مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۶۸/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۵

ارزیابی تأثیر Follicle stimulating hormone (FSH) بر القای کلونی‌زایی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه

دکتر پرویز تاجیک[۱]، دکتر محمدرضا مخبر دزفولی[۱]، دکتر نفیسه علی‌قاضی[۲]، دکتر پیمان رحیمی‌فیلی[۳]، دکتر شیوا شفیعی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، گروهی از سلول‌های تمایز نیافته با قابلیت ویژه در خودنوزایی و تمایز می‌باشند. مطالعه‌ی خصوصیات و عملکرد این سلول‌ها مستلزم تکثیر در محیط آزمایشگاه است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر دوزهای مختلف هورمون محرک رشد فولیکولی (FSH یا Follicle stimulating hormone) بر تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه بود.

روش‌ها: تعلیق سلولی حاوی اسپرماتوگونی و سرتولی از بیضه‌ی بره‌های ۳-۲ ماهه با استفاده از دو مرحله‌ی هضم آنزیمی، جداسازی شد. سپس سلول‌های استخراج شده در ۴ گروه مختلف کشت داده شد: ۳ گروه با افزودن دوزهای مختلف FSH (۵، ۱۰ و ۱۵ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) به محیط کشت و گروه شاهد (بدون FSH). طول دوره‌ی کشت ۱۰ روز بود. مساحت و تعداد کلونی‌ها در پایان روزهای ۴، ۷ و ۱۰ به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری ارزیابی شد.

یافته‌ها: مساحت کلونی گروه ۱ و ۲ در روز ۴ کشت به طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۳ و ۴ بود ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین در روزهای ۷ و ۱۰، مساحت کلونی‌های گروه ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۴ بود ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: که افزودن هورمون FSH به محیط کشت با دوزهای ۱۰ و ۱۵ در مقایسه با هم‌کشتی ساده با سلول‌های سرتولی به طور معنی‌داری مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی گوسفند را کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: اسپرماتوگونی، سلول بنیادی، هورمون محرک رشد فولیکول، گوسفند

ارجاع: تاجیک پرویز، مخبر دزفولی محمدرضا، علی‌قاضی نفیسه، رحیمی‌فیلی پیمان، شفیعی شیوا. **ارزیابی تأثیر Follicle stimulating hormone (FSH) بر القای کلونی‌زایی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۸): ۲۲۳۷-۲۲۲۸

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک جمعیت سلولی کم تعداد است که در یک ریز محیط پیچیده‌ی سلولی درون بیضه پراکنده شده‌اند (۱). این سلول‌ها با تکثیر و تزاید مداوم خود، اسپرماتوژنز را پیش می‌برند که محصول آن در نهایت، اسپرماتوزوآ می‌باشد. این جمعیت سلولی کم تعداد، از دیدگاه بیولوژیکی اهمیت ویژه ای دارد؛ زیرا تنها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که می‌توانند

۱- استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- دامپزشک، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۴- دکترای تخصصی دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نفیسه علی‌قاضی
Email: alighazy@ut.ac.ir

اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل نمایند (۲).

تکثیر در محیط آزمایشگاه، گام اول در جهت مطالعه‌ی خصوصیات و عملکرد (خودسازی و تمایز) این سلول‌ها می‌باشد (۱). با دستیابی به این مهم، می‌توان در محیط آزمایشگاه سلول‌های بنیادی را تخلیص و غنی‌سازی کرد که این امر برای انجام مطالعات بعدی از جمله انجماد، پیوند، حفظ قابلیت باروری، مداخلات ژنتیکی، انتقال ژن و تمایز سلول در محیط آزمایشگاه اهمیت زیادی دارد. به این منظور، مطالعات مختلفی در جهت تکثیر این سلول ها در محیط کشت صورت گرفته و موفقیت هایی نیز به همراه داشته است. در این مطالعات، از عوامل رشد، هورمون‌ها و سلول‌های تغذیه کننده‌ی مختلفی برای بهبود وضعیت بقا، تکثیر و گاهی تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شده است (۶-۳).

