Original Article

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

Zandi A[1], Rahimi-Feyli P[1*], Moghaddam AA[1], Nikousefat Z[1]

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 platting. 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±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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

ارزیابی تاثیر تستوسترون بر تشکیل کلونی‌زایی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه

عطاالله 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 خالص‌سازی 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 تائید 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 ۳/۶۳±۸۶/۷۷ 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

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک جمعیت سلولی کم‌تعداد است که در یک ریزمحیط پیچیده سلولی درون بیضه قرار گرفته‌اند [۱]. این سلول‌ها با تکثیر و تمایز مداوم خود فرآیند اسپرماتوژنز 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].

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 نوترکیب 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 فاکتورهای رشد مثل GDNF، FGF، LIF، EGF، CSF، هورمون‌هایی از قبیل GnRH، FSH و سلول‌های تغذیه کننده مختلفی برای بهبود وضعیت بقاء، تکثیر و بعضا تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شده است [۷-۴]. 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 شدیدا با مشکل روبرو شده است که علت این امر می‌تواند

[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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

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 هم‌چنین 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 کاملا وابسته به تولید تستوسترون 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 [۱۳-۱۱]. در مدل‌های غیرانسانی مانند پریمات‌ها 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. باتوجه 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 اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی تیپ A و سلول‌های سرتولی. بنابراین، مناسب‌ترین سن برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه 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 پارانشیم 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 استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و به‌منظور حذف آلودگی احتمالی به‌مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سه بار سانتریفوژ (Hettach, Germany) شد.

هضم آنزیمی بافت پارانشیم بیضه

جهت جداسازی سلول‌های لوله‌های منی‌ساز از بافت پارانشیم بیضه از روش van Pelt و همکاران استفاده شد [۱۸] که به‌شرح ذیل می‌باشد: بافت پارانشیم 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 پارانشیم بیضه، کلاژناز تیپ IV (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آنزیم هیالورونیداز تیپ II (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم تریپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma, USA) اضافه گردید. سپس، پتری‌دیش‌های مذکور به‌مدت 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 پارانشیم 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 پارانشیم بیضه در زیر میکروسکوب معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

مورد بررسی قرار گرفت. هدف از هضم آنزیمی مرحله اول جدا کردن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر بود. در ادامه به‌منظور حذف و از بین بردن بافت‌های هضم شده حاصل از جدا شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، محتویات هریک از پتری‌دیش‌ها به داخل لوله‌های فالکون منتقل شد و در دور ۱۴۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس رسوب کف فالکون‌ها که حاوی لوله‌های منی‌ساز بود نگه داشته شده و مایع رویی دور ریخته شد. پس از انجام مرحله اول هضم آنزیمی، محتویات لوله فالکون به داخل پتری‌دیش‌های استریل منتقل شده و به‌منظور 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 دزوکسی ریبونوکلئاز (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس، محتویات پتری‌دیش‌ها به داخل لوله‌های فالکون استریل منتقل شده و به‌منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقیمانده به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰ سانتریفوژ شد. به‌منظور توقف هضم آنزیمی به اندازه حجم آنزیم به‌کار رفته از محلول FBS استفاده شد. سپس، مایع رویی داخل فالکون که حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و میویید بود برداشت شده و درون فالکون دیگری ریخته شد. به‌منظور حذف سلول‌های میویید، تعلیق سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری استریل عبور داده شد و تعلیق حاصل در لوله‌های فالکون جمع‌آوری گردید و هرکدام از لوله‌ها به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۸۰۰ به‌منظور رسوب دادن سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی سانتریفوژ شدند. با دور ریختن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، رسوب موجود در لوله‌های فالکون 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] به‌شرح ذیل استفاده شد: پس از تریپسینه کردن سلول‌ها در روز پایانی کشت، بلوک کردن اولین مکان غیراختصاصی به‌وسیله avidin/biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفند به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. متعاقبا اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش (Dako, Carpinteria, CA, USA) PGP9.5 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 (هربار ۵ دقیقه) در دمای اتاق به‌مدت ۴۵ دقیقه تماس با آنتی‌بادی ثانویه (biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna Research Institute, Iran) قرار گرفت و مجددا با TBS/BSA شستشو داده شد. مقطع به‌مدت 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، به‌مدت ۱۰-۸ دقیقه رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید با آب مقطر کاملا تمیز شد و مجددا با هریس هماتوکسیلین به‌مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شد، مجددا با آب مقطر شستشو داده شد، سپس اسلاید با الکل آب‌گیری شد و با گزیلول شفاف شد و با چسب اِنتِنال (Merck, Germany) پوشانده شد. در نهایت سطح اسلاید به‌وسیله 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 جداشده به پلیت و افزودن تستوسترون

