بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح

موضوع

مقایسه کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و سلول‌های رده‌ی فیبروبلاست موشی (STO)

نگارنده

سیده مومنه محمدی

استاد راهنما

دکتر منصوره موحدین

استاد مشاور

دکتر مرتضی کروجی

فروردین ۱۳۸۸

تقدیم به

آنان که آفتاب را به زندگی دیگران هدیه می دهند

سپاس و قدردانی

منت خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت...

با سپاس و قدردانی از زحمات سرکار خانم دکتر موحدین، استاد راهنمای دلسوز و مهربانم، که رهنمودهای گرانقدر ایشان همچون نوری فرا راه آموزندگی و زندگی من است.

با تشکر و قدردانی از رهنمودها و همراهی ارزشمند جناب آقای دکتر کروجی، استاد مشاور ارجمندم، که سخاوت ایشان در اشاعه‌ی علم و دانش همواره قابل ستایش است.

با سپاس از استادان گرامی جناب آقای دکتر رضازاده و جناب آقای دکتر تقی‌الطریحی و سرکار خانم دکتر صالح نیا که نور معرفت و دانش این بزرگواران گرمابخش دل‌هایمان است.

افتخار همراهی و همدلی با همکلاسی‌های عزیزم، سرکار خانم‌ها مینا شربت‌اوغلی و اعظم صمیمی و جناب آقایان سید عبدوالوهاب تقوی و فرهاد پناهی را ارج می‌نهم و برای این عزیزان بهترین‌ها را آرزومندم.

قدردانی و تشکر از زحمات کارشناسان و اعضای محترم گروه، جناب آقای شهرام پوربیرانوند و سرکار خانم سعیده ابراهیمی و جناب آقای محمدلو، که همکاری ایشان قرین با دوستی و صفا بود.

با سپاس و تشکر از همسر عزیزم که یاری ایشان، به ثمر رسیدن این مجموعه را برایم سهل نمود.

با سپاس و قدردانی فراوان از همراهی خانواده‌ی عزیزم که همدلی و مهربانی آنها همواره بر یادم جاری است.

خلاصه:

مقدمه و هدف: هرچند اسپرماتوژنزیس برای باروری امری ضروری است، اطلاعات موجود درباره‌ی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اندک است. این سلول‌ها ازطریق خودتکثیری و تمایز اسپرماتوزوا را به وجود می‌آورند و در طول زندگی فرد اسپرم‌زایی را فراهم می‌کنند. سلول‌های سرتولی در لوله‌های منی‌ساز در ارتباط نزدیک با سلول‌های ژرم هستند و یک محیط مطلوب را برای اسپرم‌زایی به وجود می‌آورند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر لایه‌های تغذیه‌کننده‌ی STO و سرتولی بر کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در طول دو هفته کشت است.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه‌ی موش بالغ با استفاده از دو مرحله‌ی هضم آنزیمی جدا شدند. ماهیت سلول‌های سرتولی توسط ویمنتین و سلول‌های اسپرماتوگونی توسط نشان‌گرهای Oct-4، CDH1، PLZF و C-kit تایید شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی لایه‌های تغذیه‌کننده‌ی سرتولی و STO به مدت دوهفته کشت داده شدند. تعداد و قطر کلونی‌ها توسط میکروسکوپ معکوس در طول دو هفته کشت اندازه‌گیری شد. همچنین بیان ژن‌های β1 integrin و α6 integrin توسط تکنیک‌های RT-PCR و Real Time PCR و ژن Oct-4 توسط Real Time PCR ارزیابی شد. تحلیل آماری با استفاده از تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری، تحلیل واریانس یک‌طرفه، آزمون تعقیبی t زوجی و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در هر یک از گروه‌های هم‌کشتی با سلول سرتولی، هم‌کشتی با STO و کنترل، در متغیرهای تعداد و قطر کلونی‌ها، بین چهار نقطه‌ی زمانی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p< ۰/۰۵$)، اما تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه هم‌کشتی با سلول سرتولی نسبت به دو گروه دیگر افزایش بیشتری داشت ($p< ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که در هر یک از روزهای مورد بررسی، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p< ۰/۰۵$) و تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود ($p< ۰/۰۵$). نتایج به‌دست آمده RT-PCR نشان داد که بعد از دو هفته کشت، ژن β1 integrin در هر سه گروه بیان شد ولی ژن α6 integrin بیان نشد. همچنین بر اساس نتایج Real Time PCR، نیز سه ژن ذکر شده بیان شدند.

