

Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro

Zandi A¹, Rahimi-Feyli P^{1*}, Moghaddam AA¹, Nikousefat Z¹

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, I. R. Iran.

Received September 13, 2015; Accepted June 2, 2016

Abstract:

Background: Spermatogonial stem cells (SSCs) are able to establish balance between self-renewal and differentiation, thereby maintain the spermatogenesis. The aim of this study was to investigate effects of different doses of Testosterone on SSCs colony formation.

Materials and Methods: The cells were isolated from testes of prepubertal lambs by two-step enzymatic digestion and then purified by differential plating. The cells were cultured for 13 days in 4 groups: Control [DMEM containing antibiotic (1%) and FBS (5%)]; and Treatment groups 1, 2 and 3 (DMEM+Testosterone 60, 120 and 240 µg/ml, respectively). The culture media was changed every 72 h. Identification of SSCs was performed by immunocytochemistry staining against PGP9.5. Finally, following the evaluation of percentage for viability rate of SSCs immediately after isolation and also the number and surface areas of the colonies on days 5, 9 and 13 after the beginning of culturing by invert microscopy, the analyses were made using statistical tests.

Results: The percentage for viability rate of SSCs after isolation was $86.77 \pm 3.63\%$. The decrease in the number and surface areas of spermatogonial colonies in Treatment groups 2 and 3 were significant compared to Control and Treatment group1 ($P < 0.05$). Furthermore, colony number and surface area were significantly increased at day 13 compared to those of the days 5 and 9 ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that Testosterone has no effect on colony induction of SSCs in vitro. Increasing the Testosterone dose decreases the colony number and surface area of SSCs.

Keywords: Stem cell, Spermatogonia, Colony formation, Testosterone, PGP9.5

* Corresponding Author.

Email: peymanrahimi@razi.ac.ir

Tel: 0098 918 842 4345

Fax: 0098 833 832 0041

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2016; Vol. 20, No 3, Pages 205-213

Please cite this article as: Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA, Nikousefat Z Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro. *Feyz* 2016; 20(3): 205-13.

ارزیابی تاثیر تستوسترون بر تشکیل کلونی‌زایی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه

عطاله زندی^۱، پیمان رحیمی‌فیلی^{۲*}، علی‌اصغر مقدم^۳، زهرا نیکوصفت^۲

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با حفظ تعادل بین خودنوسازی و تمایز سبب تداوم روند اسپرماتوژنز می‌شوند. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف تستوسترون بر کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه گوسفند نابالغ با روش هضم آنزیمی دو مرحله‌ای جدا و به‌روش حذف تمایزی خالص-سازی شدند. سپس، به‌مدت ۱۳ روز به چهار روش تیمار شدند: گروه شاهد شامل کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS بود و به تیمارهای ۱، ۲ و ۳ علاوه بر محیط بالا به‌ترتیب ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تستوسترون اضافه شد. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت انجام شد. ماهیت سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 تأیید گردید. در نهایت درصد حیات سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی، و هم‌چنین تعداد و مساحت کلونی‌های تشکیل شده در روزهای ۵، ۹ و ۱۳ پس از کشت به‌وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

نتایج: درصد حیات سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از جداسازی $86/77 \pm 3/63$ درصد بود. کاهش تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی تیمار ۲ و ۳ نسبت به کنترل و تیمار ۱ معنی‌دار بود ($P < 0/05$). به‌علاوه، تعداد و مساحت کلونی‌ها در روز ۱۳ در مقایسه با روزهای ۵ و ۹ افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد تستوسترون در القاء کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه نقش مثبتی نداشته و با افزایش دوز باعث کاهش تعداد و مساحت کلونی‌ها در محیط کشت می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی، اسپرماتوگونی، تشکیل کلونی، تستوسترون، PGP9.5

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۵، صفحات ۲۱۳-۲۰۵

مقدمه

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 بافت و سلول، حفظ قابلیت باروری، مداخلات ژنتیکی، انتقال ژن و تمایز سلول در محیط آزمایشگاه اهمیت زیادی دارد. هم‌چنین، باتوجه به اهمیت این سلول‌ها در جمعیت دامی، مطالعه و تحقیق بر روی این سلول‌ها امکان پیشرفت در زمینه حفظ باروری، اصلاح نژاد، تولید دام‌های تراریخته، ساخت پروتئین‌های نو ترکیب و فرآورده‌های دارویی جدید را فراهم می‌آورد [۳]. بدین منظور تاکنون مطالعات مختلفی در جهت تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت صورت گرفته و موفقیت‌هایی نیز به‌همراه داشته است. در این مطالعات از فاکتور-های رشد مثل GDNF، FGF، LIF، EGF، CSF، هورمون‌هایی از قبیل GnRH، FSH و سلول‌های تغذیه کننده مختلفی برای بهبود وضعیت بقاء، تکثیر و بعضاً تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شده است [۴-۷]. به‌منظور مطالعه روند اسپرماتوژنز در پستانداران، باید یک سیستم آزمایشگاهی مناسب ایجاد کرد که در آن سلول‌های زایا بتوانند به‌مدت طولانی زنده بمانند. همان‌طور که گفته شد مطالعات بر روی اسپرماتوگونی تیپ A شدیداً با مشکل روبرو شده است که علت این امر می‌تواند

