

جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی گاو و بررسی اثر فاکتور رشد اپیدرمال بر تعداد سلول‌ها، اندازه کلونی‌ها و میزان زنده‌مانی اسپرماتوگونی

مهشید ترک زبان^۱، غلامعلی مقدم^{۲*}، پرویز تاجیک^۳ و عباس برین^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۳۰

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

^۲ استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۳ استاد گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

*مسئول مکاتبه: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: فاکتور رشد اپیدرمال می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول‌ها، اندازه کلونی‌ها و میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گردد. **هدف:** این آزمایش به منظور بررسی اثر فاکتور رشد اپیدرمال بر تعداد سلول‌ها، اندازه کلونی‌ها و میزان زنده‌مانی اسپرماتوگونی انجام گرفت. **روش کار:** در این مطالعه سلول‌های اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز از بیضه گوساله با استفاده از مراحل هضم آنزیمی و DSA لکتین جداسازی شدند. ماهیت سلول‌ها علاوه بر ریخت‌شناسی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، از طریق نشانگرهای اختصاصی Oct-4 و ویمنتین در سلول‌های کلونی و سرتولی تأیید شدند. برای تعیین شرایط مناسب کشت و غنی‌سازی سلول‌ها، تعلیق سلولی حاوی سلول‌های بنیادی به صورت هم کشت با سلول سرتولی و افزودن غلظت‌های متفاوت از فاکتور رشد EGF کشت داده شد. در طول ۲ هفته دوره کشت، میزان کلونیزاسیون، با میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شد. در آخرین مرحله، این سلول‌ها در محیط In vitro منجمد-ذوب شدند تا درجه خلوص و قدرت زیست سلول‌های بنیادی ارزیابی شود. **نتایج:** در بررسی سطح به صورت کلی، در تیمار با غلظت ۵۰ نانوگرم EGF افزایش سطح تغییر معنی‌دار بود ($P < 0.05$)، در بررسی کلونی‌های با قطر بزرگتر از ۰/۱۱۴ میلی‌متر ($\pm SE$)، افزایش قطر کلونی‌ها در غلظت ۵۰ نانوگرم معنی‌دار بود ($P < 0.05$)، اما در اندازه کلونی‌ها در شمارش روز آخر تغییر معنی‌داری در هیچ کدام از گروه‌های آزمایشی دیده نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** مطالعه حاضر نشان می‌دهد که می‌توان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را با درجه خلوص بالا از بیضه گوساله جدا کرد و همچنین از رابطه متقابل بین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی و بعضی فاکتورهای رشد برای شروع، حفظ فرایند اسپرم‌زایی و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی در طی کشت و افزایش درجه خلوص و قدرت زیست آنها در طی انجماد استفاده کرد. در تجزیه و تحلیل آماری از آزمون ANOVA استفاده شد و $P < 0.05$ ، به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، اسپرماتوگونی، کلونیزاسیون، هم‌کشتی، EGF

مقدمه

اسپریم‌زایی، فرآیند بسیار پیچیده و سازمان یافته‌ای از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که طی تقسیمات متوالی میتوز و میوز در نهایت به تعداد بی‌شماری اسپرماتوزوآ تمایز پیدا می‌کنند (فلیپس و همکاران ۲۰۱۰ و اوتلی و برینستر ۲۰۰۶). همچنین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برای آغاز و تداوم اسپرم‌زایی لازم و ضروری هستند (کایرس و همکاران ۲۰۱۰). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هم دارای توانایی خود تکثیری و هم تولید سلول‌هایی است که قادر به تمایز می‌باشند. انواع مختلف سلول‌های بنیادی در یک حیوان وجود دارد، اما سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منحصر به فرد بوده چون تنها سلول بدنی است که با تقسیم خود می‌تواند ژن‌ها را به سلول‌های فرزندان بعد از خود منتقل نماید، در نتیجه این سلول منبع ارزشمند جهت آزمایش‌های بیولوژیکی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری در زمینه دام و اصلاح ژنتیکی از طریق دستورزی سلول ژرم نر می‌باشد (نینگ و همکاران ۲۰۱۲ و لیو و همکاران ۲۰۱۱). اسپرماتوگونی‌ها بر روی غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز قرار دارند بنابراین در همان محل تقسیم و تمایز می‌یابند. این سلول‌ها درصد خیلی کمی از سلول‌های بیضه‌ها را تشکیل می‌دهند، از 10^8 سلول در بیضه موش، تقریباً 10^4 عدد از آن، سلول بنیادی است (تگلنباش ودی رویژ ۱۹۹۳، ایزدیار و همکاران ۲۰۰۳، راسل ۱۳۹۳ و دی کرتسر و همکاران ۱۹۹۸). کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، انجامد و پیوند آنها روشی نوین است که کمک قابل توجهی در شناخت بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل مؤثر در ناباروری کرده است (رادفورد و همکاران ۱۹۹۹). استفاده از این آموخته‌ها و موفقیت در پیوند این سلول‌ها و کاربرد آن در جوندگان باعث شده کاربرد آن در علوم دامی مورد توجه قرار گیرد (اپونته و دی رویژ ۲۰۰۸ و هرید و همکاران ۲۰۰۷). با وجود پیشرفت بسیار زیاد این علم در حیوانات آزمایشگاهی، پیشرفت این علم در

