۹

نمودار ۱-٤- نمودار مقایسه کلونیهای اسپرماتوگونی ۵ روز پس از انتقال روی لایه های غذا دهنده..... ۷۱

شکل۹-٤- بررسی بیان ژنهایDAZL،VASA، stra-8، GAPDH..... ۷۲

شکل ۱۰-٤- تصاویر حاصل از تست ایمونوسیتو شیمی برای مارکرC-KIT..... ۷۳

شکل ۱۱-٤-تصاویر حاصل از تست ایمونوسیتو شیمی برای مارکر α6-Integrin ۷٤

نمودار۲-٤-تعداد کلونیهای حاصل از انتقال ۲۰۰۰۰۰۰ سلول اسپرماتوگونی منفرد روی لایه های غذادهنده..... ۷۵

نمودار۳-٤- نتایج حاصل از تست فلوسایتومتری ۷۷
شکل۱۲-٤- حضور سلولهای BRDU مثبت را در مجاورت غشاء پایه لوله های منی ساز **۷۸**
شکل ۱۳-٤- برش بافتی از بیضه گروه کنترل که سلولی دریافت نکرده است.....**۷۹**

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱- سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی[٤]

مطالعات روی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) اساس مطالعات اسپرماتوژنزیز و یافتن راه درمانی برای ناباروریهای مردان است، امروزه کشت سلولهای اسپرماتوگونی، انجماد و پیوند آنها راه جدیدی است که به کمک آن می توان بیولوژی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل مؤثر در ناباروری را بهتر مورد مطالعه قرار داد [۱] بنابراین دانستن مکانیسم قابلیتهای این نوع سلولها اعم از خودنوزایی و تمایز به اسپرم ضروری است در عین حال آنها تنها گروه از سلولهای بنیادی بالغ هستند که میتوانند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل کنند [۲-٦]لذا آنها هدف مناسبی برای دستکاریهای ژنتیکی و تحقیقات درمانی و آزمایشات بیولوژیکی محسوب میشوند شناخت فرایند اسپرم زایی در محیط آزمایشگاه و در بدن بسیار اهمیت دارد زیرا دانستن این فرآیند می تواند به درمان افراد نابارور و افرادی که در اثر شیمی درمانی و پرتو درمانی عقیم می شوند کمک کند. مطالعات در زوجهای نابارور نشان می دهد که در ٤٠ درصد موارد مردان یا بدون اسپرم هستند یا اینکه تحرک اسپرم ها پایین است و یا تعداد کمی اسپرم دارند.[۷, ۸]

نقص تولید اسپرم یا بخاطر اشکال در سلولهای‌زاینده است و یا اینکه محیط اختصاصی و کنام [٥] آنها در بیضه، محیط مناسبی برای تولید اسپرم نیست و در بیشتر موارد علت آن تقریباً ناشناخته است[۹]، علاوه بر این، اساس ژنتیکی ناباروری در مردان بطور کامل شناخته شده نیست هرچند حدود ۲۰ ژن

1-Spermatogonial Stem cells

[5] - Niche

مربوط به علت ناباروری مردان شناسایی شده است. از آنجا که لازمه تحقیقات آزمایشگاهی در این زمینه کشت توام با تکثیر و بقا و حفظ خاصیت بنیادی آنهاست لذا دستیابی به روشهای کشت مناسب بسیار ارزشمند است تعداد SSCs در بافت بیضه بالغ بسیار کم است (حدود۱ سلول از هر ۳۰۰۰ سلول) [۱۰, ۱۱]و این امر مطالعه آنها را دشوار میسازد. در گذشته سیستم کشتی که بتواند بشکل دراز مدت تمایز و تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی را حمایت کند وجود نداشت و تا کنون نیز تلاشهایی که برای کشت سلولهای اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی انجام شده است چندان موفق نبوده است. زیرا اطلاعات زیادی در مورد چگونگی تنظیم تقسیم و تمایز این سلولها در محیط آزمایشگاهی وجود ندارد و این دلیل محکمی بر ضرورت دستیابی به روشهای مناسب جهت تسهیل کشت و تکثیر آنها در آزمایشگاه است.