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک جمعیت سلولی کم-تعداد است که در یک ریزمحیط پیچیده سلولی درون بیضه قرار گرفته‌اند [۱]. این سلول‌ها با تکثیر و تمایز مداوم خود فرآیند اسپرم-ماتوژنز را پیش می‌برند که محصول نهایی آن اسپرماتوزوآ می‌باشد. این جمعیت سلولی کم‌تعداد از دیدگاه بیولوژیکی اهمیت ویژه‌ای دارد؛ زیرا تنها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌نمایند [۲]. تکثیر در محیط آزمایشگاه، گام اول در جهت مطالعه خصوصیات و عملکرد (خودنوسازی و تمایز) این سلول‌ها می‌باشد [۱].

^۱ دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

^۲ استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
^۳ دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

*نشانی نویسنده مسئول:

کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

تلفن: ۰۹۱۸ ۸۴۲۴۳۴۵ | دورنویس: ۰۸۳ ۳۸۳۲۰۰۴۱

پست الکترونیک: peymanrahimi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۲ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۳/۱۳

گوسفند، پیش از بلوغ می‌باشد [۱۷]. به‌همین دلیل در این مطالعه ترجیح داده شد جهت استخراج سلول از بره نابالغ استفاده شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

پنج عدد بیضه بره نژاد سنجابی با سن ۲-۴ ماه از کشتارگاه صنعتی تهیه شده و در داخل فلاسک و در مجاورت یخ قرار داده شد و در عرض کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه بیضه را از اسکروتوم خارج نموده و پس از چندبار شستشو، ۱۰ گرم بافت پارانیشیم آن به کمک قیچی استریل به داخل لوله فالکون (SPL, South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco, UK) تجاری و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استر-پتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و به‌منظور حذف آلودگی احتمالی به مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سه بار سانتریفیوژ (Hettach, Germany) شد.

هضم آنزیمی بافت پارانیشیم بیضه

جهت جداسازی سلول‌های لوله‌های منی‌ساز از بافت پارانیشیم بیضه از روش van Pelt و همکاران استفاده شد [۱۸] که به‌شرح ذیل می‌باشد: بافت پارانیشیم بیضه پس از شستشو به داخل پتری‌دیش منتقل شده و با استفاده از قیچی استریل به‌طور کامل قطعه‌قطعه گردید تا حالت شیرابه‌ای پیدا کند. سپس، وارد مرحله هضم آنزیمی شد. به‌منظور هضم آنزیمی مرحله اول به پتری‌دیش‌های حاوی بافت پارانیشیم بیضه، کلاژناز تیپ IV (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آنزیم هیالو-رونیداز تیپ II (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم تریپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma, USA) اضافه گردید. سپس، پتری‌دیش‌های مذکور به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد. به‌منظور افزایش بازدهی تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانیشیم بیضه هر ۱۰ دقیقه یک‌بار عمل پی‌پتاژ صورت گرفت و جهت ارزیابی هضم آنزیمی و روند باز شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر هر ۱۰ دقیقه یک‌بار بافت پارانیشیم بیضه در زیر میکروسکوب معکوس (Olympus, IX71[®] inverted microscope)

