٩٩١٣

بسم الله الرحمن الرحيم

٩٩٤١٤

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده پزشکی

رساله دوره دکتری در رشته علوم تشریح

عنوان:

اتوگرافت سلول های اسپرماتوگونیای تازه و منجمد–ذوب شده موش بالغ پس از هم کشتی با سلولهای سرتولی و تیمار در محیط کشت با سایتوکاین های GDNF، SCF و GM-CSF به موش مدل آزواسپرمی با اشعه گاما

نگارش:
سیدمرتضی کروجی

استاد راهنما:
دکتر منصوره موحدین

استادان مشاور:
دکتر سیدجواد مولی
دکتر حمید گورابی

۱۳۸۷ /۵/ ۲۵

پاییز ۱۳۸۶

۹۹۴۱۴

دانشگاه تربیت مدرس

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم / آقای **سید مرتضی کروجی** رساله دکتری واحدی خود را با عنوان: "اتوگرافت سلولهای اسپرماتوگونیای تازه و منجمد – ذوب شده موش بالغ پس از هم کشتی با سلولهای سرتولی و تیمار در محیط کشت با GDNF ، SCF ، GM-CSF به موش مدل آزواسپرمی با اشعه گاما" در تاریخ ۸۶/۸/۲۳ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	سرکار خانم دکتر موحدین	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم			
۳- استاد مشاور اول	جناب آقای دکتر سیدجواد مولی	دانشیار	
۴- استاد مشاور دوم	جناب آقای دکتر حمید گورابی	استادیار	
۵- استاد ناظر	سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا	دانشیار	
۶- استاد ناظر	جناب آقای دکتر تقی طریحی	استاد	
۷- استاد ناظر	جناب آقای دکتر محمدرضا نوروزی	دانشیار	
۸- استاد ناظر	جناب آقای دکتر علیقلی سبحانی	استاد	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده	استاد	

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي: سید مرتضی آزاد
تاریخ و امضاء: ۸۷/۳/۲۳

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی ـ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر " دفتر نشر آثار علمی " دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر ، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته ..... است که در سال ..... دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ..... ، مشاوره ..... از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس ،تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب سید مرتضی کردی دانشجوی رشته علوم تشریح مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی

تاریخ و امضا

۸۷/۳/۲۲

تقدیم به:

همسرم، بارانی که رحمت است و شکیبائیش ستودنی.

مادرم، که مرا پرواز آموخت و امید پرواز را در من زنده می دارد.

سپاسگزاری:

سپاس خداوندگار بزرگ را که نعمت آموختن را بر من منت نهاد. اوست که اگر بخواهد می دهد و گرنه هیچ. بزرگا! سپاس بی پایان ترا سزاست.

سپاس از سرکار خانم **دکتر منصوره موحدین** استاد محترم راهنمای خوبم که همیشه همراه بود و بدون راهنمایی ایشان راه ناهموار.

سپاس ازمشاورین محترم آقایان **دکتر سیدجواد مولی و دکتر حمید گورابی** که از مشاوره های علمی آنان بهره های فراوان بردم.

سپاس از راهنماییهای راه گشای اساتید محترم بخش علوم تشریح **آقایان دکتر رضا زاده، دکتر تقی الطریحی** و **خانم دکتر صالح نیا**.

سپاس از همکاری بی ریای دوست عزیز آقای **علی جباری ارفعی** و پرسنل محترم بخش رادیوتراپی و انکولوژی بیمارستان شهدای تجریش

سپاس از کارشناسان و اعضای محترم گروه: دوست بی پیرایه و عزیزم **شهرام پوربیرانوند**، خانم **سعیده ابراهیمی** و آقای **محمدلو**.

سپاس فراوان از همکاری پژوهشکده رویان

سپاس از پدر، مادر و برادرانم که دوریم را تاب آوردند و با دعای خیرشان بدرقه ام نمودند، باشد که خدا سلامتشان دارد.

سپاس از بهترین همکلاسی های دوران تحصلیم، آقایان و خانمها: **دکتر محمدتقی قربانیان، دکتر عبدالحسین شاهوردی، دکتر بهار موقر، دکتر ماندانا بیگی بروجنی، دکتر طاهره مازوچی و** دوست بسیار عزیزم **دکتر کامران حیدری**.

سپاس از دوست عزیزم **مهندس پیمان شیرین بیان** که در مدت تحصیلم بی هیچ چشم داشتی یاریم داد تا ناهمواریهای اجتماع بر دوشم سنگینی نکند.