سلول‌های درون لوله‌ی فالکون به پلیت کشت چهار-خانه‌ای (TPP، سوئیس) منتقل شدند. گوده یک به‌عنوان شاهد و گوده‌های ۲، ۳ و ۴ به‌ترتیب جهت تیمار ۱، ۲ و ۳ در نظر گرفته شد. سپس، محلول تستوسترون (Testosterone Enanthate Aburaihan co. Iran، Batch No: 1020) به‌شرح 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 تستو-سترون، 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

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 داده-های 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 $P<۰/۰۵$ 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 ۳/۶۳±۸۶/۷۷ 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 نظر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه شاهد و تیمار ۱ و هم‌چنین بین تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P\geq۰/۰۵$). میانگین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام روزهای کشت در گروه شاهد (۲/۹۶±۲۷/۰۸) مشابه تیمار ۱ (۳/۶۸±۲۴/۶۷) و در تیمار ۲ (۲/۰۳±۱۶/۵) نیز مشابه تیمار ۳ (۱/۵۹±۱۳/۸۳) بود. در تمام روزهای کشت، تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد و تیمار ۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۲ و تیمار ۳ بود ($P<۰/۰۵$). 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 (۲/۸۷±۲۹/۶۴) در تمام گروه‌های آزمایشی بیشتر از میانگین آن‌ها در روزهای ۹ (۱/۸۳±۱۸/۰۶) و ۵ پس از کشت (۱/۲۳±۱۳/۸۸) بود ($P<۰/۰۵$).

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 ($P\geq۰/۰۵$). میانگین مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام روزهای کشت در گروه شاهد (۰/۰۵۱۹) مشابه تیمار ۱ (۰/۰۵۱۸) بود و در تیمار ۲ (۰/۰۳۴) نیز تفاوت معنی‌داری با تیمار ۳ (۰/۰۲۴۲) 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 ($P<۰/۰۵$). 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 (۰/۰۳۴۸) در تمام گروه‌های آزمایشی بیشتر از میانگین آن‌ها در روزهای ۹ (۰/۰۳۳۲) و ۵ پس از کشت (۰/۰۵۳۴) بود ($P<۰/۰۵$).

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

	گروه‌های آزمایشی				
روز	شاهد	۱	۲	۳	میانگین روز
۵	^{ac}۳/۱۷ ± ۱۸/۲۵	^{ac}۱/۳۲ ± ۱۴/۵	^{bc}۱/۵۵ ± ۱۱/۵	^{bc}۲/۲۸ ± ۱۱/۲۵	^{c}۱/۲۳ ± ۱۳/۸۸
۹	^{ac}۳/۶۶ ± ۲۵/۵	^{ac}۳/۰۶ ± ۱۹/۷۵	^{bc}۱/۱۹ ± ۱۳/۵	^{bc}۳/۰۶ ± ۱۳/۵	^{c}۱/۸۳ ± ۱۸/۰۶
۱۳	^{ad}۳/۱۷ ± ۳۷/۵	^{ad}۴/۳۸ ± ۳۹/۷۵	^{bd}۲/۹۶ ± ۲۴/۵	^{bd}۲/۸۱ ± ۱۶/۷۵	^{d}۲/۸۷ ± ۲۹/۶۴
میانگین گروه	^{a}۲/۹۶ ± ۲۷/۰۸	^{a}۳/۶۸ ± ۲۴/۶۷	^{b}۲/۰۳ ± ۱۶/۵	^{b}۱/۵۹ ± ۱۳/۸۳	

a و b: مقادیر متفاوت در هر ردیف با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$).

c و d: مقادیر متفاوت در هر ستون با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$).