دام‌های مزرعه‌ای روند بسیار کندی داشته (اپونته و دی رویژ ۲۰۰۸)، عواملی چون عدم دسترسی به نشانگرهای اختصاصی جهت شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و دانش ناکافی در مورد نیازهای تغذیه‌ای و فاکتورهای رشد مورد نیاز سلول‌های اسپرماتوگونی مانعی در مسیر تحقیقات مربوط به کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بوده است (گوسنز و همکاران ۲۰۰۳ و اپونته و همکاران ۲۰۰۵). تا کنون سیستم‌های مختلفی برای کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف حیوانات مانند موش و گاو به کار رفته است و در حقیقت این تحقیقات گام‌های اولیه در جهت فرایند اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه است (ایزدیار و همکاران ۲۰۰۳، کوباتا و همکاران ۲۰۰۴، کاناتسوشینوهارا و همکاران ۲۰۰۳a و همکاران a ۲۰۰۵). استفاده از محیط‌های کشت سرم‌دار و بدون سرم (کاناتسوشینوهارا و همکاران ۲۰۰۵b و کریمرز و همکاران ۲۰۰۲)، هم کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی (کروجی و همکاران ۲۰۰۹، اپونته و همکاران ۲۰۰۶) و اضافه کردن فاکتورهای رشد مثل Epidermal Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2), Inhibitory Leukemia Factor GDNF (LIF), Epidermal Growth Factor (EGF) (کوباتا و همکاران ۲۰۰۴، کاناتسوشینوهارا و همکاران ۲۰۰۳b) و غیره نتیجه تلاش محققان برای ایجاد محیط مناسب برای رشد این سلول‌ها بود که موفقیت چندانی نداشت، اما جیونگ و همکاران با کشت سلول‌های موش بالغ بر روی سلول‌های سرتولی در محیط کشت حاوی DMEM و همچنین افزودن بعضی فاکتورهای رشد، کلونی‌های سلول‌های زاینده را از ۸ تا ۲۳ روز بعد از کشت مشاهده کردند (جیونگ و همکاران ۲۰۰۳). روش انجامد بهترین روش برای نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. برای افزایش میزان زنده ماندن سلول‌ها مطالعات زیادی صورت گرفته و ضد یخ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است

داده شد. پس از طی این مرحله، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز، چند بار (تا زمانی که محیط روی رسوب قطعات بیضه‌ها شفاف شود) و هر بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۳۰۰g (معادل ۱۲۰۰RPM) سانتریفوژ شد (۴-۳ بار). بعد از هر بار سانتریفوژ محیط بالای رسوب، ته لوله با محیط DMEM تازه جایگزین شد. این کار باعث حذف بافت بینابینی، اسپرم‌ها و اسپرماتیدها از قطعات بیضه شد و قطعات لوله‌های منی‌ساز که حاصل اولین مرحله از هضم آنزیمی بودند وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شدند. در این مرحله تجمعات سلولی موجود در تعلیق تا حد امکان خرد شدند. تعلیق با سرعت ۳۰g (RPM ۴۰۰) سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، قطعات هضم نشده لوله‌های منی‌ساز در ته لوله رسوب کرده و بعضی از تجمعات سلولی در تعلیق، بالا قرار گرفتند. قسمت بالایی تعلیق را از فیلترهای نایلونی ۷۰µm عبور داده تا تجمعات سلولی موجود از سلول‌های منفرد تعلیق جدا شود. سپس سلول‌های منفرد حاصل، با دو بار سانتریفوژ کردن شستشو شدند و به تعلیق حاصل محیط تازه دارای ۵ درصد سرم آلبومین گاوی (BSA, Sigma) اضافه شد (کروچی ۲۰۰۷). تعلیق حاصل عمدتاً حاوی دو نوع سلول (سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی) بود که در مراحل بعدی برای جدا کردن سلول‌های سرتولی از تعلیق از روش اسکارپینو^۱ و همکاران (۱۹۹۸) و برای جدا کردن سلول‌ها اسپرماتوسیت از روش وان پلت^۲ و همکاران (۱۹۹۵) استفاده شد. بعد از جدا کردن سلول‌های سرتولی و اسپرماتوسیت، سلول‌های اسپرماتوگونی که در تعلیق شناور بودند پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰g (معادل ۲۲۰۰RPM) جداسازی شد. این سلول‌ها جهت انجام آزمایشات مختلف مورد استفاده قرار گرفت. به کمک این روش، سلول‌های اسپرماتوگونی با درجه خلوص ۴۰ تا ۵۰ درصد جداسازی و درصد