چکیده

مقدمه: اسپرماتوژنز فرایند پیچیده ای است که طی آن از سلول بنیادی اسپرماتوگونی تعداد زیادی اسپرم بوجود می آید. اساس این فرایند سلول های بنیادی اسپرماتوگونی است که تعداد آنها در بیضه موش بالغ محدود و قدرت تکثیر پائینی دارند. از طرف دیگر، کشت سلولهای ژرم در شرایط آزمایشگاه جهت خالص سازی و افزایش سلولهای اسپرماتوگونی برای پیوند مفید است. هدف از این مطالعه، اتوگرافت سلول های تازه و منجمد-ذوب شده اسپرماتوگونی موش بالغ پس از هم کشتی با سلول سرتولی و تیمار با سایتوکاین های SCF، GM-CSF وGDNF در محیط کشت به مدل موش آزواسپرمی شده با اشعه گاما بود.

مواد و روشها: برای آماده سازی موشهای بالغ جهت پیوند با استفاده از دستگاه درمانی کبالت، هر دو بیضه موش و محدوده اطراف آن با دوزهای متناوب (۸Gy+۱/۵، ۱۲+۱/۵ و ۱۶+۱/۵) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت و دوز منفرد ۱۴ Gy اشعه گاما کبالت پرتودهی شد. ۴، ۶ و ۸ هفته بعد از پرتودهی، ارزیابی ساختار بیضه و پارامترهای اسپرم در اپیدیدیم صورت گرفت و دوز مناسب جهت ایجاد بیضه گیرنده تعیین شد. در مرحله بعد سلولهای اسپرماتوگونی و سرتولی از موش بالغ و با استفاده از مراحل هضم آنزیمی و DSA لکتین جدا سازی شدند. ماهیت سلول ها علاوه بر ریخت شناسی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، از طریق نشانگرهای اختصاصی Oct-4 و c-kit و پیوند آنها به موش آزواسپرمی در سلول های کلونی و نشانگرهای اختصاصی ویمنتین در سلول سرتولی تأیید شد. برای تعیین شرایط مناسب کشت، تعلیق سلولی حاوی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی به صورت هم کشت با سلول سرتولی و افزودن غلظت های متفاوت از سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد SCF، GM-CSF وGDNF کشت داده شد. یک هفته پس از کشت سلولها پاساژ داده شد. در طول ۳ هفته دوره کشت، ارزیابی کلونی (اندازه گیری قطر و تعداد کلونی) در پایان هر هفته و با میکروسکوپ نوری انجام گرفت. تعیین شرایط کشت مناسب با مقایسه شرایط هم کشتی با سلول سرتولی و یا افزودن سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد انجام شد. سپس تعلیق سلولی حاوی سلولهای اسپرماتوگونی منجمد و ذوب گردید و به صورت هم کشتی با سلول سرتولی و بدون هم کشتی، کشت داده شد و سپس ارزیابی کلونی انجام گرفت. جهت اتوگرافت سلولهای اسپرماتوگونی، پس از جراحی بیضه راست موش، سلولهای آن جدا و خالص سازی گردید و در چهار گروه زیر به مدت سه هفته در شرایط آزمایشگاه کشت شد: سلولهای تازه (کنترل۱) ، سلولهای تازه هم کشت با سلول سرتولی (کنترل۲) ، سلولهای اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده (آزمون۱) ، و سلولهای اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده هم کشت با سلول سرتولی (آزمون ۲). بیضه چپ همان موش در روز بعد از جراحی با دوز ۱۴ اشعه گاما پرتودهی شد، سه هفته بعد سلول های اسپرماتوگونی حاصل از کشت با BrdU نشاندار و با غلظت 10^5 به لوله های منی ساز بیضه چپ موش پیوند شد. بیضه پیوند شده موش گیرنده ۸ هفته بعد از پیوند از نظر ساختاری و فراساختاری سلولهای ژرم مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری به کمک آزمونهای آماری انجام شد.

یافته ها:: یافته های پژوهش نشان داد: ۱) دوز ۱۴Gy اشعه گاما بطور معنی داری در مقایسه با سایر دوزهای بکار رفته در این پژوهش باعث تهی سازی (۷۶/۶٪) لوله های منی ساز شده و برای ایجاد مدل مناسب تر است. ۲) هم کشتی سلولهای اسپرماتوگونی با سلول سرتولی در مقایسه با سایر گروههای آزمون و گروه کنترل بطور معنی داری باعث افزایش قطر (۲۰۵/۸±۵۰/۱μm) و تعداد کلونی (۲۵/۱±۵/۲) در محیط کشت شد ($p<0.001$) . همچنین در بین گروههای تیمار شده با سایتوکاین و فاکتور رشد، GDNF با غلظت ۱۰۰ng/ml افزایش معنی داری را در قطر کلونی (۱۴۴/۷±۴۶/۸) نسبت به گروه کنترل (۹۵±۲۷/۴) نشان داد ($p<0.05$). ۳) ۶۸/۸٪ سلولهای تعلیق سلولی حاوی اسپرماتوگونی پس از فرایند انجماد- ذوب زنده ماندند و ایجاد کلونی نمودند. ۴) پیوند اتوگرافت سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی پس از کشت در شرایط ازمایشگاه در بیضه گیرنده باعث تولید اسپرم شد. پارامترهای موفقیت پیوند (تعداد اسپرم اپیدیدیم، وزن بیضه و تعداد لوله دارای اسپرم) در گروه پیوندی سلولهای تازه هم کشت با سلول سرتولی (کنترل۲) بطور معنی داری نسبت به سایر گروهها افزایش یافت. مقایسه بیضه های گروههای پیوند از نظر فراساختاری تفاوتی را با بیضه طبیعی نشان نداد.

