بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده دامپزشکی
گروه پاتوبیولوژی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

عنوان

میزان زنده‌مانی و تغییرات فراساختاری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند نژاد قزل پس از انجماد در محیط انجمادی حاوی غلظت‌های مختلف FBS

اساتید راهنما

دکتر جواد اشرفی هلان

دکتر بابک قاسمی پناهی

اساتید مشاور

دکتر غلامعلی مقدم

دکتر سجاد جعفرزاده

پژوهشگر

شیما طریقی

بهمن ۱۳۹۲

نام خانوادگی: **طریقی** نام: **شیما**

عنوان: **میزان زنده‌مانی و تغییرات فراساختاری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند نژاد قزل پس از انجماد در محیط انجمادی حاوی غلظت‌های مختلف FBS**

اساتید راهنما: **دکتر جواد اشرفی هلان** **دکتر غلامعلی مقدم**

اساتید مشاور: **دکتر بابک قاسمی پناهی** **دکتر سجاد جعفرزاده**

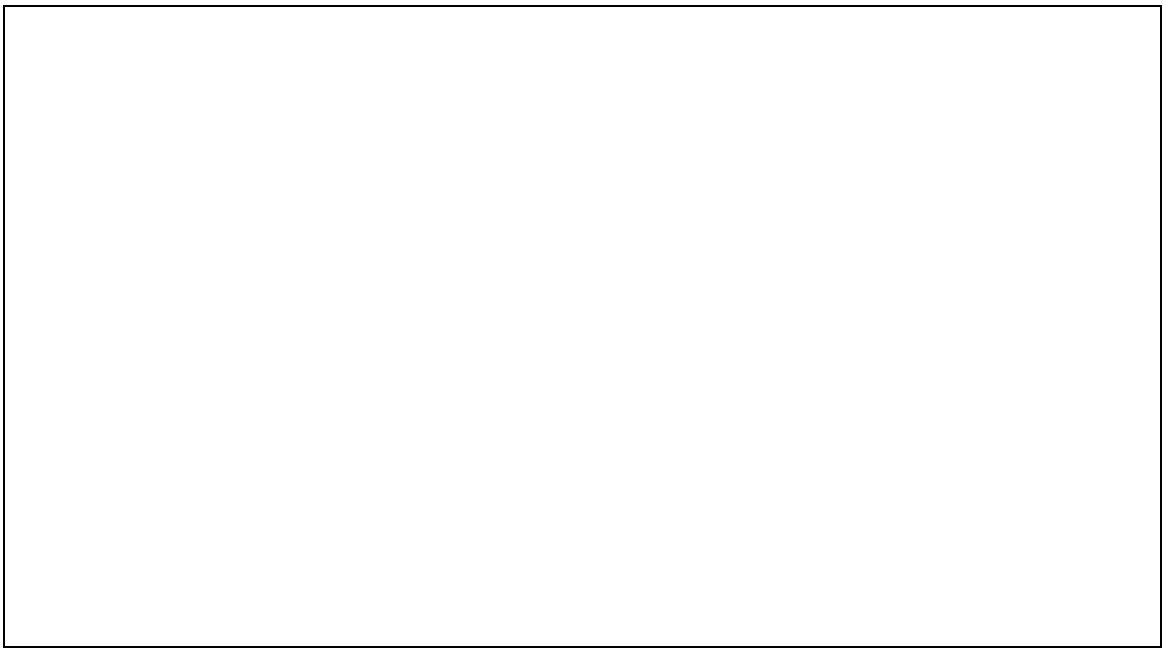
مقطع تحصیلی: **دکترای حرفه‌ای** رشته : **دامپزشکی** دانشگاه : **تبریز**

دانشکده: **دامپزشکی** تاریخ فارغ‌التحصیلی : **۱۳۹۲/۱۱/۱۲** تعداد صفحات: **۱۱۷**

کلید واژه‌ها: **سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، گوسفند، نژاد قزل، انجماد، تغییرات فراساختاری، میزان زنده‌مانی**