نتایج این بررسی‌ها نشان داده که دی متیل سولفوکسید (DMSO)، برای انجماد سلول اسپرماتوگونی بهتر است و بعد از انجماد، بیشتر سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها زنده می‌مانند (ایزدیاز و همکاران ۲۰۰۲).

در این تحقیق ضمن تعیین روش مناسب جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی از سلول‌های لوله‌های منی‌ساز گوساله، اثر هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و افزودن فاکتور رشد EGF بر غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوساله مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوساله پس از انجماد - ذوب محاسبه شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش از بیضه ۱۰ گوساله، بیوپسی به روش (TESE) طبق دستورالعمل تومای (۱۹۹۶) انجام شد. قطعات ۵×۵ میلی‌متری از بیضه‌ها برداشته و پس از جداسازی در یک لوله استریل فالكون محتوی محیط کشت قرار داده شد، در همان زمان برای انجام آزمایش به آزمایشگاه انتقال یافت. بعد از شستشو در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco-BRL, Life Technologies, PaisleyUK))، به محیط کشت DMEM حاوی آنزیم جهت هضم آنزیمی مرحله اول منتقل گردید.

آنزیم‌های لازم جهت هضم آنزیمی

۱. کلاژناز/دیسپاز ۰/۵ mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)

۲. تریپسین ۰/۵ mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)

۳. دناز ۰/۵ mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)

در مرحله اول هضم آنزیمی نمونه جدا شده از بیضه در محیط کشت حاوی آنزیم‌های هضمی به طور مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در طی این مدت هر ۱۰ دقیقه یکبار به آرامی توسط سمپلر و به مدت ۱ دقیقه تکان

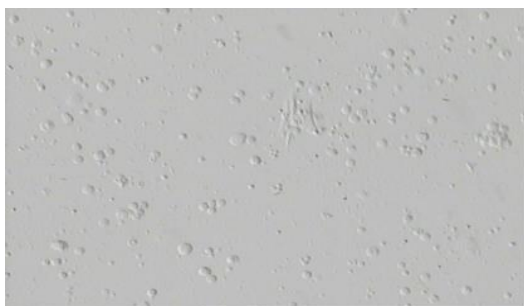
¹ Scarpino

² Van Pelt

شده از لوله‌های منی‌ساز گوساله حاوی انواع رده‌های مختلف سلولی ژرم با اندازه و شکل متفاوت به شرح زیر بود.

سلول‌های اسپرماتوگونی

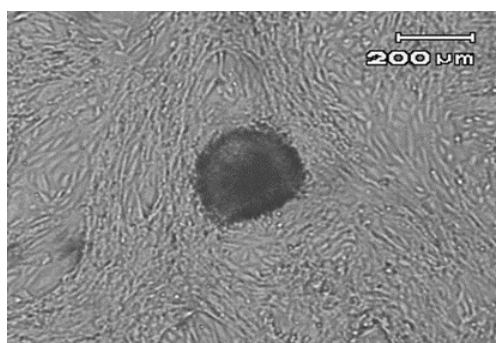
قطر آنها بین ۸-۱۰ μm بوده و این سلول‌های کروی شکل حاوی دو تا سه هسته خارج مرکزی^۴ بودند. این سلول‌ها پس از تقسیم، کلونی‌های سلولی ایجاد کردند (شکل ۱).



شکل ۱- سلول‌های اسپرماتوگونی
Figure 1- spermatogonial stem cells

سلول‌های سرتولی

شکل نامنظم داشته و در اولین هفته کشت زوائد کشیده و پهنی پیدا کرده و سعی در برقراری تماس با سلول مجاور را داشتند. این سلول‌ها پس از تقسیم، یک لایه سلول در کف پتری دیش ایجاد کردند (شکل ۲).