بحث: با توجه به اثر بهینه‌ای که سلول‌های سرتولی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با این سلول‌ها فراهم می‌کنند، که این موضوع توسط سایر مطالعات نیز تایید شده است، استفاده از سلول‌های سرتولی برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ، کلونی‌زایی، هم‌کشتی، سلول سرتولی، STO

عنوان **صفحه**

فصل اول: بیان مسئله و کلیات و مروی بر مطالعات **۱**

۱-۱) کلیاتی در مورد عملکرد و فراساختار سلول‌های بیضه ۲

۱-۲) اسپرم‌زایی ۶

۱-۳) بیان مسئله و کلیات ۸

۱-۴) اهداف ۱۰

۱-۵) فرضیه‌ها ۱۰

۱-۶) مروری بر مطالعات انجام شده ۱۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها **۱۹**

۲-۱) جداسازی و کشت سلول‌ها ۲۰

۲-۲) جدا سازی سلول‌های سرتولی ۲۲

۲-۳) جدا سازی سلول‌های اسپرماتوسیت ۲۳

۲-۴) جدا سازی سلول‌های اسپرماتوگونی ۲۳

۲-۵) شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها ۲۴

۲-۶) هم کشتی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی ۲۴

۲-۷) هم کشتی سلول‌های STO و اسپرماتوگونی ۲۵

۲-۸) کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل ۲۵

۲-۹) ارزیابی کلونی‌زایی در سلول‌های اسپرماتوگونی ۲۵

۲-۱۰) آزمون‌های ایمونوسیتوشیمی ۲۶

۲-۱۰-۱) ایمونوسیتوشیمی ویمنتین ۲۶

۲-۱۰-۲) ایمونوسیتوشیمی Oct4 ۲۷

۲-۱۰-۳) ایمونوسیتوشیمی c-kit ۲۸

۲-۱۰-۴) ایمونوسیتوشیمی PLZF ۲۹

۲-۱۰-۵) ایمونوسیتوشیمی CDH1 ۲۹

۲-۱۱) بررسی بیان ژن‌های Alpha6 integrin ، Beta1 integrin به روش RT-PCR نیمه کمی ۳۰

۲-۱۱-۱) استخراج RNA کل ۳۱

۲-۱۱-۲) اندازه‌گیری غلظت RNA ۳۳

۲-۱۱-۳) تیمار RNA با DNase ۳۴

۲-۱۱-۴) لیست پرایمرها ۳۵

۲-۱۱-۵) آماده‌سازی پرایمرها ۳۶

۲-۱۱-۶) واکنش زنجیره پلیمراز(Polymerase Chain Reaction (PCR ۳۷

۲-۱۲) بررسی بیان ژن‌های Alpha6 integrin، Beta1 integrin و Oct4 به روش Real- Time PCR ۴۰

۲-۱۳) تحلیل آماری ۴۲

فصل سوم: یافته‌ها **۴۴**

۳-۱) جداسازی و آماده‌سازی سلول‌ها ۴۵

۳-۱-۱) آماده‌سازی سلول‌های سرتولی ۴۶

۳-۱-۲) تهیه‌ی سلول‌های STO ۴۶
۳-۲) ارزیابی ایمونوهیستوشیمی ۴۷
۳-۲-۱) بررسی نشان‌گرهای اختصاصی Oct4، Plzf، C-kit و CDH1 برای سلول‌های اسپرماتوگونی ۴۷
۳-۲-۲) بررسی نشان‌گر اختصاصی ویمنتین برای سلول‌های سرتولی ۵۱
۳-۳) ارزیابی نتایج حاصل از کشت ۵۱
۳-۳-۱) مقایسه‌ی هم‌زمان تغییرات زمانی و گروه‌های مورد بررسی متغیرهای تعداد و قطر کلونی‌ها ۵۱
۳-۳-۲) مقایسه‌ی متغیرهای تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه‌ها به تفکیک هر یک از زمان‌ها ۵۲
۳-۳-۳) مقایسه‌ی تغییرات زمانی متغیرهای تعداد و قطر کلونی‌ها به تفکیک هر یک از گروه‌ها ۵۴
۳-۴) ارائه‌ی نتایج حاصل از RT- PCR ۵۸
۳-۵) ارائه‌ی نتایج حاصل از Real Time PCR ۵۹
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری و پیشنهادها **۶۱**
۴-۱) مقدمه ۶۲
۴-۲) جداسازی و آماده‌سازی سلول‌ها ۶۳
۴-۳) ارزیابی ایمونوهیستوشیمی ۶۵
۴-۳-۱) بررسی نشان‌گر اختصاصی ویمنتین برای سلول‌های سرتولی ۶۵
۴-۳-۲) بررسی نشان‌گرهای اختصاصی Oct4، C-kit، CDH1 و Plzf برای سلول‌های اسپرماتوگونی ۶۵
۴-۴) ارزیابی نتایج حاصل از کشت ۶۶
۴-۵) ارائه‌ی نتایج حاصل از Real Time PCR و RT- PCR ۷۱
۴-۶) نتایج کلی ۷۳
۴-۷) پیشنهادها ۷۴
فهرست منابع **۷۵**

فصل اول:
بیان مسئله و کلیات

۱-۱) کلیاتی در مورد عملکرد و فراساختار سلول‌های بیضه

بافت بیضه از لوله‌های منی‌ساز و مناطق بینابینی تشکیل شده است. سلول‌های سرتولی و سلول‌های جنسی درون لوله‌ها واقع شده‌اند، در حالی که سلول‌های لیدیگ در مناطق بینابینی قرار گرفته‌اند. سلول‌های جنسی شامل انواع سلول‌های اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌های اولیه، اسپرماتوسیت‌های ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآ هستند. تعامل نزدیک بین قسمت‌های بینابینی و لوله‌ای، مکانیسم کنترل داخل بیضه‌ای را تشکیل می‌دهد که اعمال بیضه‌ای مطلوب را به‌دنبال می‌آورد [۱].