چکیده: در مطالعه حاضر، سلول‌های بیضه با استفاده از دو مرحله هضم آنزیمی از بیضه ۴ راس بره حدود ۲ ماهه نژاد قزل استخراج شد. نمونه گیری از بیضه به روش TESE صورت گرفت. پس از تائید شدن ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی موجود در سوسپانسیون سلولی حاصل با انجام آزمایش ایمونوسیتوشیمی گیرنده‌های Oct-4 و PLZF و ویمنتین، این سلول‌ها به مدت ۱۲ روز در شرایط آزمایشگاه کشت داده شده و در قالب سه گروه انجمادی برای مدت ۱ ماه در محیط انجمادی حاوی ماده محافظ کننده در برابر سرمای DMSO و FBS به روش انجماد آهسته در دمای -۱۹۶ درجه سانتی‌گراد و در نیتروژن مایع منجمد گردید. گروه‌های انجمادی ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد FBS بودند. میزان DMSO موجود در تمامی گروه‌ها ۱۰ درصد در نظر گرفته شده بود. سلول‌ها پس از گذشت ۱ ماه با روش ذوب سریع و در حمام آب حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد از انجماد خارج شد. پس از ذوب سلول‌ها درصد زنده‌مانی سلول‌ها به وسیله رنگ آمیزی تریبان بلو مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس سلول‌ها تثبیت شده و از نظر میزان آسیب وارده بر سلول‌ها در اثر انجماد، توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصله نشان دهنده کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از انجماد بود. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که افزایش میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از انجماد دارای ارتباط مستقیمی با افزایش میزان FBS موجود در محیط انجمادی می‌باشد (به ترتیب ۶۴/۱۲٪، ۶۷/۰۳٪ و ۷۲/۴۱٪ برای قبل از انجماد وگروه‌های ۱، ۲ و ۳). این در حالی است که در مطالعه مقاطع نیمه نازک رنگ آمیزی شده با تولوئیدن بلو و گرید های الکترونی تهیه شده با افزودن FBS به میزان ۷۰٪ در محیط انجمادی، کاهش قابل ملاحظه ای از تغییرات آسیب شناختی مشاهده گردید. لازم به یادآوری است که با افزودن FBS به میزان ۹۰٪ تغییرات آسیب شناختی شدیدتر از گروه دوم (۷۰٪ FBS) ولی کمتر از گروه اول (۵۰٪ FBS) قابل مشاهده بود.