شکل ۲- سلول‌های سرتولی چسبیده در کف پتری دیش که کلونی اسپرماتوگونی را احاطه کرده‌اند
Figure 2- Sertoli cells around the spermatogonial colony

حیات سلول‌ها به کمک محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو^۱ ارزیابی شد. بعد از شکل‌گیری سلول‌های سرتولی (لایه تغذیه‌کننده^۲)، (یک هفته پس از کشت)، تعلیق سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A روی این لایه تغذیه‌کننده، در ۵ گروه انجام گرفت. یک گروه، گروه کنترل، فقط حاوی محیط کشت DMEM دارای ۵ درصد سرم، و چهار گروه به این ترتیب: گروه اول شامل محیط کشت DMEM دارای ۵ درصد سرم بعلاوه EGF با غلظت ۴ ng/ml، گروه دوم شامل محیط کشت DMEM دارای ۵ درصد سرم به علاوه EGF با غلظت ۱۲ ng/ml، گروه سوم شامل محیط کشت DMEM دارای ۵ درصد سرم بعلاوه EGF با غلظت ۲۰ ng/ml، گروه چهارم شامل محیط کشت DMEM دارای ۵ درصد سرم به علاوه EGF با غلظت ۵۰ ng/ml، در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته کشت شدند. ارزیابی کلونی از نظر تعداد و قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ به کمک میکروسکوپ معکوس^۳ (Germany zeiss)، که به عدسی چشمی مدرج، مجهز شده بود مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. و اسپرماتوگونی و ردیابی آنها پس از پیوند به وسیله آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی ویمنتین، برای سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوگونی و ایمونوهیستوشیمی Oct-۴، برای سلول‌های اسپرماتوگونی مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل اطلاعات آماری برای تعیین بهینه‌سازی شرایط و کشت سلول‌ها به کمک تجزیه و تحلیل ANOVA با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد، تفاوت داده‌ها در سطح $P \leq 0.05$ معن دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بعد از کشت سلول‌ها ماهیت سلول‌های بدست آمده به ترتیب زیر مورد بررسی قرار گرفت، تعلیق سلولی جدا

¹ Trypan blue

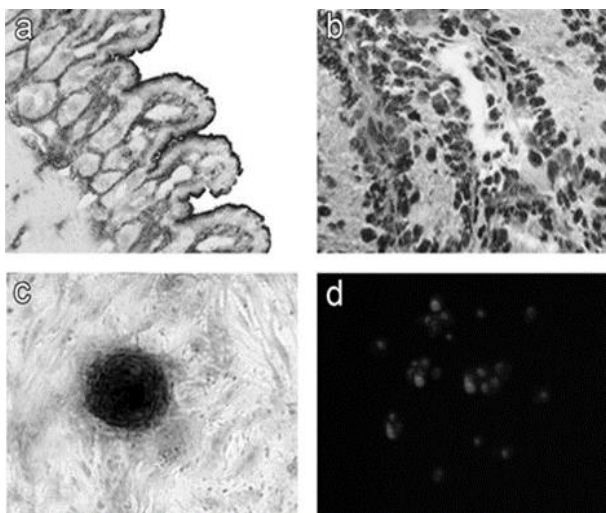
² Feeder layer

³ Invert-phase microscope

⁴ Eccentric

آزمون ایمونوهیستوشیمی، وجود پروتئین سایتواسکتون ویمنتین در آنها بررسی شد و نتایج نشان داد که سلول‌های سرتولی گوساله دارای این پروتئین هستند (شکل ۳).

برای تأیید بیشتر ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی، علاوه بر ریخت‌شناسی، نشانگر اختصاصی Oct-4 در سلول‌های کلونی حاصل شده نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که سلول‌های کلونی در محیط کشت، Oct-4 را بیان کردند (شکل ۴). اثر فاکتور رشد EGF در چهار دوز مختلف در هم‌کشتی این سلول‌ها با سلول‌های سرتولی روی میزان کلونیزاسیون سلول‌ها در طی دو هفته ارزیابی شد (کروجی ۲۰۰۷).