نتیجه گیری: تکثیر سلول های تازه و منجمد-ذوب شده اسپرماتوگونی جدا شده از بیضه موش بالغ به کمک سیستم هم کشتی، راهی مناسب در افزایش تعداد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت بوده و اتوگرافت این سلولها می تواند موفقیت پیوند را افزایش دهد.

واژگان کلیدی: اسپرماتوگونی،کشت، انجماد، پیوند اتولوگ، موش بالغ

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

چکیده ..... ذ

فصل اول: مقدمه ۱

۱-مقدمه ۲

۱-۱- هدف اصلی ۴

۱-۲- اهداف اختصاصی ۴

۱-۲-۱-آماده سازی موش گیرنده با استفاده از اشعه گامای کبالت ۴

۱-۲-۲- جداسازی سلول های دهنده و کشت آنها ۵

۱-۲-۳-انجماد- ذوب سلول های اسپرماتوگونی و کشت آنها ۵

۱-۲-۴-پیوند اتولوگ سلول های اسپرماتوگونی موش بالغ ۵

۱-۳- فرضیه ها ۶

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده ۷

۲- مروری بر مطالعات انجام شده ۸

۲-۱- ریز محیط بیضه ونقش سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد ۸

۲-۲- کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاه ۱۰

۲-۳- بهینه سازی شرایط کشت با استفاده از سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد ۱۲

۲-۴- انجماد سلول های بنیادی اسپرماتوگونی ۱۴

۲-۵- پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونی ۱۶

۲-۶- مطالعات انجام شده در مورد آماده سازی بیضه گیرنده ۲۱

فصل سوم: مواد و روشها ۲۳

۳- مواد و روشها ۲۴

۳-۱- آماده سازی موش گیرنده با استفاده از اشعه گامای کبالت ۲۴

۳-۱-۱- مطالعه پارامترهای اسپرم در اپیدیدیم به کمک میکروسکوپ نوری ۲۴

۳-۱-۲- مطالعه ساختار بیضه به کمک میکروسکوپ نوری ۲۶

۳-۱-۲-۱- مطالعه مورفومتریک برشهای رنگ شده ۲۷

۳-۲- جداسازی سلول های دهنده و کشت آنها ۲۹

۳-۲-۱- مرحله اول هضم آنزیمی ۲۹

۳-۲-۲- مرحله دوم هضم آنزیمی ۳۰

۳-۲-۳- جدا سازی سلول های سرتولی ۳۰

۳-۲-۴- جدا سازی سلول های اسپرماتوسیت ۳۱

۳-۲-۵- جدا سازی سلول های اسپرماتوگونی ۳۱

۳-۲-۶- شمارش وارزیابی درصد حیات سلول ها ۳۱

۳-۲-۷- استفاده از صفحات تمایزی ۳۱

۳-۲-۸- هم کشتی سلول های سرتولی و اسپرماتوگونی ۳۲
۳-۲-۹- استفاده از سایتوکاین و فاکتورهای رشد در طی کشت ۳۲
۳-۲-۱۰- انجماد و ذوب سلول های اسپرماتوگونی ۳۳
۳-۲-۱۱- ارزیابی کلونی زایی در سلول های اسپرماتوگونی ۳۳
۳-۲-۱۲- آزمون های ایمونوسیتوشیمی ۳۳
۳-۲-۱۲-۱- ایمونوسیتوشیمی ویمنتین ۳۴
۳-۲-۱۲-۲- فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۳۵
۳-۲-۱۲-۳- ایمونوسیتوشیمی Oct-4 ..... ۳۵
۳-۲-۱۲-۴ - ایمونوسیتوشیمی c-kit ۳۶
۳-۲-۱۳- تأیید ماهیت سلول های اسپرماتوگونی به کمک پیوند ۳۷
۳-۲-۱۳-۱- نشاندار کردن سلول ها با BrdU در محیط in vitro وردیابی آنها پس از پیوند ۳۷
۳-۳- پیوند سلولهای اسپرماتوگونی به بیضه دهنده ۳۸
۳-۳-۱- آنالیز بیضه گیرنده بعد از پیوند ۳۸
۳-۳-۲- بررسی فراساختار سلول های پیوندی در بافت بیضه ۳۹
۳-۴- بررسی آماری ۴۱