فهرست مطالب

مقدمه ۱

کلیات ۴

۲-۱ بافت شناسی بیضه ۵

۲-۱-۱ بیضه ۵

۲-۱-۲ ساختمان لوله‌های سمینی‌فر ۵

۲-۱-۳ سلول‌های اسپرماتوگونی ۶

۲-۱-۴ سلول‌های سرتولی ۸

۲-۱-۵ بافت بینابینی ۱۰

۲-۱-۶ سلول‌های لیدیگ ۱۱

۲-۱-۷ سد خونی بیضوی ۱۲

۲-۲ سازمان اسپرماتوژنز ۱۳

۲-۲-۱ اسپرماتوژنز ۱۴

۲-۲-۲ میوز ۱۵

۲-۲-۳ اسپرمیوژنز ۱۶

۲-۲-۴ اسپرمیشن ۱۸

۲-۳ فراساختار بیضه ۱۸

۲-۳-۱ سلول‌های اسپرماتوگونی ۱۸

۲-۳-۲ اسپرماتوسیت ۲۰

۲-۳-۳ اسپرماتید ۲۰

۲-۳-۴ اسپرماتوزوآ ۲۰

۲-۳-۵ سلول‌های سرتولی ۲۱

۲-۳-۶ سلول‌های لیدیگ ۲۲

۲-۳-۷ تغییرات مربوط به بروز آپوپتوز در فراساختار بیضه ۲۲

۲-۴ سلول‌های بنیادی بیضه ۲۴

۲-۴-۱ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ۲۴

۲-۴-۲ کنام ۲۶

۲-۴-۳ اهمیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ۲۹

۲-۵ کشت و جداسازی سلول ها ۳۵

۲-۵-۱ کشت ۳۵

۲-۵-۲ جداسازی ۳۹

۲-۶ سرم جنین گاو ۴۴

۲-۷ انجماد ۴۷

۲-۷-۱ تغییرات ساختاری اعمال شده بر بافت بیضه در طول رشد ۴۷

۲-۷-۲ روش‌های به کار رفته برای نگهداری بافت بیضه در سرما ۵۰

۲-۷-۳ بیوفیزیک نگهداری در سرما ۵۱
۲-۷-۴ آسیب‌های ناشی از انجماد ۵۲
۲-۷-۵ مکانیسم محافظتی و سمیتی مواد محافظت کننده در برابر سرما ۵۳
۲-۷-۶ انتخاب روش مناسب نگهداری در سرما ۵۶
۲-۷-۷ موارد استفاده از روش انجماد سلولی ۵۷
۲-۸ گوسفند نژاد قزل ۵۸
۲-۸-۱ پراکنش ۵۹
۲-۸-۲ خصوصیات ظاهری ۵۹
۲-۸-۳ ویژگی‌های نژاد قزل ۶۰
۲-۸-۴ خصوصیات تولیدی ۶۰

مواد و روش کار ۶۱

۳-۱ جداسازی و کشت سلول ها ۶۲
۳-۱-۱ اخذ نمونه ۶۲
۳-۱-۲ جداسازی ۶۳
۳-۱-۳ مراحل کشت و پاساژ سلولی ۶۴
۳-۲ انجماد و ذوب سلول ها ۶۵
۳-۲-۱ انجماد سلول ها ۶۵
۳-۲-۲ ذوب سلول‌ها ۶۶
۳-۳ بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۶۶
۳-۴ تأیید ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی به وسیله ایمونوسیتوشیمی ۶۷
۳-۵ میکروسکوپ الکترونی ۶۸
۳-۵-۱ روش کار ۶۸
۳-۵-۲ مشاهده نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری و الکترونی ۷۶

نتایج ۷۷

۴-۱ هم‌کِشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی ۷۸
۴-۲ تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی ۸۰
۴-۳ تاثیر سرما بر زنده‌مانی سلول‌ها ۸۲
۴-۴ مطالعه به وسیله میکروسکوپ نوری ۸۳
۴-۵ مطالعه به وسیله میکروسکوپ الکترونی ۹۱

بحث و نتیجه‌گیری ۹۷

منابع ۱۰۹

فصل اول:

مقدمه

کشت و نگهداری موفقیت آمیز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط داخل آزمایشگاه یکی از مسائل مهم در بیوتکنولوژی تولید مثل می‌باشد. در صورت رسیدن به این هدف پیشرفت‌های بزرگی در زمینه تکنیک‌های پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، تولید حیوانات تراریخته[۱]، درمان ناباروَری در بیماران سرطانی و آزوسپرمیک و نیز استفاده از این سلول‌ها در مهندسی بافت[۲] حاصل خواهد آمد. متاسفانه در برخی بیماران به دلیل وقوع وقفه در پروسه اسپرماتوژنز، امکان اخذ مایع منی و استفاده از آن در تکنیک‌های کمک باروَری[۳] وجود نداشته و بنابراین استخراج و نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی این بیماران بهترین روش درمانی برای بازگرداندن قدرت باروَری به آن‌ها می‌باشد. همچنین روش نگهداری سلول‌های زایا در سرما به عنوان مؤثرترین روش برای نگهداری این سلول‌ها جهت استفاده در پیوند مطرح می‌باشد. امروزه همراهی روش کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با انجماد سلول‌ها در حضور مواد محافظت کننده در برابر سرما به عنوان روشی منحصر به فرد و احتمالا بهترین روش نگهداری این سلول‌ها برای مدت طولانی می‌باشد اما با این وجود هنوز تکنیک مناسب نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در سرما و نیز تاثیر این روش بر روی ساختار و عملکرد سلول‌های زایا هنوز کاملا شناخته نشده است.

شناسایی صحیح سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیاز به تهیه جمعیت سلولی غنی از سلول‌های زایای نر می‌باشد. امروزه جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تبدیل به یک روش برای مطالعه فاکتورهای کنترل کننده توسعه و تمایز این سلول‌ها شده است. محققان با استفاده از این گونه روش‌ها موفق به جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات مزرعه با درصد خلوص ۷۵٪ شده‌اند.