تعین محل دقیق کنام SSCsمورد تردید است ولی به لحاظ فیزیکی این کنام در طول غشاء پایه لوله های سمینی فروس است، همراه با سلولهای سرتولی که در این محیط کوچک پخش شده اند. تعداد SSCs از زمان تولد تا بلوغ در موشها ۳۹ برابر میشود و بعد ثابت میماند. فاکتورهای مترشحه از سلولهای سرتولی سهم کلیدی در کنام SSCs دارند.[۱۲]

درشرایط طبیعی داخل بیضه سلولهای سرتولی بعنوان حامی و پشتیبان SSCsنقش مهمی در فراهم کردن شرایط مناسب برای بقا و رشد و تمایز SSCsبعهده دارند و این وظیفه با ترشح فاکتورهای رشد مناسب (همچون GDNF،IGF،FGF-2،TGF-ß،...) صورت میگیرد[۱۳, ۱٤]

سلولهای سرتولی، سلولهای سوماتیکی هستند که از قاعده تا رأس اپیتلیوم منی ساز گسترش دارند و بشکل مستقیم با سلولهای ژرم درحال تمایز، کنش و واکنش دارند لذا نقش مهمی درطی فرایند اسپرم زایی ایفا می کنند[۱۵] زیرا این سلولهای سوماتیک چهار چوب اپیتلیوم زاینده را ایجاد و حفظ می کنند علاوه بر این و در ساختار سد بین بیضه و خون نقش مهمی دارند[۱٦] هماهنگی بین سلولهای سرتولی و ژرم برای انجام دقیق و منظم فرایند اسپرم زایی در پستانداران اهمیت زیادی دارد، بویژه در دوره تکامل بیضه پس از تولد، یعنی زمانی که سلولهای سرتولی بطور کامل تمایز یافته اند و اولین موج تقسیم سلولهای اسپرماتوگونی اتفاق می افتد[۱۷] در طی فرایند اسپرم زایی فاکتورهای زیادی بوسیله سلولهای سرتولی و یا ژرم بیان می شود[۱۸, ۱۹]. برای مثال گیرنده تیروزین کیناز C-kitدر سلولهای ژرم بیان می شود، لیگاند این گیرنده فاکتور سلول بنیادی ((SCF است که در سلولهای سرتولی بیان می شود .کنش و واکنش بینSCF وC-kit برای تقسیم و تمایز اسپرماتوگونیای نوع A ضروری می باشد[۲۰] بقاء گونوسیت ها وابسته به کنش و واکنش هایی است که با سلولهای سرتولی دارند استراتژیهای متفاوتی در مورد نحوه حمایت سلولهای سرتولی از تمایز سلولهای ژرم وجود دارد که مهمترین آنها تنظیم محیط بین سلولی داخل لوله های منی ساز است .مواد مترشحه از سلولهای

سرتولی، سلولهای ژرم درحال میوز و سلولهای ژرمی که تقسیم میوز را پشت سر گذاشته اند، ترکیب خاصی را در بخش کنارمجرای لوله ایجاد می کند .این محیط خاص در کنترل میوز، تمایز اسپرماتید و اسپرماتوسیت ها نقش مهمی دارد .موادی که بشکل پاراکرین و اتوکرین از سلولهای سرتولی و ژرم ترشح می شود برای عملکرد طبیعی هر دو نوع سلول ضروری می باشد[۱۸]

لذا با توجه به نقش موثر سلولهای سرتولی در ایجاد کنام سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، در این مطالعه سعی بر آن است تا اثر همکشتی SSCsبا سلولهای سرتولی مشتق از موش بالغ و نا بالغ بر تکثیر و بقا و بیان مارکرهای اختصاصی آنها همچونCD29، CD49 ، C- kit بررسی شود. در پایان انتظار میرود با تعین اینکه کدام دسته از سلولهای سرتولی نقش موثرتری در حفظ خصوصیات سلولهای بنیادی دارند بتوانیم به روش کشت مناسبی برای تکثیر و حفظ خصوصیات بنیادی SSCs دست یابیم.