سلول‌های سرتولی داخل لوله‌های سمی نفروزی قرار گرفته‌اند. آنها سلول‌های استوانه‌ای هستند که روی غشای پایه تکیه داده و تا لومن لوله‌های سمی نفروزی گسترش می‌یابند. این سلول‌ها در فواصل بین سلول‌های جنسی واقع شده‌اند و آنها (به‌جز سلول‌های بنیادی) را احاطه می‌کنند. به همین دلیل حدود نامشخص دارند. این سلول‌ها یکی از فعال‌ترین و از نظر عملکردی، از پیچیده‌ترین سلول‌های بدن هستند [۲].

غشای پلاسمایی سلول‌های سرتولی مجاور اتصالات محکمی را تشکیل می‌دهند که از یک طرف سد خونی-بیضه‌ای را تشکیل می‌دهند و از طرفی اپیتلیوم ژرمینال را به دو بخش قاعده‌ای و مجاور لومنی تقسیم می‌کند. بخش قاعده‌ای با غشای پایه مجاور است و شامل اسپرماتوگونیا و اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه است و در

صورتی‌که بخش مجاور لومنی به لومن لوله‌ای نزدیک‌تر است، و شامل اسپرماتوسیت‌های، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوا می‌باشد.

مواد موجود در خون و بافت بینابینی باید از طریق سیتوپلاسم سلول سرتولی انتقال یابند تا به سلول‌های جنسی واقع در ناحیه‌ی ادلومینال[1] برسند. این حالت تماس سلول‌های جنسی با مواد مضر موجود در جریان عمومی خون را به حداقل می‌رساند و پشتیبانی و بلوغ مطلوب سلول‌های جنسی در حال تقسیم را تضمین می‌کند.

هسته‌ی سلول سرتولی بیضوی است. اندازه‌ی هسته به‌طور متوسط بین ۹-۱۲ میکرومتر است. هسته‌ی سلول‌های بالغ دارای یک غشاء چین‌خورده، یک نوکلئوپلاسم نسبتاً همگن و یک هسته‌ی منفرد سه قسمتی می‌باشد [۳]. سلول‌های سرتولی دارای زوائد سیتوپلاسمی زیاد در بخش‌های راسی و قاعده‌ای جانبی خود هستند. زوائد راسی سلول به سمت لومن جهت‌گیری کرده، اسپرماتیدهای بالغ را در بر می‌گیرد. در جایی که سیتوپلاسم سلول سرتولی، سرهای اسپرماتید را احاطه می‌کند، تجمعات وسیعی از شبکه‌ی اندوپلاسمی صاف مشاهده می‌شود. این موضوع می‌تواند به عنوان یک حمایت اختصاصی از سلول‌های جنسی محسوب گردد. که امکان بقای اتصال بین اسپرماتیدها و سلول‌های سرتولی را فراهم می‌کند [۱ و ۲]. سیستم لیزوزمی در سیتوپلاسم به‌صورت پراکنده دیده می‌شوند. لیزوزم‌ها در تخریب سلول‌های جنسی در حال دژنره شدن و اجسام باقی‌مانده آزاد شده از اسپرماتیدها، در حین رهاسازی اسپرم دخالت دارند.

سلول‌های سرتولی یک جزء مهم از اپی‌تلیوم سمی‌نفروزی را در مهره‌داران تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها بین سلول‌های جنسی گسترش یافته‌اند تا به لومن لوله‌ی سمی‌نفروزی برسند. این یک محیط مناسب را برای اسپرماتوژنزیس یا واکنش سلول‌های سرتولی و سلول‌های جنسی فراهم می‌کند [۳].

اتصالات محکمی که سلول‌های سرتولی مجاور را به هم متصل می‌کنند، جزء ساختمانی سد خونی- بیضه‌ای را در پستانداران تشکیل می‌دهند. هر ماده‌ای با ماهیت تغذیه‌ای یا تنظیمی برای این‌که به سلول‌های جنسی موجود در بخش مجاور لومن اپی‌تلیوم دسترسی یابد، باید از میان سیتوپلاسم سلول سرتولی بگذرد [۴].