با این حال توجه به امکان تحت تاثیر قرارگیری رفتار یا سرنوشت سلول در نتیجه دستکاری‌هایی از جمله اتصال بیومارکرها (آنتی‌ژن‌ها و رسپتورها در داخل و یا روی سلول) توسط آنتی‌بادی‌ها دارای اهمیت می‌باشد. بنابراین وجود روشی برای جداسازی سلول‌ها بدون لزوم دستکاری آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار

---

[۱] TRANSGENIC

[۲] REGENERATIVE MEDICINE

[۳] ASSISTED REPRODUCTION TECHNOLOGY

است. امکان تشخیص و جداسازی سلول‌های زایای ابتدایی و گونوسیت‌ها با استفاده از مورفولوژی به اثبات رسیده است. مطالعات مورفولوژیک سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نشان داده‌اند که این سلول‌ها شبیه به فرم تمایز نیافته سلول‌های اسپرماتوگونی می‌باشند، اما تا به حال امکان استفاده از این روش برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دلیل شباهت بالای این سلول‌ها به دیگر سلول‌های اسپرماتوگونی به اثبات نرسیده است.

فصل دوم:

کلیات

۲-۱ بافت شناسی بیضه

۲-۱-۱ بیضه

بیضه‌ها یا گنادها به عنوان محل تولید گامت نر، به تعداد یک زوج در تمامی پرندگان و پستانداران مشاهده می‌گردند. در اغلب پستانداران بیضه‌ها در طول دوره جنینی و یا زمان کوتاهی پس از تولد به داخل کیسه بیضه در خارج از بدن نزول پیدا می‌کنند. هر بیضه توسط کپسولی از بافت همبند متراکم به نام لایه آلبوژینه پوشیده شده است که در سطح خلفی بیضه ضخیم شده و مدیاستینوم بیضه را ایجاد می‌کند. تیغه‌های ظریفی از مدیاستینوم جداشده و با نفوذ به درون بافت بیضه، هر بیضه را در انسان به حدود ۲۵۰ لبول تقسیم می‌کنند که لوله‌های سمینی‌فر در داخل این لبول‌ها قرار دارند و این لوله‌ها محل تشکیل سلول جنسی نر می‌باشند. لوله‌های سمینی‌فر توسط بافت همبندی غنی از اعصاب و عروق خونی و لنفی محصور شده اندکه این بافت همبند حد فاصل لوله‌های سمینی‌فر حاوی سلول‌های بینابینی یا لیدیگ می‌باشد که وظیفه ترشح هورمون تستوسترون را به عهده دارند.

۲-۱-۲ ساختمان لوله‌های سمینی‌فر

لوله‌های سمینی‌فر لوله‌های پر پیچ و خمی هستند که محل تولید اسپرم‌ها محسوب می‌شوند. لوله‌های سمینی‌فر شامل اپیتلیوم ژرمینال و بافت دور لوله ای[۱] یا همان آستر[۲] می‌باشند [۵۰۶۳].

اپی تلیوم ژرمینال حاوی دو نوع سلول، (۱) سلول‌های جنسی (اسپرماتوژنیک) و (۲) سوماتیک (سرتولی) می‌باشد.

۱- سلول‌های اسپرماتوژنیک شامل سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه و اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآها می‌باشد.

---

[۱] PERITUBULAR TISSUE

[۲] LAMINA PROPRIA

۲- سلول‌های سرتولی که در طول دوران جنینی از اپیتلیوم سطحی گنادهای در حال تکامل تمایز پیدا می‌کنند. سلول‌های سرتولی به وسیله اتصالات محکم به هم متصل شده و در نهایت موجب تقسیم لوله‌های سمینی‌فر به دو بخش قاعده‌ای و مجاور مجرایی[1] می‌شوند. این اتصال محکم اساس سد خونی بیضوی را تشکیل می‌دهد. سلول‌های اسپرماتوژنیک طی تکامل در مرحله پره لپتوتن[2] با عبور از این سد در قسمت مجاور مجرایی قرار گرفته 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.