فصل چهارم: نتایج ۴۲

۴- نتایج ۴۳
۴-۱- آماده سازی موش گیرنده پیوند ۴۳
۴-۱-۱- اثر پرتودهی گاما بر پارامترهای اسپرم اپیدیدیم ۴۳
۴-۱-۲-اثراشعه گامای کبالت بر ساختار بیضه ۴۵
۴-۲- جدا سازی سلولهای اسپرماتوگونی از بیضه دهنده ۵۰
۴-۲-۱- بررسی مورفولوژی سلولهای جدا شده به کمک میکروسکوپ نوری ۵۰
۴-۲-۲- بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز ۵۱
۴-۲-۳-بررسی نشانگرهای اختصاصی سلول های سرتولی و بنیادی اسپرماتوگونی ۵۳
۴-۲-۴-بررسی ماهیت اسپرماتوژنیک سلول ها به کمک پیوند ۵۳
۴-۳- بهینه سازی شرایط کشت و کشت سلول های تازه و منجمد ذوب شده ۵۵
۴-۳-۱- بررسی کمی کلونی زایی سلول های تازه (غیر منجمد-ذوب) در محیط in vitro ۵۵
۴-۳-۱- ۱- بررسی سلول های اسپرماتوگونی در گروه کنترل ۵۵
۴-۳-۱- ۲- بررسی سلول های اسپرماتوگونی در گروه هم کشتی با سلول سرتولی ۵۶
۴-۳-۱- ۳- بررسی سلول های اسپرماتوگونی در گروه تیمار شده باGDNF ۵۷
۴-۳-۱- ۴-بررسی سلول های اسپرماتوگونی در گروه تیمار شده باSCF ۵۸
۴-۳-۱- ۵- بررسی سلول های اسپرماتوگونی در گروه تیمار شده با GM-CSF ۵۸
۴-۳-۱- ۶- مقایسه بین گروه هم کشت با سلول سرتولی و گروه های مختلف تیمار شده با سایتوکاین و فاکتور رشد ۵۸
۴-۳-۲- بررسی کمی کلونی زایی سلول های منجمد-ذوب در محیط in vitro ۵۹
۴-۳-۲- ۱- بررسی اثر انجماد بر میزان حیات تعلیق سلولی ۵۹
۴-۳-۲- ۲- بررسی کلونی زایی در گروه آزمون یک (کشت سلول های اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده) ۶۰
۴-۳-۲-۳- بررسی کلونی زایی در گروه آزمون دو (سلول های اسپرماتوگونی منجمد- ذوب در هم کشتی . . .) ۶۰
۴-۴- پیوند سلول های کشت شده و ارزیابی موفقیت پیوند ۶۱
۴-۴-۱- ردیابی سلول های پیوندی و رده های سلولی حاصل از آنها ۶۲
۴-۴-۲- بررسی و مقایسه وزن بیضه و تعداد اسپرم اپیدیدیم در گروه های پیوندی ۶۲
۴-۴-۳- بررسی بافت شناسی برشهای بیضه در گروه های پیوندی ۶۳

۴-۵- بررسی فراساختار سلول های پیوندی در بافت بیضه ۶۵

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۶۷

۵- بحث و نتیجه گیری ۶۸
۵-۱- آماده سازی موش گیرنده پیوند ۶۹
۵-۲- بهینه سازی وتعیین بهترین شرایط مناسب کشت سلول های اسپرماتوگونی ۷۱
۵-۳- انجماد سلول های اسپرماتوگونی و کشت سلول های منجمد- ذوب ۷۵
۵-۴- ارزیابی موفقیت پیوند ۷۶
۵-۵- پیوند اتولوگ سلولهای اسپرماتوگونی ۷۷
۵-۶- نتایج کلی ۷۹
۵-۷- پیشنهادات ۸۰