نقش سلول‌های سرتولی را می‌توان به‌صورت زیر بیان نمود:

[1] Adlominal

۱) فراهم کردن حمایت مکانیکی و تغذیه برای سلول‌های جنسی مردانه‌ی در حال رشد

۲) انتقال سلول‌های جنسی در حال توسعه در بین اپی‌تلیوم ژرمینال یا مجاری منی‌ساز

۳) تنظیم و هماهنگی پاراکرینی و تمایز سلول‌های جنسی مذکر به‌وسیله‌ی ترشح مولکول‌ها و پروتئین‌های پلی‌پپتیدی

۴) فاگوسیتوز سیتوپلاسم باقی‌مانده‌ی ارگانل‌های جدا شده در خلال اسپرماتوژنزیس سلول‌های جنسی تخریب شده و حتی اسپرماتوزوای جدا شده

۵) سنتز و متابولیسم هورمون‌های استروئیدی

۶) رهاسازی اسپرم

سلول‌های سرتولی فاکتورهای حیاتی ترشح می‌کنند که برای موفقیت فرایند اسپرم‌زایی و تمایز اسپرماتوگونیا به اسپرماتوزوا ضروری است. بر اساس مطالعه‌ی گریسولد (۱۹۹۸)، گلیکوپروتئین‌هایی که توسط سلول سرتولی ترشح می‌شود و برای اسپرم‌زایی حائز اهمیت هستند، به سه گروه تقسیم می‌شوند [۵]:

- ✓ آنهایی که عبور و مرور یون‌ها و هورمون‌ها را تسهیل می‌کنند و یا شرایطی برای حمایت زیستی فراهم می‌کنند. به عنوان مثال پروتئین متصل‌شونده به آندروژن (ABP)[1]، ترانسفرین[2] و سرولوپلاسمین[3] را می‌توان نام برد. ABP میل ترکیبی زیادی به تستوسترون دارد و مسئول حفظ مقادیر بالای تستوسترون داخل لوله‌ای است. اهمیت ترشح ترانسفرین و سرولوپلاسمین در انتقال آهن و مس به سلول‌های لوله‌ای است.
- ✓ پروتوازها و پروتوازها بازدارنده که در فرایندهای بازسازی بافت (برای مثال اسپرمیشن و یا حرکت اسپرماتوسیت‌های پرلپتوتن[4] به قسمت نزدیک لوله‌ای[5] لوله‌های منی‌ساز) نقش دارند.
- ✓ اجزای ساختاری غشای پایه بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های پری‌توبولار

[1] Androgen-binding Protein
[2] Transferrin
[3] Ceruloplasmin
[4] Proleptotene
[5] Adluminal

سلول‌های سرتولی، گلیکوپروتئین‌های دیگری نیز ترشح می‌کنند که عملکردهایی به‌صورت فاکتورهای رشد یا فاکتورهای پاراکرین دارند. به عنوان مثال فاکتور سلول بنیادی (SCF)، GDNF و اینهیبین را می‌توان نام برد. SCF گیرنده‌ی لیگاند C-kit است و عملکرد SCF-C-kit برای تمایز اسپرماتوگونی‌ها و شروع موج‌های اولیه‌ی اسپرم‌زایی ضروری است.

بافت بینابینی بیضه، حاوی سلول‌هایی تحت عنوان سلول‌های لیدیگ می‌باشد. سلول‌های لیدیگ به‌صورت منفرد یا خوشه‌ای دیده می‌شوند که توسط مویرگ‌های خونی احاطه شده‌اند. سلول‌های لیدیگ، مسئول تولید آندروژن بیضه‌ای یا به عبارت دیگر تستوسترون هستند.

سلول‌های جنسی بیضه شامل سلول‌های اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌های اولیه، اسپرماتوسیت‌های ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوا هستند. سلول‌های اسپرماتوگونی، سلول‌های بنیادی هستند و در اثر تکثیر و تمایز سایر سلول‌ها را به وجود می‌آورند.

اسپرماتوگونی‌ها را بر اساس وضعیت تمایز آنها به چند گروه تقسیم‌بندی می‌کنند؛ در جوندگان مثل رت و موش، اسپرماتوگونی‌ها در ۳ گروه قرار می‌گیرند:

۱) اسپرماتوگونی نوع A

۲) اسپرماتوگونی حد واسط

۳) اسپرماتوگونی نوع B

اسپرماتوگونی نوع A سلول‌های کروی با هسته‌ی گردی هستند که اندازه‌های متفاوتی دارند و این اختلاف اندازه ممکن است مربوط به فاز چرخه‌ی سلولی و یا روند تمایز سلول باشد. در مرکز هسته‌ی این سلول‌ها یک تا سه هستک متراکم وجود دارد که قطری حدود ۱ تا ۳ میکرومتر دارند. این سلول‌ها را بر اساس اندازه‌شان به دو دسته‌ی کوچک و بزرگ تقسیم می‌کنند. سلول‌های بزرگ یک هستک مرکزی بزرگ دارند و سلول‌های کوچک ۱ تا ۳ هستک دارند. تعداد سلول‌های بزرگ ۱۰ برابر سلول‌های کوچک است. از نظر تمایز، سلول‌های اسپرماتوگونی بزرگ تمایز یافته‌تر از سلول‌های کوچک هستند. اسپرماتوگونی‌های نوع A خود شامل اسپرماتوگونی A_0 (تمایز نیافته) و اسپرماتوگونی‌های A_1 تا A_4 (تمایز یافته) هستند. اسپرماتوگونی A_0 در اثر