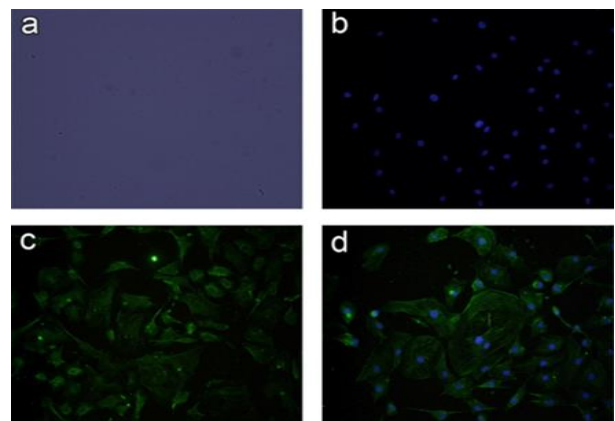


شکل ۴- نتایج آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی

- (a) بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روده موش
 (b) بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بافت بیضه
 (c) بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تک لایه کف پتری دیش
 (d) بیان نشانگر اختصاصی Oct-4 در سلول‌های کلونی

Figure 4- The results of immunohistochemically tests
 (a) Investigating the Activity of Alkaline Phosphatase Enzyme in the Mouse's Intestine.
 (b) Investigating Alkaline Phosphatase Enzyme Activity in Testicular Tissue.
 (c) Investigating the Activity of Alkaline Phosphatase Enzyme in Petri Dish Single Layer.
 (d) Specific expression of Oct. 4 in colony cells

در مرحله‌ی بعد، فعالیت آلکالین فسفاتاز بیضه بررسی شد، برای تأیید فعالیت آلکالین فسفاتاز، ابتدا به‌عنوان کنترل مثبت بافت روده موش که دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز زیاد است مورد بررسی قرار گرفت. بررسی روده موش نشان داد که حاشیه مسواکی پرزهای روده^۱ (قرمز رنگ)، جایگاه فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است. در مرحله بعد فعالیت آلکالین فسفاتاز بیضه بررسی شد. بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های سرتولی نشان داد که این سلول‌ها فاقد فعالیت آلکالین فسفاتازی هستند (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج آزمون‌های ایمونوسیتوشیمی

(a) سلول‌های سرتولی بدون رنگ آمیزی. (b) هسته سلول‌های سرتولی رنگ آمیزی شده با DAPI. (c) سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی رنگ آمیزی شده با FITC. (d) سلول‌های سرتولی رنگ آمیزی شده با آنتی ویمنتین

Figure 3- The results of immunohistochemically tests
 (a) Sertoli cells without coloring. (b) The core of the Sertoli cells stained with DAPI. (c) Sertoli cells cytoplasm stained with FITC. (d) Sertoli cells stained with anti-vimentin

بررسی نشان داد که سلول‌های تشکیل‌دهنده کلونی (سلول‌های اسپرماتوگونی) دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز مثبت هستند، برای اینکه مشخص شود که سلول‌های جدا شده به کمک DSA لکتین که نهایتاً لایه تغذیه‌کننده را تشکیل دادند همان سلول‌های سرتولی هستند، به کمک

^۱Brush border of villous

همچنین این سلول‌ها تقریباً به صورت گرد مشاهده شدند و اقطار متفاوتی داشتند (این سلول‌ها ۳-۴ روز بعد از کشت در محیط کشت قابل تشخیص بودند). تقسیمات سلولی جهت تشکیل کلونی در سلول‌های اسپرما توگونی هم زمان نبود به طوری که با گذشت زمان تعداد کلونی‌ها افزایش معنی‌داری ($p \leq 0/05$) نشان داد. طوری که تعداد کلونی‌ها در روز پنجم، ($17,38 \pm 4,26$) (جدول ۳) و در روز پایانی شمارش (روز چهاردهم)، ($235,38 \pm 11,78$) بود (جدول ۳)، علاوه بر این، سطح کل آنها نیز افزایش معنی‌داری داشت، این نتیجه با مطالعات کروجی و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت. بعد از اضافه کردن مقادیر متفاوت EGF نتایج زیر، مشاهده شد: (در بررسی‌های قبلی، افزایش قطر کلونی‌ها مورد بررسی قرار می‌گرفت، و شمارش از کلونی‌های با قطر $0/114 \times$ میلی‌متر و بزرگتر آغاز می‌شد)، اما در این تحقیق، به خاطر اندازه‌گیری سطح کلی کلونی‌ها، هم کلونی‌های کوچکتر مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۱ و ۲)، هم کلونی‌های با قطر $0/114 \times 0/114$ میلی‌متر و بزرگتر (جدول شماره ۳ و ۴). تعداد کلونی‌های در محیط کشت حاوی ۴ نانوگرم EGF در میلی‌لیتر، در شمارش‌های اول تا چهارم (روزهای پنجم، هشتم، یازدهم و چهاردهم)، نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت، در غلظت ۱۲ نانوگرم EGF، نیز در هیچ کدام از روزها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در غلظت ۲۰ نانوگرم EGF، افزایش تعداد کلونی‌ها نسبت به گروه شاهد فقط در شمارش روز یازدهم معنی‌دار بود و در سایر روزها اختلافات معنی‌دار نبودند، در غلظت ۵۰ نانوگرم EGF، تعداد کلونی‌ها در سه شمارش اول (روزهای پنجم، هشتم و یازدهم)، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت. اما در نهایت در شمارش روز آخر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول شماره ۱)، در بررسی سطح به صورت کلی، در تیمارهای با غلظت ۴ نانوگرم EGF، در بررسی‌های اول و دوم (روزهای پنجم و