در مطالعات پیشین مشخص شده است که جایگاه‌های قرارگیری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مجاورت غشای پایه‌ی لوله های منی ساز، اغلب در مکان‌هایی است که تماس با بافت بینابینی بیضه و عروق خونی وجود دارد. از آن جایی که در این جایگاه‌ها، خودسازی سلول‌های بنیادی بر تمایز آن‌ها غالبیت دارد و از طرفی، در ماهیت سلول‌های سرتولی واقع در ریز محیط و سلول‌های سرتولی واقع در مابقی قسمت های لوله های منی ساز تفاوتی ندارد، می توان نتیجه گرفت که شاید عوامل تعیین کننده در انجام خودسازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در این جایگاه ها، از خارج لوله‌های منی‌ساز از جمله سلول‌های لیدیگ و خون منشأ می‌گیرند (۸-۷).

پیشنهاد شده است FSH نقش تعیین کننده ای در بقای سلول های زایا و افزایش قدرت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد (۱۰-۹). همچنین در کشت بافت و سلول‌های استخراج شده از بیضه‌ی انسان در محیط آزمایشگاه، مشاهده شد که مقادیر بالای FSH و تستوسترون در حضور سلول‌های سرتولی به پیشبرد تقسیم میتوز و افزایش زنده‌مانی (به واسطه‌ی کاهش آپوپتوز) سلول‌های زایا کمک می‌کند (۱۱).

بنابراین می‌توان این هورمون را به عنوان یکی از عوامل تنظیم کننده‌ی خودنوسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در ریز محیط سلولی و محیط کشت مطرح کرد. پیشرفت‌هایی که در سالیان اخیر در زمینه‌ی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی داده است، اغلب مربوط به مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی بوده است و با وجود پتانسیل گونه‌ی دامی گوسفند در طراحی مدل‌های بیوتکنولوژی، تراریخته و همچنین اهمیت اقتصادی پرورش آن به منظور تغذیه‌ی بشر، مطالعات مربوط به این گونه بسیار محدود است. بنابراین، زمینه‌ای گسترده جهت پژوهش در خصوص ایجاد شرایط ایده‌آل کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این گونه فراهم است (۱۲، ۲). هدف اصلی از انجام این طرح در راستای ایجاد محیط کشت بهینه، افزودن دوزهای مختلف FSH و بررسی توانایی آن در تزاید اسپرماتوگونی گوسفند بود.

روش‌ها

جمع‌آوری بیضه و برداشت بافت

در این مطالعه از بیضه‌ی بره‌های نابالغ ۳-۲ ماهه جهت جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شد. به این منظور، بیضه بعد از عمل کشتار در مجاورت یخ، طی زمانی کمتر از ۲ ساعت از

کشتارگاه به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه حجم بیضه بر اساس فرمول پیشنهادی Steger و Wrobel (۱۳) اندازه گیری شد و از بیضه هایی که دارای حجم ۴۷/۵-۵۱/۳ سانتی‌متر مکعب بودند، جهت جداسازی سلول های اسپرماتوگونی استفاده شد. پس از شستشوی سطح بیضه با تنتور ید و الکل ۷۰ درجه، لایه‌های تونیکا واژینالیس و تونیکا آلبوجینا برش داده شد و ۱ سانتی‌متر مکعب بافت بیرون زده از پارانشیم بیضه در ناحیه‌ی برش، به وسیله‌ی قیچی استریل برداشت شد.

جداسازی سلول‌ها

سلول‌های تشکیل دهنده‌ی لوله‌های منی‌ساز طی دو مرحله ی هضم آنزیمی بر اساس روشی که توسط ایزدیار و همکاران (۱۴) توضیح داده شده است، از نمونه‌ی اخذ شده از بیضه جدا شدند.

به طور خلاصه، بافت بیضه پس از چندین بار شستشو در (Dulbecco's modified eagle's medium) DMEM حاوی آنتی بیوتیک، تا حد ممکن به قطعات کوچک تقسیم شد و در DMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۱ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر از آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، هیالورونیداز تیپ ۲ و ترپسین (هر سه آنزیم محصول شرکت Sigma، آمریکا) در دمای ۳۷ °C به مدت حدود ۶۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. طی مرحله ی اول هضم آنزیمی، بافت بینابینی هضم گردید و از لوله های منی ساز جدا شد. برای حذف بافت های هضم شده ۳ تا ۴ بار شستشو با DMEM حاوی آنتی بیوتیک انجام شد و هر بار سانتریفیوژ با دور ۴۰۰ g به مدت ۲ دقیقه صورت گرفت. لوله‌های منی ساز که رسوب کرده بودند، نگه داشته شدند و مایع رویی که حاوی بافت‌های بینابینی هضم شده بود، دور ریخته شد. لوله‌های منی‌ساز به دست آمده از مرحله ی اول هضم آنزیمی، بار دیگر در DMEM حاوی آنتی بیوتیک، کلاژناز تیپ ۴ و هیالورونیداز تیپ ۲ و این بار بدون حضور ترپسین، در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند.