تمایز به A_s، A_{pr} و A_{al} تبدیل می‌شوند. اسپرماتوگونی‌های A_s به شکل منفرد هستند. در حالی‌که A_{pr} به شکل جفت و A_{al} به شکل خطی هستند و توسط پل‌های سیتوپلاسمی به هم اتصال دارند. اسپرماتوگونی A_s سلول بنیادی فرآیند اسپرم‌زایی است. در بیضه‌ی موش سلول‌های بنیادی ۰/۳٪ کل اسپرماتوگونی‌های نوع A را تشکیل می‌دهند. در اثر تقسیم این سلول‌های بنیادی، سلول‌های دختر حاصله یا ازهم جدا شده و دو سلول بنیادی جدید ایجاد می‌شود و یا این‌که به کمک پل بین سلولی در کنار هم باقی مانده که به آن اسپرماتوگونی A_{pr}می‌گویند. اسپرماتوگونی A_{pr} زنجیره‌ای از ۴، ۶ و ۱۶ سلول را ایجاد می‌کند که به آن اسپرماتوگونی A_{al}می‌گویند. سپس اسپرماتوگونی A_{al} به اسپرماتوگونی A_1 تمایز می‌یابد و پس از ۶ تقسیم میتوزی، A_2، A_3، A_4 و سرانجام اسپرماتوگونی نوع B را ایجاد می‌کند. اسپرماتوگونی نوع B در آخرین تقسیم میتوزی به اسپرماتوسیت تبدیل می‌شود [۶، ۷ و ۸].

۱-۲) اسپرم‌زایی[1]

اسپرم‌زایی فرایندی است که طی آن سلول‌های بنیادیاسپرماتوگونی[2] پس از انجام تقسیمات میتوزی و میوزی پی‌درپی و منظم به اسپرماتوزای بالغ تبدیل می‌شوند [۹]. در پستانداران، روزانه میلیون‌ها اسپرماتوزا از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه تولید می‌شود [۱۰]. در هر بیضه انسان، $۱۰^۸$ سلول وجود دارد که از این تعداد، ۲×۱۰^۴ سلول از نوع سلول‌های بنیادی هستند [۱۱]. مدت زمانی که لازم است تا یک سلول بنیادی به اسپرم تمایز یابد در گونه‌های مختلف متفاوت است، به‌طوری که در انسان ۶۴ روز، در موش ۳۵ روز و در رت حدود ۵۳ روز طول می‌کشد [۱۲]. طی این فرایند، اسپرماتوگونیای دیپلوئید با انجام ۱۰ تقسیم میتوزی و ۲ تقسیم میوزی به اسپرماتوزای هاپلوئید تمایز می‌یابد [۱۱]. اسپرم‌زایی از یک یا چند مرکز کوچک شروع می‌شود و هر مرکز در اثر تکثیر یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی ایجاد می‌گردد [۱۲].

[1] Spermatogenesis
[2] Spermatogonial Stem Cells

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هم توانایی خودنوزایی[1] دارند و هم به سلول‌های دیگر تمایز می‌یابند [۱۳]. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها سلول‌های بدن هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند [۱۳]، در نتیجه منبع ارزشمند برای آزمایشات بیولوژیکی و تحقیقات پزشکی می‌باشند [۱۴]. اگرچه اسپرم‌زایی طبیعی تحت کنترل دقیق تقسیمات خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است، ولی آگاهی دقیق از این مکانیسم میسر نبوده و دلیل آن تعداد کم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه است که به ازای هر سه یا چهار هزار سلول یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه بالغ وجود دارد. همچنین تاکنون هیچ نشان‌گر اختصاصی و منحصر به فردی برای تشخیص و جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توصیف نشده است [۱۵].

سلول‌های بنیادی در بافت‌های مختلف بدن رفتارهای بیولوژیکی مشابهی نشان می‌دهند که این ممکن است به علت مولکول‌های اختصاصی مشابه باشد. بنابراین انتظار می‌رود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هم نشان‌گرها و مولکول‌های اختصاصی ویژه‌ای داشته باشند که شناسایی آنها را امکان پذیر می‌کند. اگرچه اطلاعات موجود درباره‌ی تمایز قابل ملاحظه است و موقعیت سلول‌های بنیادی در غشای پایه‌ی لوله‌های منی‌ساز و مورفولوژی کلی آنها شناخته شده است، ولی نشان‌گرهای اختصاصی این سلول‌ها شناخته شده نیست.