هشتم) تغییرات نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود، اما در شمارش روزهای یازدهم و چهاردهم، داده‌ها تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان ندادند (جدول شماره ۲)، در غلظت ۱۲ نانوگرم EGF، در میلی‌لیتر محیط کشت، در بررسی همه روزهای شمارش، افزایش سطح کلونی‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. در تیمارهای با غلظت ۲۰ نانوگرم EGF در هیچ کدام از بررسی‌ها در روزهای پنجم، هشتم و چهاردهم هیچ تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. اما در روز یازدهم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در تیمار با غلظت ۵۰ نانوگرم در بررسی اول (روز پنجم) افزایش سطح تغییر معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد، همین‌طور در بررسی روزهای هشتم، یازدهم، چهاردهم تفاوت‌ها نسبت به تیمار کنترل کاملاً معنی‌دار بود. در بررسی کلونی‌های با قطر بزرگتر از $0/114$ میلی‌متر ($\pm SE$)، در نمونه‌های با غلظت ۴ نانوگرم EGF هیچ کدام از داده‌ها اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند، به جز شمارش روز هشتم. در غلظت ۱۲ نانوگرم، فقط در شمارش روز یازدهم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد. در غلظت ۲۰ نانوگرم دقیقاً این مطلب تکرار شد و در تیمارهای با ۵۰ نانوگرم EGF در شمارش روز اول، تفاوت معنی‌دار بود. تعداد کلونی‌ها در شمارش‌هایی در غلظت‌های ۲۰ و ۱۲ از همه بالاتر بود اما در اندازه‌گیری سطح در غلظت ۵۰ نانوگرم اندازه سطح بزرگتر بود این نشان دهنده افزایش قطر کلونی‌ها در غلظت ۵۰ نانوگرم است اما همان‌طور که نشان داده شده اندازه قطر در غلظت‌های ۲۰ و ۱۲ تفاوت چندانی ندارند (جدول شماره ۴). و همچنین تفاوت معنی‌داری در تعداد کلونی‌ها در شمارش روز اول بین غلظت‌های ۴، ۲۰، و ۵۰ نانوگرم مشاهده نشد، اما در شمارش دوم افزایش کلونی‌ها در غلظت ۵۰ نانوگرم نسبت به همه تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود که این اختلاف فقط در شمارش روز دوم مشاهده شد. که این اختلاف پس از حذف کلونی‌های کوچک از بین رفت.

بحث

کردند، این یافته با مطالعات قبلی که ثابت کردند سلول‌های اسپرماتوگونی کلونی Oct-4 را بیان کرده اند مطابقت داشت (ایزد یار و همکاران ۲۰۰۳ و اوکه و سورز ۱۹۹۳). در بررسی کلونی‌ها که در چهار گروه آزمایشی انجام شد، شمارش تعداد کلونی‌ها حاصل از سلول‌هایی که در معرض EGF قرار گرفته بودند نسبت به گروه کنترل نشان داد که تحت تأثیر این سیتوکین تعداد کلونی‌های حاصل از تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی به شکل معنی‌داری کاهش یافت هرچند که نتایج نشان می‌دهد که با گذشت زمان تعداد کلونی‌ها افزایش می‌یابد. سطح کلونی‌ها در دوزهای پایین EGF تا ۱۱ روز پس از کشت کوچکتر از سطح کلونی‌ها در گروه کنترل بود. به عبارت دیگر EGF بر میزان تقسیم سلول‌ها اثر مهاری داشت و این در حالی بود که مطالعه سطح کلونی‌ها در روز ۱۴ پس از کشت نتیجه کاملاً متفاوتی نشان داد به طوری که میانگین سطح کلونی‌های ثبت شده در روز ۱۴ بیشتر از گروه کنترل بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر تأثیر EGF بر میزان تقسیم سلول‌ها به زمان بستگی داشت. به طوری که دو اثر کاملاً متفاوت در طی ۱۴ روز کشت از خود نشان داد، کروجی و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ای که بر روی موش انجام دادند نتایج مشابهی گزارش کردند. اما در دوزهای ۲۰ و ۵۰ نانوگرم، EGF اثر محدود کننده ای در کلونیزاسیون نداشت.