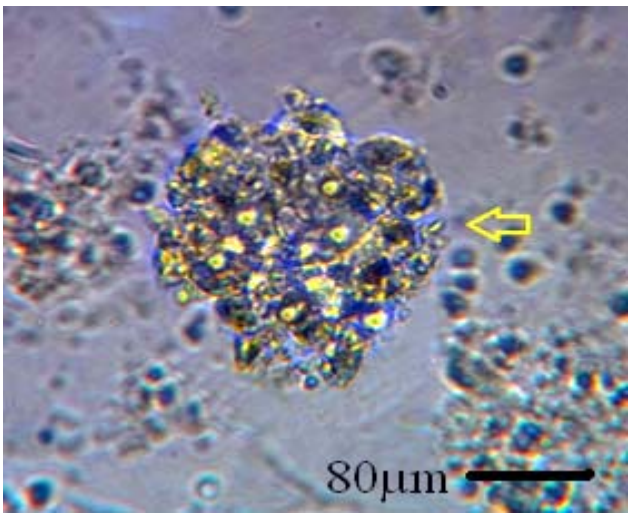
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

جدول شماره ۲- مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی (mm^2) ($\overline{X} \pm SEM$) گروه‌های آزمایشی مختلف در روزهای مختلف پس از کشت

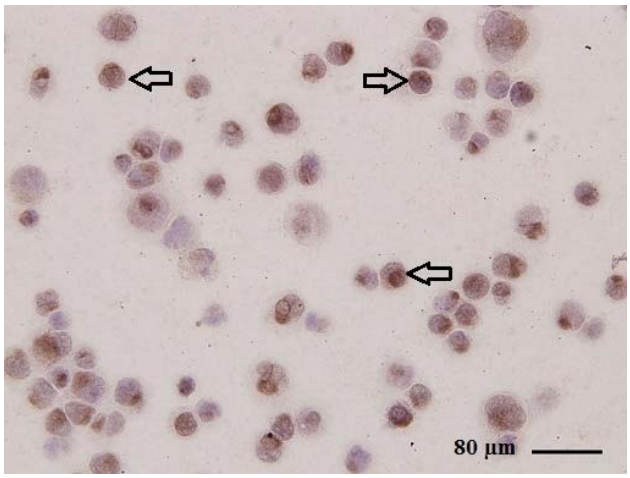
روز	گروه‌های آزمایشی				
	شاهد	۱	۲	۳	میانگین روز
۵	^{ac}۰/۰۱۱±۰/۰۴۳۱	^{ac}۰/۰۱۴ ±۰/۰۴۳۸	^{bc}۰/۰۲۲±۰/۰۳۱۲	^{bc}۰/۰۰۶±۰/۰۳۴۸	۰/۰۳۴۸±۰/۰۰۵^{c}
۹	^{ac}۰/۰۰۸±۰/۰۴۷۴	^{ac}۰/۰۰۹±۰/۰۳۶۹	^{bc}۰/۰۰۹±۰/۰۲۵۴	^{bc}۰/۰۰۱±۰/۰۲۳۵	۰/۰۳۳۲±۰/۰۰۳^{c}
۱۳	۰/۰۶۵۴±۰/۰۱۴^{ad}	۰/۰۷۴۷±۰/۰۱۲^{ad}	۰/۰۴۵۵ ±۰/۰۰۷^{bd}	۰/۰۲۸±۰/۰۰۵^{bd}	۰/۰۵۳۴±۰/۰۰۶^{d}
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 معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

c و d : مقادیر متفاوت در هر ستون با حروف مختلف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).



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



شکل شماره ۲- رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A جدا شده از کشت (پیکان) (Bar=۸۰µm)

بحث

هدف از انجام این مطالعه، کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه بره نابالغ و بررسی اثرات غلظت‌های مختلف هورمون تستوسترون بر تشکیل کلونی‌های مشتق از این سلول‌ها در محیط کشت بود. استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی تیپ A و سلول‌های سرتولی. بنابراین مناسب‌ترین سن برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه گوسفند، پیش از بلوغ می‌باشد [۱۷]. باتوجه به افزایش نرخ ناباروری و بیماری‌هایی همچون سرطان‌های مرتبط با بیضه، درک منشاء این بیماری‌ها امری مهم و حیاتی است. درک فرآیندهای کنترلی اسپرماتوژنز و رشد سلول‌های اسپرماتوگونی توسط هورمون‌ها لازمه دست‌یابی به راه‌کارهای بهتر،