بدن دارای سیستم‌های سلول‌های بنیادی در سایر بافت‌ها مثل اپیدرم، اپیتلیال روده و هماتوپویتیک است که فرآیند تکثیر و تمایز سلولی را انجام می‌دهند. در هر بافتی، تعداد سلول‌های بنیادی نسبت به سلول‌های تمایز یافته کمتر است. این نسبت در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه نسبت به کل سلول‌های بیضه بسیار کمتر است که این موضوع جداسازی و مطالعه‌ی این سلول‌ها را مشکل می‌کند. این موضوع، منجر به پژوهش‌هایی در جهت شناسایی نشان‌گرهای ویژه‌ی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و ویژگی‌های عملکردی آنها شده است. در نتیجه، با این روش می‌توان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در محیط invitro و Invivo غنی ساخت.

[1] Selfrenew

۱-۳) بیان مسئله و کلیات

غنی‌سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت امری مهم است و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی، منبع با ارزشی از سلول‌های ژرم را فراهم می‌آورد که برای مطالعات بعدی مثل انجماد، پیوند سلول‌های ژرم برای درمان ناباروری، دستکاری ژنتیکی سلول‌های ژرم، ترانسفکت ژنی سلول‌ها و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه، بسیار با اهمیت است. بنابراین سیستم کشت باید حمایت لازم را از این سلول‌ها فراهم نماید. تاکنون سیستم‌های کشت مختلفی ارائه شده است. گرچه در این زمینه موفقیت‌هایی حاصل شده است ولی به دلیل موانع مختلف و پیچیدگی‌های کنش و واکنش سلولی هنوز جای بحث‌های زیادی باقی مانده است. در حالت کلی، کشت سلول‌های ژرم بنیادی اسپرماتوگونی مردانه به دلایل مختلف از جمله تعداد کم آنها، مشکل می‌باشد. همچنین، کاهش قابل توجهی نیز در بقای سلول‌های کشت داده شده طی هفته اول ایجاد می‌شود [۱۶]، به‌علاوه سرعت تکثیر سلولی تحت شرایط کشت، کم است و یا اصلاً وجود ندارد.

در گذشته سیستم هم‌کشتی که بتواند به شکل درازمدت تمایز و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی را حمایت کند وجود نداشت [۱۷]. طی چند سال اخیر مطالعاتی که نگهداری و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی را در محیط کشت گزارش کرده‌اند همه در یک استراتژی مشترک بودند و آن هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با یک لایه‌ی تغذیه‌کننده بود [۱۸ و ۱۹].

تا به حال سیستم‌های مختلفی برای هم‌کشتی ارائه شده است؛ برخی از پژوهش‌گران در کنار لایه‌ی تغذیه‌کننده، از فاکتورهای رشد برای حمایت سلول‌های مورد کشت استفاده نموده‌اند [۷].

سلول‌های لایه تغذیه‌کننده موادی ترشح می‌کنند که برای نگهداری و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی ضروری است. به‌کارگیری کشت هم‌زمان سلول‌ها، برای کشت سایر سلول‌های بنیادی مثل هماتوپویتیک، سلول‌های بدوی، کشت فولیکول‌ها و کشت جنین [۲۰] مفید می‌باشد.

به‌طور کلی در محیط کشتی که فاقد سرم و لایه‌ی تغذیه‌کننده باشد، سلول‌های اسپرماتوگونی نمی‌توانند بیش از یک هفته زنده بمانند [۲۱].

به هرحال، عوامل زیادی مثل فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و کنش و واکنش بین سلول‌های سرتولی[1] و سلول‌های ژرم[2]، فرآیند اسپرم‌زایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و نقص هر یک از این عوامل می‌تواند منجر به ناباروری شود [۲۲]. سلول‌های سرتولی و سلول‌های مایوئید[3]، سلول‌های سوماتیک لوله‌های منی‌ساز هستند که سلول‌های ژرم را حمایت و تغذیه می‌کنند. سلول‌های سرتولی حدود ۳ درصد از سلول‌های لوله‌های منی‌ساز را تشکیل می‌دهند و تنها سلول‌های سوماتیک هستند که ارتباط تنگاتنگ و مستقیم با سلول‌های ژرم دارند. این ارتباط تنگاتنگ سلول‌های سرتولی با سلول‌های ژرم نشان می‌دهد که سلول‌های سرتولی یک نقش کلیدی در نگهداری سلول‌های ژرم در مرحله‌ی تمایز نیافته و چندتوانی[4] دارند در حالی که فرآیند تمایز و اسپرم‌زایی را حمایت می کنند [۲۳]. سلول‌های سرتولی فاکتورهایی را ترشح می‌کنند که برای زنده‌ماندن و تکثیر سلول‌های ژرم ضروری است. به هرحال فاکتورهایی که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شوند و برای تنظیم این فرآیند ضروری هستند، شناخته نشده است. فاکتورهای مختلفی توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود؛ برای مثال SCF [5] [۲۱]. اکتیوین[6]، فاکتور رشد شبه انسولین -۱[7]، فاکتور رشد تبدیل‌کننده‌ی[8] Beta، فاکتور رشد تبدیل‌کننده‌ی Alpha [۲۲] و LIF[9]. بنابراین برای نگهداری و کشت سلول‌های ژرم در محیط کشت به صورت دراز مدت، وجود سلول‌های سرتولی ضروری به نظر می‌رسد [۲۴]. با توجه به مطالعات گذشته مبنی بر سودمند بودن لایه‌ی تغذیه‌کننده در کشت سلول‌های ژرم، این مطالعه بر آن است تا اثرات هم‌کشتی سلول‌های STO و سرتولی را بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و میزان کلونی‌زایی آنها بررسی نماید.