۳-۱-۲ سلول‌های اسپرماتوگونی

سلول‌های زایای بیضه نابالغ هنگام بلوغ دوباره فعال شده و وارد چرخه میتوزی می‌شوند و از آن پس تحت عنوان سلول‌های اسپرماتوگونی A_1 شناخته می‌شوند. شروع مجدد میتوز در سلول‌های اسپرماتوگونی نشانگر آغاز پروسه اسپرماتوژنز می‌باشد. باید دانست که تمامی سلول‌های اسپرماتوگونی فعال نمی‌شوند بلکه برخی از آن‌ها در وضعیت غیر فعال و استراحت باقی می‌مانند که قادرند بعداً فعال گردند. اسپرماتوگونی A_1 تحت یکسری تقسیمات میتوزی محدود قرار می‌گیرد و این تقسیمات منجر به پدید آمدن یک کلونی از سلول‌های دختری می‌شود.

مورفولوژی سلول دختری حاصله از تقسیم میتوز متفاوت از سلول مادری می‌باشد و به همین دلیل می‌توان نوع اسپرماتوگونی ویژه‌ای که در هر مرحله از تقسیم میتوزی قرار دارد را مشخص نمود. برای مثال اسپرماتوگونی‌های حاصل از سه تقسیم اول میتوزی A_{1-4}، پس از تقسیم چهارم میتوزی، اسپرماتوگونی

[1] ADLUMINAL
[2] PRELEPTOTENE

بینابینی[۱] و پس از تقسیم پنجم، اسپرماتوگونی نوع B خوانده می‌شوند. تمامی اسپرماتوگونی‌های نوع B نیز تقسیم شده و سلول‌های اسپرماتوگونی اولیه در حال استراحت[۲] را به وجود می‌آورند.

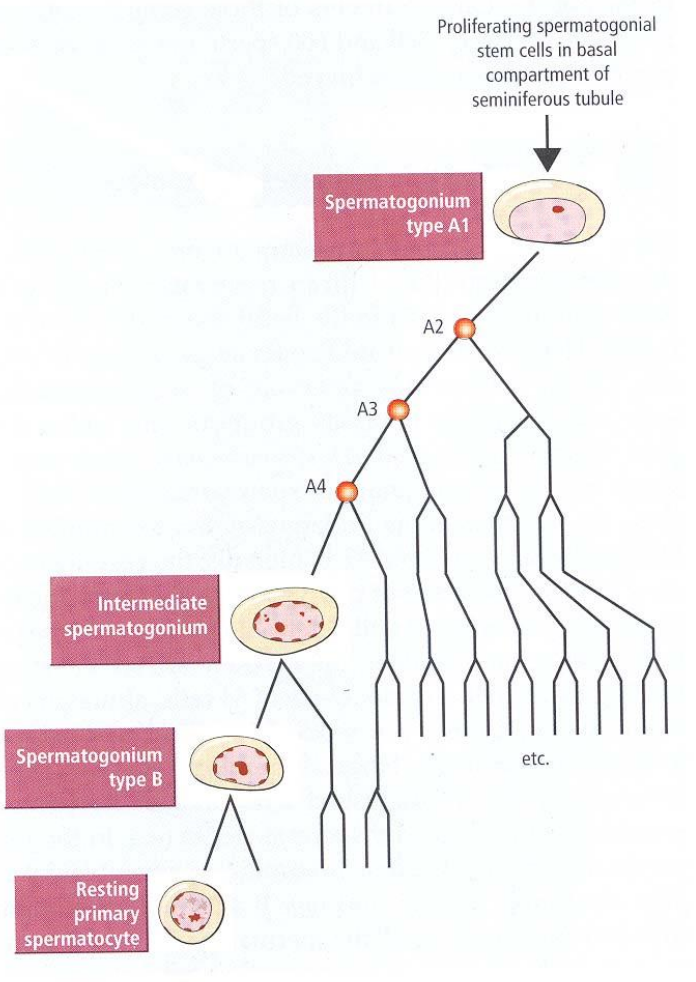
در تمامی این تقسیم‌ها در واقع تقسیم هسته[۳] کامل بوده ولی تقسیم سیتوپلاسم[۴] بطورناکامل انجام می‌گیرد و به همین دلیل تمامی اسپرماتوسیت‌های حاصله از تقسیم اسپرماتوگونی A_1 به وسیله پل‌های سیتوپلاسمی به یکدیگر متصل می‌باشند. در بعضی مقاطع یکی از سلول‌های دختری کلونی تقسیم نشده و بصورت اسپرماتوگونی A باقی مانده و به عنوان سلول اجدادی بنیادی عمل می‌کنند. این مکانیسم موجب حفظ و نگهداری تعداد سلول‌های بنیادی در بیضه شده و همچنین باعث تولید کلونی‌های جدید می‌گردد [۵۱۷۱].