تعداد کم سلول‌ها پس از استخراج و نبود نشان‌گر اختصاصی برای این سلول‌ها باشد [۸]. در داخل بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز، سلول‌های زایای در حال رشد در مجاورت سلول‌های سرتولی هستند و ارتباط نزدیکی با این سلول‌ها دارند. مکانیسم‌های تنظیمی با واسطه فاکتورهای رشدی که از سلول‌های سرتولی آزاد می‌شود، تکثیر، تمایز و رشد سلول‌های زایا را القاء یا مهار می‌کنند [۹]. سلول‌های سرتولی فاکتورهای رشد مناسب از جمله فاکتور محرک رشد کلونی (CSF)، فاکتور شبه رشد انسولینی (IGF-1)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و هم-چنین هورمون‌های تنظیم کننده رشد ساختار تولید مثلی دام نر را تولید می‌کنند. در شرایط کشت آزمایشگاهی نیز مجاورت و ارتباط نزدیک مابین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی به‌منظور کشت بهینه سلول‌های زایای جداسازی شده باید فراهم شود. اسپرماتوژنز و باروری جنس نر کاملاً وابسته به تولید تستو-سترون است. در غیاب تستوسترون و یا گیرنده‌های آندروژن، اسپرماتوژنز در مرحله میوز متوقف می‌شود [۱۰]. سلول‌های سرتولی مهم‌ترین سلول هدف و مترجم سیگنال‌های تستوسترون هستند [۱۰]. گزارش شده است که در انسان تستوسترون به‌تنهایی یا همراه با FSH به‌عنوان فاکتور زنده‌مانی از طریق تنظیم مسیرهای آپوپتوتیک درون‌زاد و برون‌زاد عمل می‌کند [۱۱-۱۳]. در مدل‌های غیرانسانی مانند پرمات‌ها نیز مشاهده شده است که در صورت مهار گنادوتروپین، آپوپتوز اسپرماتوسیت و اسپرماتیدها افزایش می‌یابد [۱۵، ۱۴]. هم‌چنین، مشاهده شده است که اضافه نمودن FSH و تستوسترون به محیط کشت سلول‌های سرتولی موجب افزایش ترشح فاکتورهای میتوژنیک می‌شود. با توجه به اهمیت خودنوزایی در روند اسپرماتوژنز در شرایط درون‌تنی و اهمیت تستوسترون در روند اسپرماتوژنز و قیمت پایین‌تر آن در مقایسه با فاکتورهای رشد، به‌نظر می‌رسد که بتوان از این هورمون برای افزایش کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بهره جست [۱۶]. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه و بررسی تاثیر تستوسترون بر تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در طی مدت کشت محیط آزمایشگاه می‌باشد. استخراج سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی از بیضه گوسفند نابالغ آسان‌تر است؛ زیرا بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز بیضه در مرحله قبل از بلوغ دارای دو نوع سلول مشخص می‌باشند: سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی تیپ A و سلول‌های سرتولی. بنابراین، مناسب‌ترین سن برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه

مورد بررسی قرار گرفت. هدف از هضم آنزیمی مرحله اول جدا کردن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر بود. در ادامه به منظور حذف و از بین بردن بافت‌های هضم شده حاصل از جدا شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، محتویات هریک از پتری‌دیش‌ها به داخل لوله‌های فالكون منتقل شد و در دور ۱۴۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس رسوب کف فالكون‌ها که حاوی لوله‌های منی‌ساز بود نگه داشته شده و مایع رویی دور ریخته شد. پس از انجام مرحله اول هضم آنزیمی، محتویات لوله فالكون به داخل پتری‌دیش‌های استریل منتقل شده و به منظور هضم لوله‌های منی‌ساز و آزادسازی سلول‌های موجود در این لوله‌ها به هر یک از پتری‌دیش‌ها آنزیم کلاژناز تیپ IV (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ II (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دزوکسی‌ریبونوکلناز (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس، محتویات پتری‌دیش‌ها به داخل لوله‌های فالكون استریل منتقل شده و به منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقیمانده به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتریفوژ شد. به منظور توقف هضم آنزیمی به اندازه حجم آنزیم به کار رفته از محلول FBS استفاده شد. سپس، مایع رویی داخل فالكون که حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و میوید بود برداشت شده و درون فالكون دیگری ریخته شد. به منظور حذف سلول‌های میوید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری استریل عبور داده شد و تعلیق حاصل در لوله‌های فالكون جمع‌آوری گردید و هر کدام از لوله‌ها به مدت ۲ دقیقه با دور ۸۰۰ به منظور رسوب دادن سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی سانتریفوژ شدند. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، رسوب موجود در لوله‌های فالكون برای کشت مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین هویت سلول‌های اسپرماتوگونی با کمک رنگ‌آمیزی ایمنو-سیتوشیمی

جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 با استفاده از روش حیدری و همکاران [۳] به شرح ذیل استفاده شد: پس از ترپسینه کردن سلول‌ها در روز پایانی کشت، بلوک کردن اولین مکان غیراختصاصی به وسیله avidin/biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. متعاقباً اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکوئژوگه خرگوش (Dako, PGP9.5 (Carpinteria, CA, USA با رقت ۱:۱۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه

شد. مقطع پس از سه مرتبه شستشو با TBS/BSA (هر بار ۵ دقیقه) در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه تماس با آنتی‌بادی ثانویه (biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna, Research Institute, Iran) قرار گرفت و مجدداً با TBS/BSA شستشو داده شد. مقطع به مدت ۳۰ دقیقه در تماس با HRP-conjugated streptavidin (Biosource, USA) با رقت ۱:۵۰۰ قرار داده شد و سپس با TBS/BSA شستشو داده شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی‌آمینوبنزیدین (Roche, Germany) به مقطع، به مدت ۱۰-۸ دقیقه رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید با آب مقطر کاملاً تمیز شد و مجدداً با هریس هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شد، مجدداً با آب مقطر شستشو داده شد، سپس اسلاید با الکل آب‌گیری شد و با گزلبول شفاف شد و با چسب انتال (Merck, Germany) پوشانده شد. در نهایت سطح اسلاید به وسیله گلیسرول و PBS (نسبت ۱:۱) پوشانده شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها بلافاصله پس از جدا-سازی

درصد سلول‌های اسپرماتوگونی زنده با استفاده از رنگ-آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK) و میکرو-سکوپ نوری (Olympus, Japan) تعیین شد. با شمارش ۱۰۰ سلول به‌طور تصادفی تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین شد و بر این اساس درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

انتقال سلول‌های جدا شده به پلیت و افزودن تستوسترون

سلول‌های درون لوله‌ی فالكون به پلیت کشت چهار-خانه‌ای (TPP, سوئیس) منتقل شدند. گوده یک به‌عنوان شاهد و گوده‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب جهت تیمار ۱، ۲ و ۳ در نظر گرفته شد. سپس، محلول تستوسترون (Testosterone Enanthate, Aburaihan co. Iran, Batch No: 1020) به شرح زیر به گوده‌های مربوط به تیمار اضافه شد: گوده (۱) شاهد: ۵۰۰ میکرولیتر DMEM، گوده (۲) تیمار ۱: ۵۰۰ میکرولیتر DMEM حاوی ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تستوسترون، گوده (۳) تیمار ۲: ۵۰۰ میکرولیتر DMEM حاوی ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تستوسترون، و گوده (۴) تیمار ۳: ۵۰۰ میکرولیتر DMEM حاوی ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تستوسترون. بعد از اضافه نمودن تستوسترون به تیمارهای آزمایشی، پلیت کشت درون انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد) قرار داده شد.

نظر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه شاهد و تیمار ۱ و هم‌چنین بین تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). میانگین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام روزهای کشت در گروه شاهد ($27/08 \pm 2/96$) مشابه تیمار ۱ ($24/67 \pm 3/68$) و در تیمار ۲ ($16/5 \pm 2/03$) نیز مشابه تیمار ۳ ($13/83 \pm 1/59$) بود. در تمام روزهای کشت، تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد و تیمار ۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۲ و تیمار ۳ بود ($P < 0.05$). در تمام گروه‌های آزمایشی تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۱۳ پس از کشت به‌طور معنی‌داری بیشتر از روزهای ۵ و ۹ پس از کشت بود. میانگین تعداد کلونی‌ها در روز ۱۳ پس از کشت ($29/64 \pm 2/87$) در تمام گروه‌های آزمایشی بیشتر از میانگین آن‌ها در روزهای ۹ ($18/06 \pm 1/83$) و ۵ پس از کشت ($13/88 \pm 1/23$) بود ($P < 0.05$).

مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

در جدول شماره ۲ مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه‌های مختلف آزمایش و در روزهای مختلف پس از کشت مقایسه شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود در تمام روزهای پس از کشت از نظر مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه شاهد و تیمار ۱ و هم‌چنین بین تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). میانگین مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام روزهای کشت در گروه شاهد ($0/0519$) مشابه تیمار ۱ ($0/0518$) بود و در تیمار ۲ ($0/0344$) نیز تفاوت معنی‌داری با تیمار ۳ ($0/0242$) نداشت. در تمام روزهای پس از کشت، مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد و تیمار ۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۲ و تیمار ۳ بود ($P < 0.05$). در تمام گروه‌های آزمایشی تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۱۳ پس از کشت به‌طور معنی‌داری بیشتر از روزهای ۵ و ۹ پس از کشت بود. میانگین تعداد کلونی‌ها در روز ۱۳ پس از کشت ($0/0344$) در تمام گروه‌های آزمایشی بیشتر از میانگین آن‌ها در روزهای ۹ ($0/0332$) و ۵ پس از کشت ($0/0534$) بود ($P < 0.05$).

شمارش کلونی‌های سلولی

تعویض محیط کشت و شمارش تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی (شکل شماره ۱) در روزهای ۵، ۹ و ۱۳ پس از شروع کشت به‌کمک میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی چشمی مدرج انجام شد. برای محاسبه مجموع مساحت کلونی‌ها که در این مطالعه واحد آن به میلی‌متر مربع می‌باشد از نرم‌افزار Image J (version 1.240; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) استفاده شد.