منابع: ۸۱

منابع ۸۲
ABSTRACT ۹۷

فهرست جداول، تصاویر و نمودارها

عنوان ..... صفحه

جدول ۴-۱: میزان حیات اسپرم ها در اپیدیدیم موشهای پرتودهی شده با دوزهای مختلف اشعه گامای کبالت ۴۴
جدول ۴-۲: میزان تحرک اسپرم ها در اپیدیدیم موشهای پرتودهی شده با دوزهای مختلف اشعه گامای کبالت ۴۴
جدول ۴-۳: تعداد اسپرم ها در اپیدیدیم موشهای پرتودهی شده با دوزهای مختلف اشعه گامای کبالت ۴۵
جدول ۴-۴: وزن بیضه موشهای پرتودهی شده با دوزهای مختلف اشعه گامای کبالت ۴۶
جدول۴-۵: تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید($\times ۱۰^{۴}$) در لوله های منی ساز در واحد حجم ($MM^{۳}$) ۴۹
جدول ۴-۶: مقایسه میانگین تعداد کلونیها در زمان های مختلف بین گروههای کنترل و گروههای آزمون ۵۶
جدول ۴-۷: مقایسه میانگین قطر کلونیها در زمان های مختلف بین گروههای کنترل و گروههای آزمون ۵۷
جدول ۴-۸: مقایسه میانگین تعداد کلونیها در زمان های مختلف بین گروههای کنترل و گروههای آزمون ۶۰
جدول۴-۹: مقایسه میانگین قطر کلونیها معیار در زمان های مختلف بین گروههای کنترل و گروههای آزمون ۶۱
جدول۴-۱۰: درصد انواع لوله های منی ساز پس از پیوند اتولوگ ۶۴

شکل۴- ۱: انواع لوله های منی ساز و ارزیابی درصد سه نوع لوله منی ساز در گروه کنترل و گروههای تیمار شده ۴۸
شکل ۴-۲: سلول های اسپرماتوگونی پس از جداسازی در محیط کشت. تشکیل کلونی از سلول های اسپرماتوگونی ۵۱
شکل ۴-۳: سلولهای تک لایه تغذیه کننده ۵۲
شکل ۴-۴: سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ۵۳
شکل ۴-۵- ردیابی سلولهای پیوند بعد از پیوند به بیضه گیرنده ۵۴
نمودار۴-۳- بررسی اثر انجماد بر میزان حیات سلولهای تعلیق سلولی ۵۹
شکل ۴-۶-تصاویر میکروسکوپ الکترونی بافت بیضه ۶۵
شکل ۴-۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سلول اسپرماتوگونی در بیضه طبیعی و سلولهای سرتولی در قاعده لوله منی ساز ۶۶
شکل ۴-۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سلولهای اسپرماسیت اسپرماتید در لوله های منی ساز موش طبیعی و اسپرم ۶۶

نمودار ۴-۱: مقایسه A: قطر لوله های منی ساز B: قطر مجرا و C: ارتفاع اپی تلیوم آنها در گروههای تیمار شده ۴۷

فصل اول:

مقدمه

۱-مقدمه:

اسپرم زایی[1] فرآیند تکثیر و تمایز سلول ژرم نر است که از بلوغ آغاز شده و در طول دوران زندگی فرد جریان دارد [۱]. این روند پیچیده و بسیار سازمان یافته شامل تکثیر، تمایز و آپاپتوزیس می باشد که طی آن سلول های دختری در حال تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی[2]، به اسپرماتید[3] کشیده تکوین می یابد [۲]. فرآیند اسپرم زایی با تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی آغاز و با تقسیمات سلولی اسپرماتوگونی، تقسیم میوز اسپرماتوسیت ها[4] و تغییرات مورفولوژیکی در اسپرماتیدها دنبال می شود که نهایتا" منجر به تولید اسپرماتوزا[5] می گردد.

سلول های بنیادی هم دارای توانایی خود تکثیری و هم تولید سلولهایی است که قادر به تمایز می باشند. درفرد نر طبیعی فرآیند خود تکثیری و تمایز از سن بلوغ تا پیری ادامه داشته و بسیار پویا می باشد[۳، ۴]. انواع مختلف سلول های بنیادی در یک حیوان وجود دارد، اما سلول های بنیادی اسپرماتوگونی منحصر به فرد بوده چون تنها سلول بدن است که با تقسیم خود می تواند ژن ها را به سلول های فرزندان بعد از خود منتقل نماید. در نتیجه این سلول منبع ارزشمند جهت آزمایش های بیولوژیکی، پژوهش های پزشکی، فناوری دامی و اصلاح ژنتیکی از طریق دستورزی سلول ژرم نر می باشد[۵].

اسپرماتوگونی ها بر روی غشاء پایه لوله های منی ساز قرار دارند بنابراین در همان محل تقسیم و تمایز می یابند. آنها درصد خیلی کمی از سلول های بیضه ها را تشکیل می دهند. تقریبا" $۱۰^{۸}$ سلول در بیضه موش وجود دارد که تقریبا" ۲×۱۰^{۴} عدد از آن، سلول بنیادی می باشد[۶].

عوامل زیادی مثل: فاکتورهای رشد، هورمونها و کنش و واکنش بین سلول های سرتولی و سلول های ژرم، فرآیند اسپرم زایی را تحت تاثیر قرار می دهند. نقص هر یک از این عوامل می تواند منجر به ناباروری شود [۷]. امروزه کشت سلول های اسپرماتوگونی، انجماد و پیوند آنها راه جدیدی است که به کمک آن می توان بیولوژی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل مؤثر در ناباروری را بهتر مورد مطالعه قرار داد [۸].