[۱] INTERMIDIATE SPERMATOGONIA

[۲] RESTING PRIMARY SPERMATOCYTES

[۳] KARYOKINESIS

[۴] CYTOKINESIS



شکل ۱-۲ سلول‌های فاز میتوزی فرآیند اسپرماتوژنز

۴-۱-۲ سلول‌های سرتولی

این سلول‌ها اولین بار توسط یک فیزیولوژیست ایتالیایی به نام انریکو سرتولی[۱] در سال ۱۸۶۵ در ضمن مطالعه در دانشگاه پاویا[۲] کشف شد. 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

[۱] ENRICO SERTOLI

[۲] PAVIA

تستوسترون در درون 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[۱] که ترشح FSH[۲] را مهار می‌کند و اکتیوین[۳]، ترشح مایع غنی از فروکتوز که به تغذیه و انتقال اسپرم کمک می‌کند، سنتز و ترشح ترنسفرین[۴] که با جذب آهن به بلوغ گامت‌ها کمک می‌نماید، 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 [۵۰۴۷، ۵۰۰۳]. 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[۵] از طریق اتصالات روزنه‌دار[۶]

۲. تماس با اغلب اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها از طریق تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک[۷]

۳. تماس با اسپرماتیدهای دراز از طریق فرو رفتگی‌های عمیقی که شبکه لوله‌ای پیازی[۸] نامیده می‌شوند [۵۱۷۱، ۵۱۴۴].

در خود سلول‌های سرتولی در طی چرخه اسپرماتوژنز از نظر مورفولوژیک و بیوشیمیایی نیز تغییراتی قابل مشاهده می‌باشد، برای مثال حجم لیپید، مورفولوژی هسته و تعداد و توزیع لیزوزوم‌های ثانویه به صورت دوره‌ای در سلول‌های سرتولی تغییر می‌کند، همانطور که ساخت پروتئین‌های بیضه‌ای مانند

---

۱ INHIBIN

2 FOLICLLE STIMULATING HORMONE

۳ ACTIVIN

4 TRANSFERRIN

5 PACHYTENE

۶ GAP JUNCTIONS

۷ ECTOPLASMIC SPECIALIZATION

۸ TUBULOBULBAR COMPLEX

پروتئین‌های متصل شونده به آندروژن، ترنسفرین، پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن[۱] تغییر می‌کند و جالب اینکه ترشح پروتئین‌های ذکر شده بویژه هنگام اسپرمیشن[۲] و عبور اسپرماتوسیت‌های پره لپتوتن به قسمت مجاور لوله‌ای افزایش می‌یابد، بنابراین این نظریه وجود دارد که برخی از این مواد دارای خاصیت پروتئولیتیکی می‌باشند. این تغییرات دوره‌ای در سلول سرتولی موقع بلوغ و درست قبل از اسپرماتوژنز اتفاق می‌افتد و باز بیانگر دخالت سلول سرتولی در روند اسپرماتوژنز و تنظیم آن می‌باشد [۵۱۷۱].

۵-۱-۲ بافت بینابینی

بافت بینابینی در واقع بافت پر کننده فضای بین لوله‌های سمینی‌فر می‌باشد. این بافت شامل عروق کوچک[۳]، سلول‌های لیدیگ، فیبرهای عصبی، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و انواع دیگر سلول‌های بافت همبند است.

این سیستم در واقع اجازه تبادل آندوکرینی و پاراکرینی مواد را بین سلول‌های لیدیگ، خون و لوله‌های سمینی‌فر را امکان پذیر می‌سازد. سلول‌های لیدیگ قسمتی از عروق کوچک را احاطه نموده و هورمون‌های مترشحه از آن‌ها توسط این عروق حمل می‌گردند. تحت شرایط پاتولوژیک لایه اندوتلیال این مویرگ‌ها می‌توانند ضخیم شده و موجب تنگی مجرای مویرگی گردند. در حالات دیگر ممکن است لایه خارجی مویرگ‌ها به وسیله تجمع اجزاء بافت همبند ضخیم شود [۵۱۹۶] که در هر دو حالت جریان خون درون مویرگ‌ها کاهش یافته و می‌تواند موجب وارد آمدن آسیب به پروسه اسپرماتوژنز گردد. این شرایط بطور معمول در موجودات اولیگواسپرمیک[۴] و آزواسپرمیک[۵] مشاهده می‌شود.