در مرحله ی دوم هضم آنزیمی، سلول های تشکیل دهنده‌ی لوله‌های منی‌ساز (اغلب سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول های سرتولی) از یکدیگر جدا گشتند. برای متوقف کردن ادامه ی هضم آنزیمی، ۲۰ درصد حجم سوسپانسیون Fetal bovine serum (FBS) اضافه شد. برای جداسازی سلول های انفرادی از قطعات لوله‌های باقی‌مانده، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰ g صورت گرفت. لوله‌های باقی مانده رسوب کردند و سلول های انفرادی در مایع رویی ماندند. سپس مایع رویی که سوسپانسیون مخلوطی از سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و مایویید بود، از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری عبور داده شد. با سانتریفوژ این سوسپانسیون (۸۰۰ g به مدت ۲ دقیقه) سلول های انفرادی رسوب داده شدند. رسوب سلولی به دست آمده در مقدار مناسب DMEM حاوی آنتی بیوتیک و FBS ۵ درصد حل گردید.

شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌های جدا شده

به منظور ارزیابی وضعیت حیات سلول‌ها پس از جداسازی، رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد انجام گرفت و تعداد کل سلول‌ها و همچنین سلول‌های زنده و مرده‌ی حاضر در سوسپانسیون سلولی، به وسیله‌ی لام هماسیتومتر و میکروسکوپ نوری محاسبه شد.

تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

ماهیت بنیادینگی سلول‌های کشت شده با رنگ‌آمیزی

ایمونوفلورسانت علیه OCT-۴ (Octamer-binding transcription factor-۴) (کنژوگه شده با FITC یا Fluorescein isothiocyanate) که یک نشانگر عمومی برای سلول‌های بنیادی است (۱۵)، در روز ۵ کشت مورد بررسی قرار گرفت.

هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی

تعداد ۲۵۰۰۰۰ سلول از سوسپانسیون مخلوط سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی در DMEM حاوی آنتی بیوتیک و FBS ۵ درصد در هر چاهک از پلیت ۴ خانه‌ای مخصوص کشت سلول (TPP، سوئیس) در دمای ۳۷ °C و CO_2 ۵ درصد به مدت ۱۰ روز کشت داده شد. از ابتدای کشت، هورمون FSH (Fostimon®، آمریکا) به گروه‌های آزمایشی اضافه شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۷۲ ساعت یک بار تعویض شد. تعداد و قطر کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در هر گروه آزمایشی، در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از شروع کشت به کمک میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope) که به عدسی چشمی مدرج مجهز بود، بررسی شد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). برای محاسبه‌ی مساحت کلونی از مساحت بیضی استفاده شد.

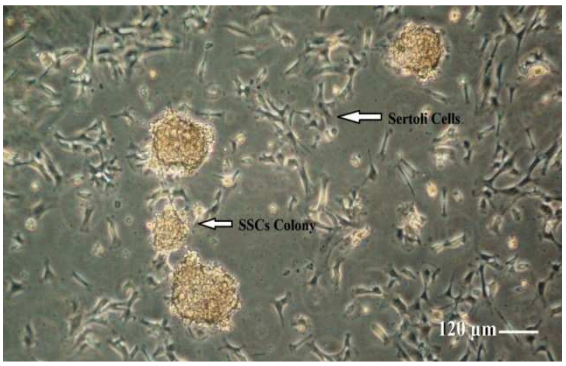
گروه‌های آزمایشی شامل ۴ گروه به شرح زیر بودند:

گروه ۱(شاهد): هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی

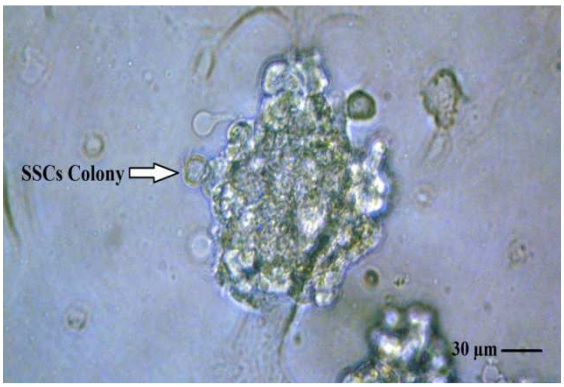
گروه ۲: هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول های سرتولی همراه با افزودن FSH با غلظت ۵ IU/ml

گروه ۳: هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول های سرتولی همراه با افزودن FSH با غلظت ۱۰ IU/ml

گروه۴: هم کشتی سلول های اسپرماتوگونی با سلول های سرتولی همراه با افزودن FSH با غلظت ۱۵ IU/ml.



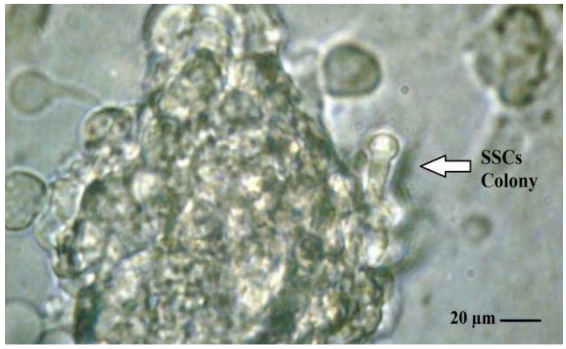
شکل ۱. سلول‌های سرتولی (Sertoli cells) با ترشح سیتوکاین و عوامل رشد مختلف، نقش تغذیه‌ای و حمایت از کلونی‌های اسپرماتوگونی (SSCs) را بر عهده دارند. حضور سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی در مجاورت یکدیگر در روز ۷ کشت مشاهده می‌شود.



شکل ۲. کلونی اسپرماتوگونی (SSCs) مشخص شده در شکل ۱ با بزرگ‌نمایی بیشتر

اطلاعات به دست آمده از ۴ نمونه گیری مستقل توسط آزمون آماری One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و نیز آزمون Duncan's multiple range آنالیز شد. نرم‌افزار آماری مورد استفاده SPSS نسخه‌ی ۱۶

(version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بـــود و P < ۰/۰۵۰ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

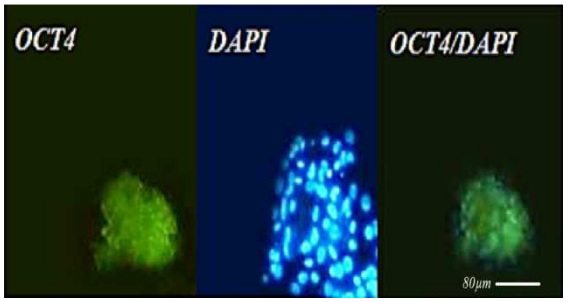


شکل ۳. کلونی اسپرماتوگونی مشخص شده در شکل ۱ با بزرگ‌نمایی بیشتر

یافته‌ها

در بررسی میزان حیات سلول‌ها، میـانگین زنـده‌مـانی سـلول‌هـا پـس از جداسـازی حـدود ۸۴/۵ درصـد برآورد شد.

آزمایش ایمنوسیتوشیمی در روز ۵، بیـان نشـانگر OCT-۴ را در کلـونی‌هـای کشـت شـده نشـان داد (شکل ۴).



شکل ۴. بیان نشانگر OCT-۴ (Octamer-binding transcription factor) در کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۵ کشت، به واسطه‌ی رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانت به تصویر کشیده شده است (سبز رنگ، اولین تصویر سمت چپ). هسته‌ی سلول‌های اسپرماتوگونی با DPAI رنگ‌آمیزی شده‌اند (آبی رنگ)

اعـداد مربـوط بـه شـمارش تعـداد کلـونی‌هـای اسپرماتوگونی در گروه‌های شاهد و تیماری متفاوت و در روزهای مختلف در جدول ۱ آمده است. تعداد کلونی‌های ایجاد شده در تمامی گروه‌های مطالعـه از جمله گروه شاهد، با گذشت زمان افزایش یافت؛ بـه طوری که تعداد کلونی‌ها در تمام گروه‌ها در روز ۱۰ از روز ۷ و در روز ۷ از روز ۴ کشـت بیشـتر بـود. تغییر در تعداد کلونی‌ها در طی کشت (از روز ۴ تا ۷ تـا ۱۰) در هـیچ کـدام از گـروه‌هـا از نظـر آمـاری معنی‌دار نبود.