[1] Sertoli Cells
[2] Germ Cells
[3] Myoid
[4] Pluripotent
[5] Stem Cell Factor
[6] Activin
[7] Insulin like growth Factor-1
[8] Transforming Growth Factor
[9] Lukemia Inhibitory Factor

۱-۴) اهداف

هدف اصلی:

- بررسی میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و STO

اهداف جزئی:

- مقایسه‌ی میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و STO با یکدیگر و با گروه کنترل
- مقایسه‌ی روند زمانی تغییرات کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و STO طی زمان کشت
- بررسی بیان ژنی ژن‌های Beta1 integrin، Alpha6 integrin و Oct-4 با روش RT-PCR
- بررسی بیان ژنی ژن‌های Beta1 integrin، Alpha6 integrin و Oct-4 با روش Real Time -PCR

۱-۵) فرضیه‌ها

توان کلونی‌زایی سیستم هم کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ با سلول‌های سرتولی بیش از هم کشتی با سلول‌های STO است.

ژن‌های Beta1 integrin، Alpha6 integrin و Oct-4 در کلونی‌های حاصل از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ پس از هم کشتی با سلول‌های سرتولی بیشتر بیان می‌شوند.

۱-۶) مروری بر مطالعات انجام شده

لورا[1] و همکاران (۱۹۸۳)، سلول‌های اسپرماتوگونی رت را با سلول‌های سرتولی و بدون سرم و مواد افزودنی کشت دادند. آنها نشان دادند که زنده ماندن و حفظ سلول‌های اسپرماتوگونی با هم‌کشتی سلول‌های سرتولی افزایش می‌یابد [۲۵].

ناگانو و همکاران (۱۹۹۸)، کشت سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ و نابالغ را بررسی نمودند. آنها سلول‌های جداسازی شده از بیضه را در دو گروه مختلف با لایه‌ی تغذیه‌ی کننده‌ی STO و بدون آن کشت دادند. در گروه بدون STO، لایه‌ی سلولی کشت داده شده نازک و مناطقی از پلیت بدون سلول بودند. در حضور سلول‌های لایه‌ی تغذیه‌کننده[2]، تعداد زیادی از سلول‌های گرد به لایه‌ی تغذیه‌کننده چسبیده بودند و تعداد سلول‌های بیضه بیضه در پلیت‌های حاوی لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی STO، بیشتر از پلیت‌های بدون لایه‌ی تغذیه‌کننده بود. همچنین آنها نشان دادند که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به کمک این لایه تغذیه‌کننده، می‌توانند مدت زیادی زنده بمانند [۱۸].

هاستورپ[3] و همکاران (۲۰۰۰)، در قالب مطالعه‌ای، سلول‌های اسپرماتوگونی موش نابالغ را با لایه‌های تغذیه‌کننده‌ی STO و سرتولی در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم کشت دادند. نتایج مطالعه‌ی آنها نشان داد که درصد کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های هم‌کشتی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد که این کاهش در گروه هم‌کشتی سرتولی نسبت به گروه هم‌کشتی STO بیشتر بود [۲۶].

در سال ۲۰۰۳، ناگانو[4] و همکاران، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ و نابالغ را طی ۷ روز در محیط کشت بر روی سه گروه مختلف از سلول‌ها کشت دادند و از آنها به عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده کردند. این سه گروه شامل رده‌های مختلف سلول‌های سرتولی، فیبروبلاست و استرومای مغز استخوان بود. آنها علاوه بر هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های لایه‌ی تغذیه‌کننده، تاثیر فاکتورهای مختلف رشد را بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی بررسی نمودند. مطالعه‌ی آنها نشان داد وقتی که از یک رده از سلول‌های فیبروبلاست