---

[1] PLASMINOGEN
[2] SPERMIATION
[۳] MICROCULATURE
[4] OLIGOSPERMIC
[5] AZOSPERMIC

۶-۱-۲ سلول‌های لیدیگ

در هنگام بلوغ جنسی، نوع دیگری از سلول‌ها در بافت بینابینی ظاهر می‌شوند که گرد و یا چند وجهی بوده و دارای یک هسته مرکزی و سیتوپلاسم ائوزینوفیلی غنی از قطرات کوچک لیپیدی می‌باشند. این سلول‌ها، سلول‌های بینابینی یا لیدیگ هستند که دارای خصوصیات سلول‌های مترشحه استروئیدها می‌باشند. این سلول‌ها برجسته ترین سلول‌های بافت بینابینی می‌باشند که به صورت گروه‌هایی در اطراف مویرگ‌ها قرار دارند و مسئول ترشح مهم ترین هورمون جنسی موجودات نر، تستوسترون می‌باشند [۵۲۸۱] تستوسترون به عنوان محصول سلول‌های لیدیگ در بافت بینابینی وجود داشته و به عنوان فاکتور مهم مهار کننده فرآیندهای آپوپتوزی در طول میوز مطرح می‌باشد [۵۱۲۴]. علاوه بر این اطلاعاتی در مورد ارتباط سلول‌های لیدیگ با شبکه عروقی بیضه وجود دارد که بر اساس آن این سلول‌ها در کنترل سیستم آنژیوژنز و جریان خون بیضه دارای نقش اساسی می‌باشد [۵۳۶۸].

این سلول‌ها از مزانشیم تمایز پیدا کرده و تحت تاثیر گنادوتروپین‌های جفتی شروع به ترشح تستوسترون و دی هیدروتستوسترون می‌کنند که موجب تمایز اندام تناسلی در موجود نر می‌گردد. این سلول‌ها تا فعال هستند اما پس از آن غیر فعال شده و تولید تستوسترون هم تقریباً به صفر می‌رسد و سپس مجددا در موقع بلوغ جنسی تولید تستوسترون توسط این سلول‌ها در پاسخ به هورمون LH[۱] مترشحه از غده هیپوفیز از سر گرفته می‌شود. تستوسترون اثرات مختلفی در بدن دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به آغاز اسپرماتوژنز، تمایز ارگان‌های جنسی، بروز صفات جنسی ثانویه و رفتارهای ثانویه جنسی [۵۱۴۵] اشاره نمود.