روش انجماد بهترین روش برای نگهداری طولانی مدت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی می باشد. یکی از کاربردهای انجماد، تامین سلولهای زایا در بیماران جوان با سرطان بیضه است که تحت درمان شیمی درمانی یا اشعه درمانی قرار می گیرند. در این کودکان که هنوز اسپرم زایی آغاز نشده است، می توان فعالیت اسپرماتوژنیک آنها را با نگهداری سلول های بنیادی در نیتروژن مایع و پیوند مجدد به بیضه ها حفظ کرد. این روش احتمالا" تنها راه حفظ باروری این بیماران جوان است که در آنها تولید اسپرم

---

[1] Spermatogenesis
[2] Spermatogonial stem cells
[3] Spermatid
[4] Sprematocytes
[5] Spermatozoa

امکان پذیر نیست[۱]. انجماد اسپرماتوگونی در موش، رت، همستر، خرگوش، سگ، گوساله، خوک و اسب انجام شده است این دستاوردها نشان می دهد که سلول های بنیادی اکثر گونه ها می تواند به منظور حفظ اسپرم زایی منجمد گردد[۱].

در دهه های گذشته اکثر پژوهشگران تلاش های زیادی را در خصوص اسپرم زایی پستاندارن در محیط آزمایشگاهی انجام داده‌اند. اگر چه هدف نهایی اسپرم زایی کامل در محیط آزمایشگاه، حاصل نشده اما پیشرفتهای زیادی در این زمینه صورت گرفته است. در شرایط محیط کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی تنها سلول هایی هستند که قادر به ایجاد کلونی می باشند. لذا تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بدلیل تعداد بسیار کم آنها تحت سیستم محیط کشت خوب ابزار مهمی جهت پژوهش و همین طور روش درمانی برای ترمیم و تولید مجدد اسپرم زایی در افراد نابارور است[۱].

تاکنون تلاشهای زیادی جهت بهبود شرایط محیط کشت به منظور افزایش بقا سلول ها و تکثیر آنها صورت گرفته است. ولی بدلیل عدم آگاهی از نیازهای تغذیه ایی این سلول ها موفقیت چشمگیری مشاهده نشده است. در سیستمهای کشت بدون سرم توانایی زنده ماندن در طی هفته اول ۲۰ –۳٪ کاهش می یابد[۹، ۱۰] و در طی چند روز همه آنها می میرند. افزودن سرم و نگهداری سلول های ژرم بر روی لایه تغذیه کننده درصد زنده ماندن را بهبود داده است. بعلاوه، افزودن ترکیبی از فاکتورهای رشدمختلف در شرایط کشت بدون سرم باعث بهبود خفیف و استفاده از محیط کشت های اختصاصی مانند KSOM (محیط غنی از پتاسیم) نیز درصد زنده ماندن را افزایش داده است[۱۰]. افزودن سایتوکاین ها و فاکتور های رشد تا حدودی به بهبود محیط کشت و در نتیجه تکثیر و زنده ماندن این سلول ها کمک کرده است ولی در مورد نقش و اهمیت آنها در تکثیر اختلاف نظر وجود دارد. سایتوکاین ها و فاکتور های رشد متعددی توسط سلولهای سرتولی و بافت بینابینی بیضه ترشح می شود که استفاده آنها بعنوان مکمل در محیط کشت احتمالا به بهبود شرایط کمک خواهد کرد. بیان GM – CSF[1] در بیضه بالغین گزارش شده است[۱۱]. این سایتوکاین بوسیله ماکروفاژهای بیضه ایی در محیط کشت تولید می شود[۱۲] و گیرنده آنها بر روی سلول های ژرم نر قرار دارد[۱۳]. فاکتور سلول بنیادی[2]، لیگاند گیرنده c-kit، با دامنه وسیعی از فعالیتهای بیولوژیکی است که توسط سلول سرتولی بیان شده و با گیرنده c-kit مستقر بر سطح اسپرماتوگونی نوع A کنش و واکنش دارد. فاکتور نوروتروفیکی سلول گلیال[3] (GDNF) نیز توسط سلول های سرتولی تولید می شود[۱۴-۱۶] و با اتصال به گیرنده خود بر سطح سلول های اسپرماتوگونی باعث پاسخ های درون سلولی می شود.