همچنین در مقایسه‌ی تعداد کلونی‌های گروه‌هـای مختلف مطالعه نیز تفاوت معنی‌داری بین هیچ یـک از گروه‌ها در هیچ یک از روزهای ارزیـابی (۴، ۷ و ۱۰) دیده نشد (جدول ۱). اشاره به این نکتـه تـا حـدودی حایز اهمیت است که روند کاهشی تعداد کلونی‌ها در هر گروه، وابسته به دوز بـود؛ بـه طـوری کـه تعـداد کلونی‌ها در گروهـی کـه ۱۵ واحـد FSH بـه محـیط کشـت اضـافه شـد، در تمـامی روزهـای ارزیـابی (۴، ۷ و ۱۰) کمتر از گروهی بود که ۱۰ واحـد FSH دریافـت کـرد و کمتـرین تعـداد کلـونی، مربـوط بـه گروهی بود که FSH را با دوز ۵ واحد دریافت کـرده بود؛ اگر چه هیچ یک از این اختلافات از نظر آمـاری معنی‌دار نبود.

مجموع مساحت کلونی‌هـا در تمـامی گـروه‌هـا از جمله گروه شاهد با گذشت زمان افزایش داشـت؛ بـه طوری که این پارامتر در تمام گـروه‌هـا در روز ۱۰ از روز ۷ و در روز ۷ از روز ۴ کشـــت بیشـــتر بـــود (جـدول ۲). در روز ۴ کشـت، مجمـوع مسـاحت کلـونی‌هـای گـروه‌هـای شـاهد (۰/۲۰ ± ۲/۳۷) و ۲ (۰/۱۲ ± ۲/۳۹) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های ۳ (۰/۰۷ ± ۱/۹۴) و ۴ (۰/۱۱ ± ۱/۶۵) بـــــــود (P < ۰/۰۵۰). در روز ۷ نیـز مسـاحت کلـونی‌هـای

گروه‌های شاهد (۰/۱۸ ± ۲/۵۵) و ۲ (۰/۱ ± ۲/۳۷) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۴ (۰/۰۹ ± ۱/۹۱) بود ($P < ۰/۰۵۰$).

در روز ۱۰ کشت، مساحت کلونی‌های گروه ۱ (۰/۱۱ ± ۲/۶۴) بیشتر از گروه ۳ (۰/۰۳ ± ۲/۱۹) و ۴ (۰/۱۴ ± ۲/۰۴) بود و همچنین در این روز، مساحت کلونی‌های گروه ۲ (۰/۱۹ ± ۲/۵۱) بیشتر از گروه ۴ (۰/۱۴ ± ۲/۰۴) بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵۰$).

بحث

هدف از انجام پژوهش حاضر، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه‌ی گوسفند و هم‌کشتی آن با سلول‌های سرتولی و مقایسه‌ی سیستم هم‌کشتی و افزودن هورمون FSH بر کلونی‌زایی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه است.

استخراج سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه از بره‌ی نابالغ آسانتر است؛ زیرا بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز بیضه در این زمان دارای دو نوع سلول مشخص می‌باشند: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A و سلول‌های سرتولی. بنابراین به نظر می‌رسد مناسب‌ترین سن برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه‌ی گوسفند، پیش از بلوغ می‌باشد.

به طور معمول، جمعیت متراکمی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با خلوص نهایی بالای ۷۵ درصد از بیضه‌ی گوسفند قابل جداسازی است. این تراکم سلولی حاوی حدود $۱۰^۶$ سلول بنیادی در هر گرم از بیضه با میزان زنده مانی بیش از ۸۰ درصد می‌باشد (۱۴، ۱۲).