فناوری جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحول بزرگی در زمینه درمان ناباروری حیوان نر محسوب می‌شود. در این پژوهش برای دستیابی به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، از گوساله چهار ماهه استفاده شد، پس از جداسازی، سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی همانطور که در نتایج گفته شد، این سلول‌ها در محیط کشت دیده شدند که با یافته‌های ایزدیار و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت داشت. بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتازی در سلول‌های سرتولی نشان داد که این سلول‌ها فاقد فعالیت آلکالین فسفاتازی هستند، این نتیجه در تأیید نتایج اسکارپینو و همکاران (۱۹۹۸) بود که نشان دادند سلول‌های سرتولی فعالیت آلکالین فسفاتازی ندارند. بررسی نشان داد که سلول‌های تشکیل‌دهنده کلونی دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز مثبت هستند که این یافته با مطالعات قبلی که ثابت کردند سلول‌های اسپرماتوگونی کلونی دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز هستند مطابقت داشت (انجام روز ۲۰۰۶، بسمر و همکاران ۱۹۹۸ و اوکه و سورز ۱۹۹۳). نتایج نشان داد که سلول‌های سرتولی گوساله دارای پروتئین ویمنتین هستند، یافته‌های این بررسی با نتایج پژوهش‌های انجام شده در این زمینه که ویمنتین را به عنوان یک نشانگر اختصاصی معرفی کرده‌اند مطابقت داشت (انوی و همکاران ۲۰۰۳ و پرامود و میترا ۲۰۱۱). نتایج نشان داد که سلول‌های کلونی در محیط کشت، Oct-4 را بیان

جدول ۱- میانگین تعداد کل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SE ±)

Table 1- The average of total spermatogonial stem cell colonies (SE±)

گروه‌های آزمایش	روز ۵ کشت	روز ۸ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت
Experiment groups	days 5	days 8	days 11	days 13
کنترل ۰ (هم کشتی با سلول سرتولی)	28±2.73 ^{ab}	52.9±11.23 ^a	124.6±18.2 ^a	355.1±17.35 ^a
Control (co-culture with sertoli cell)				
EGF 4ng/ml	35.5±5.21 ^{ac}	82.3±23.2 ^a	163.9±26.73 ^{ab}	350.2±21a
EGF 12ng/ml	18.9±2.86 ^b	57.9±5.81 ^a	136.7±13.46 ^a	380.3 ±28.62a
EGF20ng/ml	34±2.34 ^{ac}	68.7±9.43 ^a	220.8±19.84 ^b	386.7 ±25.83a
EGF 50ng/ml	42.8±3.42 ^c	158.6±20.6 ^b	220.4±19.34 ^b	339.7±28.88a

حروف لاتین غیر مشابه بیانگر در هرستون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.

Dissimilar letters show significantly different (p<0.05).

جدول ۲- میانگین سطح کلی همه کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SE±) (mm²)
Table 2: The average of all spermatogonial stem cells colonies area (SE±) (mm²)

گروه‌های آزمایش	روز ۵ کشت	روز ۸ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت
Experiment groups	days 5	days 8	days 11	days 13
کنترل (هم‌کشتی با سلول سرتولی) Control (co-culture with sertoli cell)	0.071±0.015 ^a	0.081±0.02 ^a	0.185±0.026 ^{ab}	0.61±0.1 ^a
EGF 4ng/ml	0.025±0.04 ^b	0.030±0.01 ^b	0.119±0.014 ^a	0.592±0.04 ^a
EGF 12ng/ml	0.035±0.008 ^{ab}	0.07±0.01 ^a	0.216±0.02 ^b	0.70 ±0.06 ^a
EGF20ng/ml	0.071±0.009 ^a	0.096±0.012 ^a	0.339±0.028 ^c	0.72 ±0.07 ^a
EGF 50ng/ml	0.097±0.01 ^c	0.172±0.02 ^c	0.298±0.043 ^c	0.925±0.076 ^b

حروف لاتین غیر مشابه بیانگر در هرستون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.
 Dissimilar letters show significantly different (p<0.05).