فناوری پیوند اسپرماتوگونی تحول نوینی را در پژوهش بر روی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی ایجاد نمود. پیوند اسپرماتوگونی اولین بار توسط برینستر[4] (۱۹۹۴) و همکاران ابداع گردید. آنها تعلیق سلول

[1] Granulocyte macrophage colony stimulating factor
[2] Stem cell factor
[3] Gial- drived neurotrophin factor
[4] Brinster

های ژرم را به لوله های منی ساز موش فاقد سلول ژرم تزریق نموده و مشاهده کردند که سلول بنیادی اسپرماتوگونی موش دهنده قادر به شروع مجدد اسپرم زایی در موش گیرنده است[۱۷، ۱۸]. حضور قطعی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در یک جمعیت سلولی می تواند با پیوند این سلول ها به گیرنده آزواسپرمی مشخص گردد[۱۹، ۲۰]. اسپرم زایی حاصل از سلول بنیادی اسپرماتوگونی موش دهنده فعالیت بیولوژیکی و تعداد تقریبی این سلول ها را در جمعیت نشان می دهد[۲۱، ۲۲]. این ارزیابی وسیله خوبی برای پژوهش در زمینه بیولوژی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در گونه های مختلف است[۲۳-۲۵] .

برخی محدودیتها در پیوند بین گونه های مختلف وجود دارد. به نظر می رسد که هر چه قرابت فیلوژنیک بین حیوان دهنده و گیرنده کمتر باشد احتمال اسپرم زایی کامل در پیوند اسپرماتوگونی نیز کمتر است. بنظر می رسد پیوند اتوگرافت بتواند راه مناسبی در ایجاد اسپرم زایی کامل باشد.

برای موفقیت در پیوند، بیضه موش گیرنده بایستی فاقد اسپرم زایی درونزا بوده و یا میزان آن ناچیز باشد. لذا در آزمایشگاه با ایجاد مدل آزواسپرمی به مطالعه تکثیر و تمایز سلول های پیوندی می پردازند. تاکنون برای ایجاد مدل آزواسپرمی روشهای مختلفی از جمله استفاده از موش های با موتاسیون طبیعی و درمانهای گنادوتوکسیک استفاده گردیده است. چندین ماده سیتوتوکسیک مورد استفاده در شیمی درمانی و همچنین اشعه یونیزه کننده باعث تخریب سلول های بنیادی اسپرماتوگونی درونزاد می شود که در اثر تخریب سلول های ژرم، فضایی در بخش قاعده ای لوله های منی ساز برای سلول های پیوندی فراهم می شود[۵]. اثرات اشعه بسته به میزان دوزآن بوده و منجر به مهار موقت و یا دائم اسپرم زایی می گردد[۲۶]. لذا با توجه به مطالعات انجام شده اهداف و فرضیه های این پژوهش به شرح زیر می باشد:

۱-۱- هدف اصلی:

- اتوگرافت سلول های تازه و منجمد-ذوب شده اسپرماتوگونی موش بالغ پس از هم کشتی با سلول سرتولی و تیمار با سایتوکاین های SCF، GM-CSF وGDNF در محیط کشت به مدل موش آزواسپرمی شده با اشعه گاما

۱-۲- اهداف اختصاصی:

۱-۲-۱-آماده سازی موش گیرنده[1] با استفاده از اشعه گامای کبالت ۶۰:

[1] Recipient

- تعیین اثر اشعه گاما با دوزهای متناوب (۱/۵+۸Gy ، ۱/۵+۱۲ و ۱/۵+۱۶) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت و دوز منفرد Gy ۱۴ بر پارامترهای اسپرم در اپیدیدیم موش بالغ (۸-۶ هفته ای) بعد از ۴، ۶ و ۸ هفته.
- تعیین اثر اشعه گاما با دوزهای متناوب (۱/۵+۸ Gy ، ۱/۵+۱۲ و ۱/۵+۱۶) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت و دوز منفرد ۱۴Gy بر پارامترهای ساختاری بیضه موش بالغ (۸-۶ هفته ای) بعد از ۴، ۶ و ۸ هفته.
- تعیین مناسب ترین زمان و دوز موثر اشعه گاما با حداقل اثرات جانبی و حداکثر تهی شدگی سلول های ژرم

۱-۲-۲- جداسازی سلول های دهنده[1] و کشت آنها

- تعیین روش مناسب جداسازی سلول های اسپرماتوگونی از سایر سلول های لوله های منی ساز موش بالغ
- تعیین ماهیت سلول های جدا شده حاصل از کشت سلولی
- تعیین اثر هم کشتی با سلول های سرتولی و افزودن سایتوکاین ها و فاکتور های رشد بر غنی سازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ
- تعیین بهترین شرایط افزاینده تعداد سلول های اسپرماتوگونی در طی مدت زمان کشت

۱-۲-۳-انجماد- ذوب سلول های اسپرماتوگونی و کشت آنها:

- تعیین درصد حیات سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ پس از انجماد- ذوب
- تعیین اثر انجماد- ذوب بر تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ در محیط کشت