جدول ۱. تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی (میانگین ± خطای استاندارد) در گروه‌های آزمایش در روزهای مختلف کشت

گروه	تعداد کلونی		
	روز ۴	روز ۷	روز ۱۰
۱ (شاهد)	۱۸۶/۰ ± ۱۵/۱	۲۱۱/۰ ± ۱۰/۴	۲۱۳/۰ ± ۱۰/۸
۲	۱۹۵/۰ ± ۲۰/۸	۲۰۲/۰ ± ۲۰/۳	۲۰۸/۰ ± ۱۹/۶
۳	۱۷۸/۰ ± ۱۰/۱	۱۸۶/۰ ± ۱۳/۱	۱۹۲/۰ ± ۱۳/۳
۴	۱۵۶/۰ ± ۱۴/۱	۱۶۹/۰ ± ۱۵/۹	۱۹۸/۰ ± ۹/۴

اختلاف آماری معنی‌داری در بین گروه‌های مختلف و روزهای مختلف مشاهده نشد.

جدول ۲. مجموع مساحت کلونی‌ها (میانگین ± خطای استاندارد) در گروه‌های آزمایش در روزهای مختلف کشت

گروه	تعداد کلونی		
	روز ۴	روز ۷	روز ۱۰
۱ (شاهد)	$۲/۳۷ \pm ۰/۲۰^{a}$	$۲/۵۵ \pm ۰/۱۸^{b}$	$۲/۶۴ \pm ۰/۱۱^{a}$
۲	$۲/۳۹ \pm ۰/۱۲^{a}$	$۲/۳۷ \pm ۰/۱۰^{ab}$	$۲/۵۱ \pm ۰/۱۹^{ab}$
۳	$۱/۹۴ \pm ۰/۰۷^{b}$	$۲/۱۴ \pm ۰/۰۳^{bc}$	$۲/۱۹ \pm ۰/۰۳^{bc}$
۴	$۱/۶۵ \pm ۰/۱۱^{b}$	$۱/۹۱ \pm ۰/۰۹^{c}$	$۲/۰۴ \pm ۰/۱۴^{c}$

* در داخل هر ستون، اختلاف آماری در بین اعداد دارای بالانویس متفاوت، معنی‌دار است ($P < ۰/۰۵۰$).

میزان زنده‌مانی به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر که حدود ۸۴ درصد می‌باشد نیز قابل مقایسه با مطالعات انجام شده بر روی موش نابالغ (۳)، رت (۱۶)، خوک (۱۷)، گوساله (۱۴) و گوسفند (۱۲) است.

کروجی و همکاران (۱۸) به این نتیجه رسیدند که بعضی از سیستم‌های هم‌کشتی به طور مثال هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی اثر قابل توجهی بر روی کلونی زایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی دارند و باعث افزایش تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان می‌شوند. سلول‌های سرتولی تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را حمایت می‌کنند و موجب افزایش رشد آن‌ها می‌شوند. بنابراین هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی، تأثیر حمایتی بر روی تکثیرشان دارد. یافته‌های این مطالعه با یافته‌های مطالعات گذشته مبنی بر حمایت تک لایه‌ی سلول سرتولی از تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، مطابقت دارد. تا زمان اجرای مطالعه، بهترین نتایج هم کشتی با سلول های سرتولی در موش (۱۹) و گاو (۵) مشاهده شده بود که در مطالعه ی حاضر نیز هم‌کشتی ساده با سلول‌های سرتولی و بدون افزودن هورمون، بهترین نتیجه را در جهت کلونی‌زایی این سلول‌ها داشت. برخی مطالعات اخیر، حضور سلول‌های سرتولی را به لحاظ القای تمایز در سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت مضر دانسته‌اند (۲۰).

بر طبق مطالعات، در فرایند اسپرماتوژنز چندین عامل رشد و سایتوکین دخالت دارند که به طریق پاراکرینی و جاکستاکرینی عمل می‌کنند. سلول‌های سرتولی کنش و واکنش فیزیکی نزدیکی با سلول‌های اسپرماتوگونی دارند و دامنه ی زیادی از عوامل رشد و سایتوکاین‌های تنظیم کننده‌ی حیات، حفظ و متمایز کننده ی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به انواع سلول‌های ژرم را ترشح می‌کنند (۲۱).

در تحقیقات انجام شده توسط محققین، دستکاری های مختلفی در محیط کشت و مواد اضافه شونده به محیط کشت به منظور تزاید و افزایش میزان زنده‌مانی این سلول‌ها صورت گرفته است (۲۳-۲۲، ۱۷، ۴-۳). در شرایط معمول کشت به همراه ۱۰ درصد FBS، می‌توان تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A را ثابت نگه داشت؛ اما دیگر تعدادشان زیاد نخواهد شد (۲۴). جهت غلبه بر این مشکل، عوامل مختلفی برای حفظ قدرت خودسازی این سلول‌ها توسط محققین به محیط کشت اضافه شد (۲۵-۲۳، ۱۷، ۱۵).