آنالیز آماری

سه متغیر مورد ارزیابی در این مطالعه عبارت بودند از: درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی، مساحت کلونی و تعداد کلونی در روزهای ۵، ۹ و ۱۳ پس از کشت. در این مطالعه داده‌های جمع‌آوری شده از لحاظ نرمال بودن ارزیابی شدند. به‌علت عدم توزیع نرمال داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار آماری R (نسخه ۳.۲.۱) داده‌ها نرمال شده و سپس روی آنها آنالیز واریانس انجام شده و اثرات غلظت‌های مختلف تستوسترون، طول مدت کشت و اثرات متقابل (تستوسترون و زمان) مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین تعداد و مساحت کلونی‌ها در تیمارهای مختلف با پس‌آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ صورت پذیرفت.

نتایج

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سلول‌های کشت شده در این مطالعه، آنتی‌ژن PGP9.5 را بیان کردند. سیتوپلاسم این سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای در آمد که به‌خوبی در گسترش زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ برابر قابل مشاهده بود (شکل شماره ۲). به‌علاوه، درصد زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی بلافاصله بعد از جداسازی $86/77 \pm 3/63$ درصد بود.

تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی

در جدول شماره ۱ تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی بین تیمارهای مختلف و بین روزهای مختلف کشت مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تمام روزهای پس از کشت از

جدول شماره ۱- تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی ($\bar{X} \pm SEM$) در گروه‌های مختلف آزمایشی در روزهای مختلف پس از کشت

روز	گروه‌های آزمایشی			
	شاهد	۱	۲	۳
۵	$33/17 \pm 18/25$	$31/32 \pm 14/5$	$11/55 \pm 11/5$	$22/28 \pm 11/25$
۹	$33/66 \pm 25/5$	$33/06 \pm 19/75$	$11/19 \pm 13/5$	$33/06 \pm 13/5$
۱۳	$37/5 \pm 3/17$	$39/75 \pm 4/38$	$24/5 \pm 2/96$	$16/75 \pm 2/81$
میانگین گروه	$27/96 \pm 27/08$	$33/68 \pm 24/67$	$12/03 \pm 16/5$	$11/59 \pm 13/83$

a و b: مقادیر متفاوت در هر ردیف با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

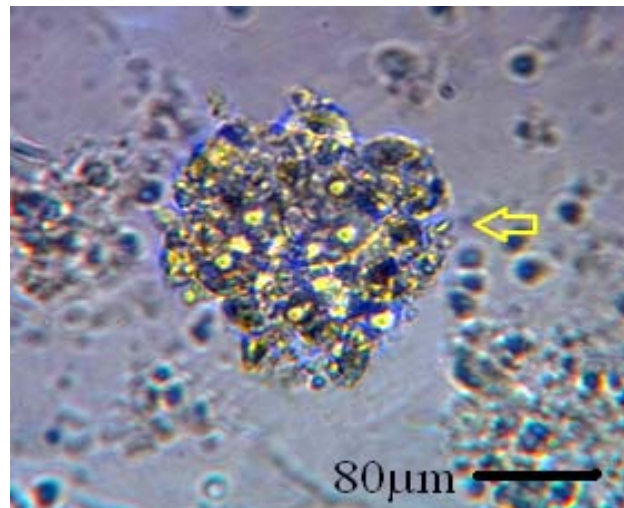
c و d: مقادیر متفاوت در هر ستون با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

جدول شماره ۲- مجموع مساحت کلونی های اسپرماتوگونی ($\bar{X} \pm SEM$) (mm²) گروه های آزمایشی مختلف در روزهای مختلف پس از کشت

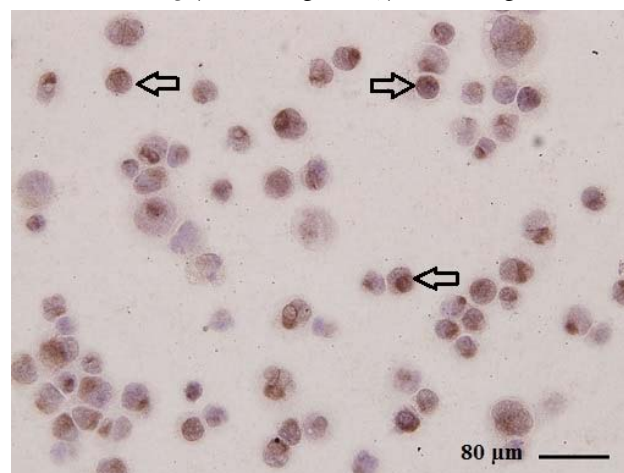
گروه های آزمایشی				
روز	شاهد	۱	۲	۳
۵	۰/۰۱۱±۰/۰۴۳۱ ^{ac}	۰/۰۱۴±۰/۰۴۳۸ ^{ac}	۰/۰۲۲±۰/۰۳۱۲ ^{bc}	۰/۰۰۶±۰/۰۳۴۸ ^{bc}
۹	۰/۰۰۸±۰/۰۴۷۴ ^{ac}	۰/۰۰۹±۰/۰۳۶۹ ^{ac}	۰/۰۰۹±۰/۰۲۵۴ ^{bc}	۰/۰۰۱±۰/۰۲۳۵ ^{bc}
۱۳	۰/۰۶۵۴±۰/۰۱۴ ^{ad}	۰/۰۷۴۷±۰/۰۱۲ ^{ad}	۰/۰۴۵۵±۰/۰۰۷ ^{bd}	۰/۰۲۸±۰/۰۰۵ ^{bd}
میانگین گروه	۰/۰۵۱۹±۰/۰۰۶ ^a	۰/۰۵۱۸±۰/۰۰۷ ^a	۰/۰۳۴±۰/۰۰۴ ^b	۰/۰۲۴۲±۰/۰۰۲ ^b