۱-۲-۴-پیوند اتولوگ سلول های اسپرماتوگونی موش بالغ:

- تعیین ظرفیت سلول های ژرم هم کشت با سلول های سرتولی بیضه یک طرف موش بالغ پس از پیوند آنها به بیضه طرف مقابل
- تعیین ظرفیت سلول های ژرم منجمد- ذوب شده هم کشت با سلول های سرتولی بیضه یک طرف موش بالغ پس از پیوند آنها به بیضه طرف مقابل
- تعیین تغییرات فراساختاری سلول های ژرم پس از پیوند اتولوگ
- تعیین رده سلولی حاصل از پیوند اتولوگ سلول های بنیادی اسپرماتوگونی

---

[1] Donor

۱-۳- فرضیه ها:

- پرتودهی دهی از نوع گامای کبالت به بیضه موش بالغ، میتواند موش مدل آزواسپرمی ایجاد کند.
- جدا سازی سلول های ژرم از بیضه یک طرف موش بالغ و بهبود شرایط کشت آنها و سپس پیوند به بیضه طرف مقابل همان موش مدل آزواسپرمی، باعث از سر گیری اسپرم زایی می گردد.
- پس از انجماد- ذوب، این سلول ها همچنان توانایی از سرگیری اسپرم زایی را دارا خواهند بود.

فصل دوم:
مروری بر مطالعات انجام شده

۲- مروری بر مطالعات انجام شده

۲-۱- ریز محیط[1] بیضه ونقش سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد:

در پستانداران اسپرم زایی در لوله های منی ساز انجام می گیرد. این لوله ها از سلول های سرتولی و رده های مختلف سلول های ژرم تشکیل شده است و توسط سلول های میوئیدی دورلوله ایی در بر گرفته می شود. سلول های سرتولی در قاعده لوله قرار دارد اما زوائد سیتوپلاسمی آنها تا مجرای لوله کشیده شده است. بعد از شروع تمایز سلول ژرم در زمان بلوغ، توانایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در خود نوسازی و یا تمایز به سایر رده های سلول ژرم، فرآیند اسپرم زایی را حفظ می کند [۲۷]. برای بقای توانایی سلول های بنیادی بالغ، نیاز به محیط ویژه ایی است که فاکتورها و کنش واکنشهای لازم را برای حفظ و پتانسیل آنها فراهم آورد. این ریز محیط سرنوشت سلول بنیادی را بوسیله جلوگیری از تمایز آنها حفظ نموده و غالبا شامل: سلول های تمایز یافته و بنیادی مجاور و ماتریکس خارج سلولی اطراف این سلول ها است. ریز محیط سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در طول غشا پایه لوله های منی ساز قرار دارد و سلول های سرتولی در تشکیل این ریز محیط نقش بسزایی دارد. این سلول ها تکوین سلول های ژرم را با ترشح فاکتورهای رشد، سایتوکاین ها [۲۸] و برخی فاکتورها نظیر لاکتات و پیروات تنظیم می کند[۲۹،۳۰]. پیوند سلول بنیادی اسپرماتوگونی راهکاری را به منظور بررسی مشخصات این ریز محیط فراهم می کند.

اسپرم زایی از یک یا چند مرکز کوچک شروع می شود و هر مرکز در اثر تکثیر یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی ایجاد می گردد [۳۱]. سلول اسپرماتوگونی در جوندگانی مثل رت و موش به اسپرماتوگونی نوع A، بینابینی و گروه B گروه بندی می شود. اسپرماتوگونی های نوع A خود شامل اسپرماتوگونی A_0 (تمایز نیافته) و اسپرماتوگونی های A_1-A_4 (تمایز یافته) هستند. اسپرماتوگونی A_0 در اثر تمایز به اسپرماتوگونی هایA_s، A_{pr} و A_{al} تبدیل می شود. اسپرماتوگونی های A_s به شکل منفرد هستند در حالی که اسپرماتوگونی A_{pr} به شکل جفت و A_{al} به شکل زنجیری بوده و توسط پل های سیتوپلاسمی به هم اتصال دارند [۳۲]. اسپرماتوگونی A_s سلول بنیادی فرآیند اسپرم زایی است [۳۳].

فرآیند اسپرم زایی شامل سه فاز متفاوت است:

- فاز تکثیر اسپرماتوگونی
- فاز میوزی
- فاز اسپرماتوژنیک[2] (تولید اسپرم)

فاز تکثیر اسپرماتوگونی با تکثیر و تقسیم میتوزی سلول های اسپرماتوگونی روی غشاء پایه لوله های منی ساز آغاز می گردد و تا تقسیم اسپرماتوگونی B برای تولید اسپرماتوسیت های پری لپتوتن انجام

---

[1] Microinviroment
[2] Spermatogenic