[۱] LEUTELISING HORMONE

۷-۱-۲ سد خونی بیضوی

در واقع بیضه دارای دو وظیفه اصلی در بیضه می‌باشد: (۱) تولید اسپرماتوزوآ و (۲) تولید هورمون‌ها که برای حفظ عملکرد سیستم تولید مثلی پس از بلوغ ضروری می‌باشند. مهم ترین هورمون مترشحه بوسیله بیضه آندروژن‌ها می‌باشند. هر چند که استروژن ، اینهیبین ، اکتیوین و فاکتورهای شبه ریلکسین[1] نیز از بیضه‌ها ترشح می‌گردند. تولید آندروژن‌ها و اسپرماتوزوآها در دو بخش جداگانه‌ای از بیضه انجام می‌گیرد. اسپرماتوزوآها درون لوله‌های سمینی‌فر و در نزدیکی سلول‌های سرتولی تکامل پیدا می‌کنند، در حالی که آندروژن‌ها توسط سلول‌های لیدیگ در بین لوله‌ها تولید و ترشح می‌گردند. این دو بخش نه تنها از لحاظ ساختمانی بلکه از نظر فیزیولوژیک نیز توسط سدهای سلولی (که در دوره بلوغ تکامل پیدا می‌کنند) از هم جدا می‌باشند که این امر موجب محدود شدن تبادل مواد محلول در آب بین این دو قسمت (داخل و بین لوله ها) می‌گردد. محل دقیق سلولی این سدها با تزریق رنگ‌های مخصوص به داخل خون و سپس تعقیب آنها مشخص گشته است. این مواد در بافت بینابینی مشاهده می‌شوند ولی از آنجا که نفوذشان از طریق دیواره دور لوله‌ای به ناحیه پایه‌ای لوله‌های سمینی‌فر بسیار آهسته تر می‌باشد، بافت دور لوله‌ای به عنوان یک سد عمل می‌کند اما سد اصلی بافت دور لوله ایی نیست بلکه سدی است که بین بخش قاعده‌ای و مجاور لوله‌ای درون لوله‌های سمینی‌فر قرار دارد. این سد شامل لایه‌های متعدد اتصالات شل و محکم می‌باشد که سلول‌های سرتولی را احاطه نموده و آن را محکم به سلول سرتولی مجاور متصل نگه می‌دارد. این اتصالات اساس سد خونی _ بیضوی را تشکیل می‌دهند. در طرفین این اتصالات محکم دسته‌هایی از فیلامان‌های اکتین[2] وجود دارند و در طرفین آن‌ها هم شبکه‌های آندوپلاسمیک قرار گرفته‌اند. البته این سدها دائمی نبوده و مدام تخریب شده و دوباره به وجود می‌آیند. مولکول‌های زیادی در باز و بسته شدن این سدها دخیل می‌باشند. از جمله: GTP[3] آز، پروتئیناز، مهار کننده‌های پروتئیناز، پروتیئن فسفریله کننده

[1] PSEUDORELAXIN
[2] ACTIN
[3] GUANOSINE TRIPHOSPHATE

کلسیم داخل سلولی و cAMP و سیتوکین‌هایی مانند TGF-β3. این سد قبل از دوره بلوغ وجود ندارد و قبل از آغاز اسپرماتوژنز تشکیل می‌شود. سد خونی- بیضوی عملکردهای مختلفی دارد:

۱- جلوگیری از نفوذاسپرماتوزوآها به خارج از لوله‌های سمینی‌فر و نفوذ آن‌ها به جریان خون و لنف. این عملکرد بسیار مهم است چرا که سیستم ایمنی بدن نسبت به آن‌ها تحمل ندارد و می‌تواند موجب شروع پاسخ‌های ایمنی شده و موجب تولید آنتی‌بادی‌های ضد اسپرماتوزوآ و در نهایت موجب عقیمی فرد گردد [۵۱۷۱].

۲- این سد موجب تغییر فاحش در ترکیب مایع در بین و داخل لوله‌های سمینی‌فر می‌شود به طوری که اگر مولکول‌های نشان دار شده مثل آهن ، پروتئین و قند را به داخل خون تزریق کنیم پس از مدتی این مواد در فضای بین لوله‌ها ظاهر می‌شوند که بیانگر عدم وجود سد در سطح مویرگ‌ها برای این مواد است. ولی این مواد توانایی وارد شدن به فضای داخل لوله‌ها را ندارند و فقط توسط انتقال فعال توانایی ورود به داخل لوله‌ها را پیدا می‌کنند. این عملکرد سد بیانگر این مطلب می‌باشد که مراحل آخر اسپرماتوژنز کاملاً در یک محیط که از نظر شیمیایی کنترل می‌شود، انجام می‌گیرد. البته این محیط شیمیایی در واقع فقط از عملکرد سد خونی بیضوی حاصل نمی‌شود چرا که خود سلول‌های سرتولی هم همانطور که در بالا ذکر شد در ایجاد این محیط شیمیایی نقش داشته و انواع مختلفی از مواد شیمیایی را تولید و ترشح می‌کنند [۵۱۷۱].

۲-۲ سازمان اسپرماتوژنز

زمان مطلق برای تمامی فرایند، از ورود به تقسیم میتوز تا رها شدن اسپرماتوزوآ در چند گونه مختلف در جدول ۱-۲ نشان داده شده است.

جدول ۱-۲ زمان لازم برای فرآیند اسپرماتوژنز در گونه‌های مختلف

گونه	طول چرخه اپی تلیوم سمینی‌فر (روز)	زمان لازم برای تکمیل فرآیند اسپرماتوژنز (روز)