a و b: مقادیر متفاوت در هر ردیف با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).

c و d: مقادیر متفاوت در هر ستون با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).



شکل شماره ۱- کلونی سلول های اسپرماتوگونی در روز ۱۳ پس از کشت (Bar=۸۰ μm)



شکل شماره ۲- رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی ژن PGP9.5 سلول های اسپرماتوگونی تیپ A جدا شده از کشت (پیکان) (Bar=۸۰ μm)

بحث

می باشند: سلول های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A و سلول های سرتولی. بنابراین مناسب ترین سن برای جداسازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه گوسفند، پیش از بلوغ می باشد [۱۷]. باتوجه به افزایش نرخ ناباروری و بیماری هایی همچون سرطان های مرتبط با بیضه، درک منشاء این بیماری ها امری مهم و حیاتی است. درک فرآیندهای کنترلی اسپرماتوژنز و رشد سلول های اسپرماتوگونی توسط هورمون ها لازمه دستیابی به راه کارهای بهتر،

هدف از انجام این مطالعه، کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه بره نابالغ و بررسی اثرات غلظت های مختلف هورمون تستوسترون بر تشکیل کلونی های مشتق از این سلول ها در محیط کشت بود. استخراج سلول های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه گوسفند نابالغ آسان تر است، زیرا بافت پوششی لوله های منی ساز بیضه در مرحله قبل از بلوغ دارای دو نوع سلول مشخص

آن‌ها باشد [۳۰]. در مطالعه حاضر مشاهده شد که افزایش غلظت تستوسترون نقش مثبتی در تزیاد کلونی‌های کشت شده داشت که با نتایج برخی مطالعات هم‌راستا می‌باشد. تاجیک و همکاران به بررسی اثرات تستوسترون و FSH بر روی تشکیل کلونی اسپر-ماتوگونی در محیط کشت پرداختند و نشان دادند که FSH فاکتور موثرتری به‌منظور کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی در محیط کشت نسبت به هورمون تستوسترون می‌باشد [۲۲]. در مطالعه انجام شده مساحت کلونی‌های اسپر-ماتوگونی با افزایش غلظت تستوسترون در گروه‌های تیمار نسبت به کنترل کاهش یافت که مطالعه ما با این یافته‌ها هم‌خوانی دارد. از دلایلی که در رابطه با اثر کاهشی تستوسترون در محیط کشت ذکر شده این است که سلول‌های سرتولی سیتوکاین‌ها و فاکتورهایی ترشح می‌کنند که نقش مهمی در تمایز سلول‌های زایا دارند و اضافه نمودن هورمون تستوسترون به محیط کشت باعث تحریک تمایز سلول‌های سرتولی می‌شود و در پاسخ به این تحریک، سلول‌های سرتولی فاکتورهای میتوژنیک ترشح می‌کنند که آغازگر اسپر-ماتوژنز و ورود سلول‌های اسپر-ماتوگونی به تمایز است و با شروع تمایز سلول‌ها از روند کلونی‌زایی خارج می‌شوند [۳۱، ۳۲]. از جمله فاکتورهای ترشح شده توسط سلول‌های سرتولی می‌توان BMP4 و Activin A را نام برد که موجب تحریک تمایز در سلول‌های اسپر-ماتوگونی و کاهش تعداد این سلول‌ها در محیط کشت می‌شود [۳۳]. هم‌چنین، باتوجه به نتایج مطالعه حاضر تعیین غلظت مناسب تستوسترون در محیط کشت برای تکثیر سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی از اهمیت زیادی برخوردار است؛ چراکه در صورت بالا بودن سطح تستو-سترون در محیط کشت، سلول‌های اسپر-ماتوگونی وارد فرآیند تمایز شده و از روند خودنوزایی و تشکیل کلونی خارج می‌شوند [۳۳]. سالاروندیان و همکاران با افزودن هورمون GnRH به محیط کشت سلول‌های اسپر-ماتوگونی گوسفند مشاهده کردند که این هورمون با دوز ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث تکثیر کلونی‌های اسپر-ماتوگونی در کشت کوتاه‌مدت می‌شود و احتمالاً با تاثیر بر سلول‌های سرتولی باعث آزادسازی سیتوکین و فاکتورهای رشد موثر بر سلول‌های اسپر-ماتوگونی می‌شود. این محققین اعتقاد دارند که اکثر هورمون‌ها تاثیر مستقیمی بر کلونی‌های اسپر-ماتوگونی نداشته و همان‌گونه که ذکر شد تاثیر مفید یا سوء خود را به‌واسطه سلول‌های سرتولی و در نهایت فاکتورهای مترشحه از آن بر کلونی اعمال می‌کنند [۳۴]. انجم‌روز و همکاران به بررسی اثرات فاکتور رشد اپیدرمال (EGF)، FSH و تستوسترون بر روی کلونی‌زایی سلول‌های اسپر-ماتوگونی در موش پرداختند و نشان دادند که EGF بهترین فاکتور برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپر-ما-