انجم‌روز و موحدین (۳) تأثیر EGF (Epidermal growth factor)، FSH و تستوسترون را بر روی کلونی زایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش بررسی کردند. این محققین بیان داشتند که EGF بهترین اثر را در افزایش کلونی‌های اسپرماتوگونی موش در کشت کوتاه مدت دارد. همچنین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی موش در گروه درمانی با FSH به شکل معنی‌داری کمتر از گروه شاهد، تا روز ۱۱ کشت بود؛ اما از روز ۱۱ کشت به بعد، نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. در پایان زمان کشت کوتاه مدت که برابر با روز ۱۴ بود، تفاوت معنی داری در تعداد کلونی های گروه درمانی نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد.

در پژوهش حاضر تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه هم‌کشت با سلول های سرتولی در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده‌ی

هورمون تفاوت معنی‌داری را در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از شروع کشت نشان نداد. این یافته با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر تا حدودی همخوانی دارد.

در مطالعه‌ی حاضر، مجموع مساحت کلونی‌ها که تحت تأثیر مستقیم اندازه ی قطر کلونی بود. در گروه دریافت کننده ی هورمون به میزان FSH ۱۵ IU/ml به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود؛ در حالی که این پارامتر در گروه دریافت کننده‌ی هورمون به میزان FSH ۵ IU/ml نیز کمتر از گروه شاهد بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود.

در مطالعه‌ی قبلی پژوهشگران، مشاهده شد که افزودن FSH به سیستم هم‌کشتی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی گوساله سبب کاهش مساحت کلونی‌ها می‌شود و این اختلاف در روز ۱۰ کشت از نظر آماری معنی‌دار بود (۲۶).

در مطالعه‌ی انجم‌روز و موحدین (۳) بر روی اسپرماتوگونی موش نیز اندازه‌ی قطر کلونی‌ها در گروه دریافت کننده‌ی هورمون به میزان FSH ۵ IU/ml تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. این محققین بیان کردند که اندازه‌ی قطر کلونی‌ها در گروه دریافت کننده‌ی هورمون به میزان FSH ۱۵ IU/ml به صورت تأخیری، در پایان روز ۱۴ کشت افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت.

به طور کلی، یافته‌ها مؤید گزارش‌های مختلفی است (۱۶-۱۵) که نشان می‌دهد بیشتر عوامل رشد، دارای اثرات طبیعی و حتی برخی از آن‌ها کاهنده‌ی تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند. در سال‌های اخیر در یک مطالعه با افزودن تستوسترون، FSH و برخی ویتامین‌ها به سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی موش را در محیط آزمایشگاه به سمت تمایز سوق داده‌اند (۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کشت کوتاه مدت (۱۰ روزه) سلول های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول های سرتولی در مقایسه با افزودن هورمون FSH، راهکاری مناسب‌تر در جهت تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می‌باشد و افزودن این هورمون به محیط کشت، سبب کاهش مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی شماره‌ی ۱۴/۶/۷۵۰۸۰۱۶ در قالب رساله‌ی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی است که با حمایت مالی قطب سلول بنیادی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران به انجام رسیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات مدیریت محترم قطب علمی کاربرد سلول های بنیادی در سلول درمانی و مهندسی بافت دانشگاه تهران جهت تأمین بودجه و آقای دکتر خسرو حسینی‌پژوه به جهت مشاوره‌ی علمی تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. Stem Cells 2008; 26(11): 2928-37.
2. Hill JR, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. Reprod Fertil Dev