۲-۱-هدف اصلی این پژوهش

تعیین اینکه کدام دسته از سلولهای سرتولی (بالغ یا نابالغ) قابلیت بیشتری در حفظ خصوصیات بنیادی سلولهای اسپرماتوگونی دارند

۳-۱-اهداف ویژه :

.بررسی اثر همکشتی سلولهای سرتولی بالغ و نابالغ با SSCs در تکثیر آنها
.بررسی اثر همکشتی سلولهای سرتولی بالغ و نابالغ با SSCsدر عملکرد آنها در محیط آزمایشگاهی با استفاده از تست پیوند.
بررسی اثر همکشتی سلولهای سرتولی بالغ و نابالغ با SSCsدر بیان مارکرهای سطحی آنها

٤-۱-فرضیات اصلی پژوهش

۱- هم کشتی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ((SSCs با سلولهای سرتولی بالغ و نابالغ در تکثیر و قابلیت کلونی زایی آنها موثر است.

۲- سلولهای سرتولی نابالغ نسبت به سلولهای بالغ نقش موثرتری در حفظ خصوصیات بنیادی سلولهای اسپرماتوگونی دارند.

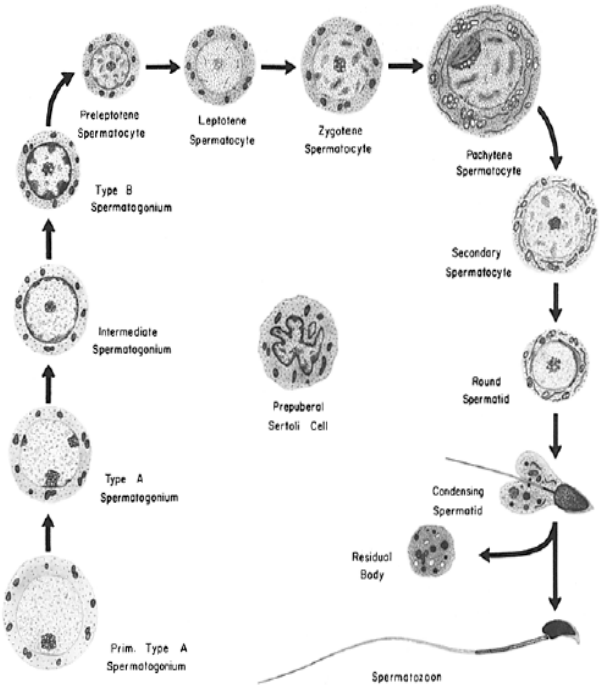
فصل دوم

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۲- سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs)

۱-۱-۲- ویژگیها:

SSCs ازجمله سلولهای بنیادی بالغی هستند که فرایند اسپرماتوژنز را در جنس نر حمایت می کنند بعلاوه تنها این دسته از سلولهای بنیادی بالغ قابلیت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد را دارند [۱۰, ۲۱, ۲۲] زیرا سلولهای اووگونی در جنس ماده پیش از تولد با تقسیمات میوزی خود وارد فرایند تمایز میشوند. اسپرماتوژنز در پستانداران در لوله های منی ساز بیضه رخ می دهد این فرایند با مجموعه ای از تقسیمات میتوزی آغاز می شود که در آن سلولهای اسپرماتوگونی واقع بر غشاء پایه تکثیر میشوند از آخرین تقسیم میتوز اسپرماتوسیتها به وجود می آیند که وارد مرحله سنتز (S) چرخه سلولی شده و سپس مرحله طولانی نخستین تقسیم میوز را سپری می کنند و در پایان تقسیم میوز دوم اسپرماتیدهای هاپلوئید بوجود می آیند که ابتدا مدور هستند اما سپس تغییر ساختار داده، کشیده میشوند تا به اسپرماتوزوا تبدیل شده وسپس لوله های منی ساز را ترک می کنند. (شکل ۱-۲)[۲۳]



شکل ۱-۲ : طرح شماتیک از فرایند اسپرماتوژنز.

۲-۱-۲-منشاء[6] سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی

[6] Origin-