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

گسترده‌تر و عمیق‌تر کنترل اسپرماتوژنز و بهبود کنترل باروری در جنس نر می‌باشد [۱۹]. در این مطالعه میانگین درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی زنده بلافاصله بعد از جداسازی حدود ۸۷ درصد بود. Zou و همکاران درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلافاصله بعد از جداسازی را ۱/۲±۸۵/۳ درصد گزارش کرده‌اند [۲۰]. ایزدیار و همکاران نیز درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند را بلافاصله بعد از جداسازی ۳/۵±۸۶ درصد گزارش نموده‌اند [۲۱]. تاجیک و همکاران درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گوسفند را بلافاصله پس از جداسازی ۸۴/۵ درصد بیان کرده‌اند [۲۲]. نتایج مطالعه حاضر از نظر درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با نتایج مطالعات فوق هم‌خوانی دارد که خود بیان‌گر روش صحیح جداسازی و انتخاب دوز مناسب آنزیم‌ها می‌باشد. هم‌چنین، در مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی 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 اسپرماتوگونی گوسفند بهره جست. در مطالعات مختلف از آنتی‌بادی علیه PGP9.5 به‌منظور شناسایی ایمنوسیتوشیمی و ایمنوهیستوشیمی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی 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 تزاید و افزایش میزان زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی صورت گرفته است [۵،۴]. در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS، تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A ثابت باقی می‌ماند و تعداد آن‌ها افزایش نمی‌یابد [۲۷]. در مطالعات مختلف، عوامل مختلفی برای حفظ قدرت خودنوسازی سلول‌های اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی 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 آن‌ها باشد [۳۰]. در مطالعه حاضر مشاهده شد که افزایش غلظت تستوسترون نقش مثبتی در تزاید کلونی‌های کشت شده نداشت که با نتایج برخی مطالعات هم‌راستا می‌باشد. تاجیک و همکاران به بررسی اثرات تستوسترون و FSH بر روی تشکیل کلونی اسپرماتوگونی در محیط کشت پرداختند و نشان دادند که FSH فاکتور موثرتری به‌منظور کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت نسبت به هورمون تستوسترون می‌باشد [۲۲]. در مطالعه انجام شده مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوژنز و ورود سلول‌های اسپرماتوگونی به تمایز است و با شروع تمایز سلول‌ها از روند کلونی‌زایی خارج می‌شوند [۳۲،۳۱]. از جمله فاکتورهای ترشح شده توسط سلول‌های سرتولی می‌توان BMP4 و Activin A را نام برد که موجب تحریک تمایز در سلول‌های اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی از اهمیت زیادی برخوردار است؛ چراکه در صورت بالا بودن سطح تستوسترون در محیط کشت، سلول‌های اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی گوسفند مشاهده کردند که این هورمون با دوز ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث تکثیر کلونی‌های اسپرماتوگونی در کشت کوتاه‌مدت می‌شود و احتمالا با تاثیر بر سلول‌های سرتولی باعث آزادسازی سیتوکین و فاکتورهای رشد موثر بر سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود. این محققین اعتقاد دارند که اکثر هورمون‌ها تاثیر مستقیمی بر کلونی‌های اسپرماتوگونی 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 اسپرماتوگونی در موش پرداختند و نشان دادند که EGF بهترین فاکتور برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرما-

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

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 به‌تنهایی و چه به‌صورت ترکیبی موجب تمایز بیشتر گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل می‌شود [۳۵].

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که افزودن تستوسترون به‌تنهایی 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.

References:

[1] Dann CT, Alvardo 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 byregulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats. ***Biol Reprod*** 2008; 78(4): 705-13.

[12] Vera Y, Erkkila K, Wang C, Nunez C, Kyttanen S, Lue Y, et al. Involvement of p38 mitogen-activated proteinkinase and inducible nitric oxide synthase in apoptotic signalling of murineand 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 testosteroneundecanoate 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 andBax in rhesus monkey testis during germ cell apoptosis induced bytestosterone 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 a 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]

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 agrowth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) bindingto 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-09-03]