گسترده‌تر و عمیق‌تر کنترل اسپر-ماتوژنز و بهبود کنترل باروری در جنس نر می‌باشد [۱۹]. در این مطالعه میانگین درصد سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی زنده بلافاصله بعد از جداسازی حدود ۸۷ درصد بود. Zou و همکاران درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی بلافاصله بعد از جداسازی را $85/3 \pm 1/2$ درصد گزارش کرده‌اند [۲۰]. ایزدیار و همکاران نیز درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی گوسفند را بلافاصله بعد از جداسازی $86/5 \pm 3/5$ درصد گزارش نموده‌اند [۲۱]. تاجیک و همکاران درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی در گوسفند را بلافاصله پس از جداسازی $84/5$ درصد بیان کرده‌اند [۲۲]. نتایج مطالعه حاضر از نظر درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی با نتایج مطالعات فوق هم‌خوانی دارد که خود بیان-گر روش صحیح جداسازی و انتخاب دوز مناسب آنزیم‌ها می‌باشد. هم‌چنین، در مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 استفاده شد و مشاهده گردید که سلول‌های جدا شده از بیضه بره این نشان‌گر پروتئینی را بیان کردند، لذا می‌توان از این نشان‌گر برای شناسایی سلول‌های اسپر-ماتوگونی گوسفند بهره جست. در مطالعات مختلف از آنتی‌بادی علیه PGP9.5 به-منظور شناسایی ایمونوسیتوشیمی و ایمنوهیستوشیمی سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی تیپ A در گونه‌های مختلف از جمله موش [۲۳]، گاو [۲۴]، گوسفند [۱۷]، بز [۳] و انسان [۲۵] استفاده شده است. همان‌گونه که در قسمت نتایج گزارش شد با گذشت زمان، تعداد و مساحت کلونی‌های اسپر-ماتوگونی افزایش یافت که با نتایج دیگر مطالعات نیز هم‌خوانی دارد [۲۶، ۲۲]. این امر نشان دهنده صحت عملکرد محیط کشت انتخابی و شرایط آزمایشگاه در طی مدت کشت بوده است. در تحقیقات انجام شده توسط محققین، دست‌کاری‌های مختلفی در محیط کشت و مواد اضافه شونده به محیط کشت به‌منظور تزیاد و افزایش میزان زنده‌مانی سلول‌های اسپر-ماتوگونی صورت گرفته است [۵، ۴]. در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS، تعداد سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی تیپ A ثابت باقی می‌ماند و تعداد آن‌ها افزایش نمی‌یابد [۲۷]. در مطالعات مختلف، عوامل مختلفی برای حفظ قدرت خود-نوسازی سلول‌های اسپر-ماتوگونی به محیط کشت اضافه شده است [۲۸]. شواهد مختلف نشان داده است که اکثر فاکتورهای رشد دارای اثرات طبیعی و گاهی حتی کاهنده بر روی تعداد سلول‌های بنیادی اسپر-ماتوگونی می‌باشند [۲۹]. افزایش تعداد سلول‌ها با افزودن فاکتورهای رشد می‌تواند به‌دلیل بهبود سطح خودنوزایی و کاهش تعداد می‌تواند نشان‌دهنده مرگ سلول‌های بنیادی و یا تمایز

افزودن تستوسترون به تنهایی به محیط کشت تاثیر مثبتی در القاء کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ندارد و دلیل آن احتمالا القاء تمایز در سلول‌ها می‌باشد. پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی تاثیر تستوسترون بر تکثیر کلونی اسپرماتوگونی با دوزهای کمتر و توام با هورمون‌های دیگر مورد آزمایش قرار داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری حرفه‌ای دامپزشکی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه رازی می‌باشد.