[1] Lura
[2] Feeder Layer
[3] Hasthorpe
[4] Nagano

(L) استفاده کردند، میزان کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی پس از پیوند نسبت به گروه کنترل (هم‌کشتی با STO) افزایش یافت. همچنین وقتی که از لایه‌ی تغذیه کننده‌ی مغز استخوان را به‌کار بردند، میزان کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در رده‌ی Op9 افزایش یافت. اما زمانی‌که از رده‌های مختلف سلول‌های سرتولی به عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده کردند، در مقایسه با سایر گروه‌ها، کلونی‌های کمتری از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از پیوند تشکیل شد. آنها گروه فیبروبلاست را به عنوان گروه برتر پیشنهاد نمودند. آنها علاوه بر هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های لایه‌ی تغذیه‌کننده، تاثیر فاکتورهای مختلف رشد را بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت بررسی نمودند. آنها فاکتورهای مختلفی نظیر GDNF[1]، Activin A، LIF، BMP4 و bFGF را به محیط کشت اضافه کردند. افزودن ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF، بیشترین تاثیر را در افزایش و حفظ سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت داشت و از تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی جلوگیری می‌کند، بنابراین تجمعی از اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته در محیط کشت به وجود می‌آورد. افزودن Activin A، به‌طور قابل ملاحظه‌ای سلول‌های اسپرماتوگونی را در محیط کشت نسبت به گروه کنترل کاهش داد [۱۹].

ایزدیار و همکاران (۲۰۰۳)، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوع A گاو بالغ را به‌صورت طولانی مدت در محیط کشت بررسی نمودند. آنها سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در MEM و محیط غنی از پتاسیم (KSOM) کشت دادند. پس از چند روز، تک لایه‌ای از سلول‌های سوماتیک در محیط کشت ایجاد شد که برای نشان‌گر ویمنتین سلول‌های سرتولی واکنش مثبت دادند. تعداد سلول‌های بیشتری در محیط MEM نسبت به محیط KSOM زنده ماندند و شروع به رشد کردند. بعد از یک هفته کشت، در حضور ۲/۵٪ سرم، ۸۰٪ سلول‌ها زنده ماندند و شروع به تکثیر کرده‌اند. نتایج نشان داد که تنها ۲۰٪ سلول‌ها در عدم حضور سرم زنده ماندند. در کشت طولانی مدت، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شروع به تکثیر کرده و سرانجام سلول‌های اسپرماتوگونی A، کلونی تشکیل دادند. در مطالعه‌ی آنها، دو نوع کلونی در محیط کشت دیده شد؛ کلونی‌هایی با ظاهر گرد و کلونی‌های شعاعی. در کلونی‌های گرد، گیرنده‌ی C-kit، بیان نشد ولی در کلونی‌های شعاعی بیان شد. بنابراین

[1] Glial-Derived Neurotrophic Factor

کلونی‌های شعاعی در حال تمایز هستند. بعد از ۱۰۰ روز کشت سلول‌هایی با ظاهر اسپرماتوسیت و اسپرماتید در محیط دیده شد [۱۷].

اوتلی[1] و همکاران (۲۰۰۴)، فعالیت بیولوژیکی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو منجمد شده را در محیط کشت بررسی کردند. آنها این سلول‌ها را با لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی فیبروبلاست جنینی گاو، به مدت یک هفته کشت دادند و سپس به موش گیرنده پیوند زدند. آنها هم‌زمان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را نیز بدون کشت و بلافاصله پس از ذوب به موش گیرنده پیوند زدند. نتایج این مطالعه نشان داد سلول‌هایی که با لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی فیبروبلاست جنینی گاو کشت داده شده بودند، نسبت به سلول‌هایی بلافاصله بعد از ذوب به موش گیرنده پیوند شدند، کلونی‌های بیشتری داشتند [۲۷].

شینوهارا و همکاران (۲۰۰۵)، کشت طولانی مدت سلول‌های اسپرماتوگونی را در محیط کشت بررسی کردند. آنها در مطالعه‌ی خود سلول‌های اسپرماتوگونی را در دو محیط به صورت زیر کشت نمودند:

۱) محیط بدون حضور سرم و با لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش

۲) محیط حاوی سرم و بدون لایه‌ی تغذیه‌کننده

مطالعه‌ی آنها نشان داد که سلول‌های اسپرماتوگونی در محیطی که فاقد سرم یا لایه‌ی تغذیه‌کننده باشد، رشد نمی‌کند و وجود حداقل یکی از فاکتورهای مزبور ضروری است. سرم حاوی مواد ناشناخته‌ای است که روی سلول‌های اسپرماتوگونی تاثیر می‌گذارد و آگاهی درباره‌ی فاکتورهایی که تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی را تنظیم می‌کنند، محدود می‌نماید. سلول‌های تغذیه‌کننده نیز، فاکتورهایی را ترشح می‌کنند که ناشناخته هستند [۲۸].

سلول‌های سرتولی از طریق حمایت فیزیکی، ترشح فاکتورهای محلول و بیان پروتئین‌های سطحی، محیط مناسبی را برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی فراهم می‌کنند. مولکول‌های مرتبط با Ets (ERM)[2] که به‌طور گسترده در سلول‌های سرتولی و در بیضه بیان می‌شوند، برای خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ضروری هستند. موش‌هایی که یک توقف طراحی‌شده در بیان ERM داشتند، باعث کاهش در

[1] Oatly
[2] Ets Related Molecules