2006; 18(1-2): 13-8.
3. Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. Reprod Fertil Dev 2006; 18(6): 709-20.
4. Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. Reproduction 2008; 136(5): 543-57.
5. Izadyar F, Den OK, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. Biol Reprod 2003; 68(1): 272-81.
6. Shen F, Zhang C, Zheng H, Xiong Y, Wang X, Liao W, et al. Long-term culture and transplantation of spermatogonial stem cells from BALB/c mice. Cells Tissues Organs 2010; 191(5): 372-81.
7. Caires K, Broady J, McLean D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. J Endocrinol 2010; 205(2): 133-45.
8. de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. Microsc Res Tech 2009; 72(8): 580-5.
9. Fritz IB, Rommerts FG, Louis BG, Dorrington JH. Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. J Reprod Fertil 1976; 46(1): 17-24.
10. Eddy EM. Male germ cell gene expression. Recent Prog Horm Res 2002; 57: 103-28.
11. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. Hum Reprod 2001; 16(12): 2640-5.
12. Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenology 2006; 66(9): 2091-103.
13. Steger K, Wrobel KH. Immunohistochemical demonstration of cytoskeletal proteins in the ovine testis during postnatal development. Anat Embryol (Berl) 1994; 189(6): 521-30.
14. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, Den OK, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction 2002; 124(1): 85-94.
15. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(47): 16489-94.
16. Morena AR, Boitani C, Pesce M, De FM, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. J Androl 1996; 17(6): 708-17.
17. Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod 1999; 61(1): 225-30.
18. Koruji SM, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. Iran J Reprod Med 2007; 5(3): 109-15.
19. Palombi F, Di CC. Alkaline phosphatase is a marker for myoid cells in cultures of rat peritubular and tubular tissue. Biol Reprod 1988; 39(5): 1101-9.
20. Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function. Biol Reprod 2003; 68(3): 996-1002.
21. Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. Int Rev Cytol 1993; 147: 25-96.
22. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. Theriogenology 2006; 65(9): 1828-47.
23. Creemers LB, Den OK, van Pelt AM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction 2002; 124(6): 791-9.
24. Hasthorpe S. Clonogenic culture of normal spermatogonia: in vitro regulation of postnatal germ cell proliferation. Biol Reprod 2003; 68(4): 1354-60.
25. Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. Dev Biol 2005; 279(1): 114-24.
26. Narenji-Sani R, Tajik P, Yousefi MH, Movahedin M, Qasemi-Panahi B, Shafiei S, et al. Follicle stimulating hormone increases spermatogonial stem cell colonization during in vitro co-culture. Vet Res Forum. 2012; 4 (1): 37-41.
27. Minaee ZB, Rastegar T, Habibi RM, Ragerdi K, I, Amidi F, Abolhasani F, et al. Co-culture of spermatogonial stem cells with sertoli cells in the presence of testosterone and FSH improved differentiation via up-regulation of post meiotic genes. Acta Med Iran 2013; 51(1): 1-11.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 12.11.2013
Vol. 31, No. 268, 2nd Week, March 2014
Accepted: 25.01.2013

The Effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) on Colony Formation of Ovine Spermatogonial Stem Cells in Vitro

Parviz Tajik PhD[1], Mohammad-Reza Mokhber-Dezfuli PhD[1], Nafise Alighazi DVM[2], Peyman Rahimi-Feyli PhD[3], Shiva Shafiei PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Spermatogonial stem cells (SSCs) are undifferentiated cells with special capabilities on the self-renewing and differentiation. Proliferation of SSCs is a primary requirement for the study of their characteristics and function in vitro. The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) on the colonization activity of ovine SSCs in a short-term in-vitro co-culture with sertoli cells.

Methods: Both sertoli and spermatogonial cells were isolated from 2-3 months old lamb testes by two-steps enzymatic digestion. Afterward, isolated cells were cultured in four groups with different concentrations of FSH (0, 5, 10 and 15 IU/ml, respectively) for 10 days. Colony assay (number and surface area) was evaluated 4, 7 and 10 days after the beginning of the culture by light microscope.

Findings: At the day 4, colony surfaces of groups 1 and 2 were significantly more than groups 3 and 4 ($P < 0.05$). At the days 7 and 10, colony surfaces of groups 1 and 2 were significantly more than group 4 ($P < 0.05$).

Conclusion: The results showed that treated groups with 10 and 15 IU/ml of FSH significantly decreased colony surface of ovine SSCs in comparison with co-culture system.

Keywords: Spermatogonia, Stem cell, Sertoli cell, Follicle stimulating hormone (FSH), Ovine

Citation: Tajik P, Mokhber-Dezfuli MR, Alighazi N, Rahimi-Feyli P; Shafiei Sh. **The Effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) on Colony Formation of Ovine Spermatogonial Stem Cells in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2014; 31(268): 2228-37

1- Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Veterinarian, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
4- School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Nafise Alighazi, Email: alighazy@ut.ac.ir