توگونی در محیط آزمایشگاه است. در ضمن ایشان نشان دادند که افزودن تستوسترون به محیط کشت موجب تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتونی و عدم توانایی این سلول‌های تمایز یافته در تشکیل کلونی می‌شود [۴]. Vigier و همکاران نشان دادند که FSH و تستوسترون بر روی تعداد سلول‌های زایای آپاپتوتیک و همچنین میزان زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی تاثیری نداشته، ولی با اضافه کردن هورمون‌ها چه به تنهایی و چه به صورت ترکیبی موجب تمایز بیشتر گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل می‌شود [۳۵].

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که

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] Hil JR, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(1-2): 13-8.
- [3] Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Shirazi A, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(10): 1029-38.
- [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] 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.
- [6] Izadyar F, Den Ouden K, 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.
- [7] 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.
- [8] Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, De Rooij DG, Hess MW, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287(5457): 1489-93.
- [9] Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 1993; 147: 25-96.
- [10] Walker WH. Testosterone signaling and the

- regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2011; 1(2): 116-20.
- [11] Ruwanpura SM, McLachlan RI, Stanton PG, Meachem SJ. Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats. *Biol Reprod* 2008; 78(4): 705-13.
- [12] Vera Y, Erkkila K, Wang C, Nunez C, Kytanen S, Lue Y, et al. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and inducible nitric oxide synthase in apoptotic signalling of murine and human male germ cells after hormone deprivation. *Mol Endocrinol* 2006; 20(7): 1597-609.
- [13] 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.
- [14] Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Gao F, Zhou RJ, Liu YX. Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22(11): 1028-33.
- [15] Zhang ZH, Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Liu YX. Expression of Bcl-2 and Bax in rhesus monkey testis during germ cell apoptosis induced by testosterone undecanoate. *Arch Androl* 2003; 49(6): 439-47.
- [16] Franca LR, Avelar GF, Almeida FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63(2): 300-18.
- [17] Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* 2006; 66(9): 2091-103.
- [18] Van Pelt AM, Morena AR, Van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, De Rooij DG, et al. Isolation of the synchronized spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol Reprod* 1996; 55(2): 439-44.
- [19] Ruwanpura SM, McLachlan RL, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell

- development. *J Endocrinol* 2010; 205(2): 117-31.
- [20] Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(31): 12740-5.
- [21] Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, Den Ouden K, De Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124(1): 85-94.
- [22] Tajik P, Narenji-Sani R, Moezifar M, Yousefi MH, Movahedian M, Qasemi-Panahi B, et al. Effect of follicle-stimulating hormone and testosterone on colony formation of bovine spermatogonial stem cell. *Comp Clin Path* 2014; 23(4): 901-6.
- [23] Kon Y, Endoh D, Iwanaga T. Expression of protein gene product 9.5., a neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase., and its developing change in sertoli cells of mouse testis. *Mol Reprod Dev* 1999; 54(4): 333-41.
- [24] Zhang Z, Hill J, Holland M, Kurihara Y, Loveland KL. Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures. *J Androl* 2008; 29(4): 418-30.
- [25] Von Kopylow K, Kirchhoff C, Jezek D, Schulze W, Feig C, Primig M, et al. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. *Hum Reprod* 2010; 25(5): 1104-12.
- [26] Asadi MH, Javanmardi S, Movahedin M. Isolation, Expansion and Purification of Mouse Spermatogonial Stem Cells in an Autologous Sertoli Cell Co-culture System. *MJMS* 2013; 15(4): 21-33. [in Persian]
- [27] Hasthorpe S. Clonogenic culture of normal spermatogonia: in vitro regulation of postnatal germ cell proliferation. *Biol Reprod* 2003; 68(4): 1354-60.
- [28] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004; 71(3): 722-31.
- [29] Koruji SM, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *Iran J Reprod Med* 2007; 5(3): 109-15.
- [30] Aponte PM, Van Bragt MP, De Rooij DG, Van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 2005; 113(11-12): 727-42.
- [31] Singh J, Handelsman DJ. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl* 1996; 17(4): 382-93.
- [32] Holmes SD, Spotts G, Smith RG. Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor. *J Biol Chem* 1986; 261(9): 4076-80.
- [33] Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod* 2003; 68(6): 2207-14.
- [34] Salarvandian M, Tajik P, Barin A. Effects of gonadotropin releasing hormone (GnRH) on sheep spermatogonial stem cells proliferation co-cultured with Sertoli cells. *Res Opin Anim Vet Sci* 2015; 4(7): 314-19.
- [35] Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M, Durand P. The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. *J Mol Endocrinol* 2004; 33(3): 729-42.