جدول ۳- تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی کلونی‌های با قطر بزرگتر از ۰/۱۱۴ میلی‌متر (SE±)
Table 3- The number of stem cell colonies with a diameter greater than 0.114 mm. (SE±)

گروه‌های آزمایش	روز ۵ کشت	روز ۸ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت
Experiment groups	days 5	days 8	days 11	days 13
کنترل (هم‌کشتی با سلول سرتولی) Control (co-culture with sertoli cell)	17.38±4.26 ^{ab}	16.5±3.19 ^a	50.88±10.1 ^a	235.38±11.78 ^{ab}
EGF 4ng/ml	5.3±1.14 ^a	6±1.11 ^b	47.6±3.59 ^a	211.2±11.77 ^a
EGF 12ng/ml	9.7±2.22 ^{ab}	14.2±2.59 ^{ab}	81.0±7.97 ^b	240.4 ±18.1 ^{ab}
EGF20ng/ml	20.9±2.17 ^{ab}	21.6±2.17 ^a	93.0±7.01 ^b	262.9 ±18.49 ^b
EGF 50ng/ml	30.1±44.14 ^b	32.4±4.92 ^c	80.6±14.57 ^b	271.4±18.82 ^b

حروف لاتین غیر مشابه بیانگر در هرستون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.
 Dissimilar letters show significantly different (p<0.05).

جدول شماره ۴- سطح کلی کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با قطر بزرگتر از ۰/۱۱۴ میلی‌متر (SE±)
Table 4- Total surface of spermatogonial stem cells colonies with a diameter greater than 0.114 mm.

گروه‌های آزمایش	روز ۵ کشت	روز ۸ کشت	روز ۱۱ کشت	روز ۱۳ کشت
Experiment groups	days 5	days 8	days 11	days 13
کنترل (هم‌کشتی با سلول سرتولی) Control (co-culture with sertoli cell)	0.055±0.017 ^a	0.056±0.0015 ^{ab}	0.111±0.0026 ^a	0.558±0.0049 ^a
EGF 4ng/ml	0.012±0.0003 ^b	0.015±0.0003 ^b	0.094±0.0008 ^a	0.509±0.00045 ^a
EGF 12ng/ml	0.028±0.0007 ^{ab}	0.065±0.0025 ^{ac}	0.144±0.002 ^{ab}	0.559 ±0.0063 ^a
EGF20ng/ml	0.062±0.0009 ^a	0.066±0.0009 ^{ac}	0.206±0.0015 ^b	0.696 ±0.0081 ^{ab}
EGF 50ng/ml	0.107±0.002 ^c	0.113±0.0017 ^c	0.207±0.004 ^b	0.852±0.0073 ^b

حروف لاتین غیر مشابه بیانگر در هرستون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.
 Dissimilar letters show significantly different (p<0.05).

بود. EGF با اثر مستقیم بر سلول‌های بنیادی ژرم باعث تحریک تقسیم آنها شد (لامب و همکاران ۱۹۹۱ و ناگانو و همکاران ۲۰۰۲). در بررسی‌ها علاوه بر کلونی‌های گرد که نشان‌دهنده خود نوسازی سلول‌های اسپرماتوگونی است، تعدادی کلونی‌های شعاعی نیز مشاهده شد. بر طبق مطالعه ایزدی‌راد در سال ۲۰۰۳ حضور کلونی‌های شعاعی شکل نشانی از شروع تمایز در کلونی‌ها

مقایسه بین دوزهای ۴، ۱۲ و ۲۰ نانوگرم EGF نشان داد که اختلاف قابل توجهی بین آنها از نظر میزان تأثیرشان بر میانگین سطح کلونی‌ها وجود ندارد، ولی از آنجایی که در دوز ۵۰ ng/ml در همه روزهای شمارش افزایش در مقدار کلی سطح کلونی‌ها مشاهده شد اما در تعداد کلونی‌ها افزایش معنی‌داری مشاهده نشد در نتیجه قطر کلونی‌ها در غلظت ۵۰ ng/ml بالاتر از بقیه تیمارها

می‌کند. وجود سلول‌های ژرم تمایز یافته در کلونی‌های محیط کشت داری EGF، اثبات می‌کند که EGF نه تنها با اثر مستقیم خود قطر کلونی‌ها را افزایش می‌دهد بلکه به شکل غیر مستقیم از طریق اثر بر لایه سلول‌های سرتولی تمایز را در سلول‌های تشکیل‌دهنده کلونی نیز القاء می‌کند. یافته‌های به دست آمده گزارش‌های اورت و همکاران را تایید می‌کند (ارت و همکاران ۲۰۰۰، انجام روز و همکاران ۲۰۰۶)، که نشان می‌دهد اکثر فاکتورهای رشد دارای اثرات طبیعی و حتی کاهشدهنده تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است.

انجماد سلول‌ها

در آزمایش حاضر سلول‌های ژرم حاصل از جداسازی نهایی پس از فرآیند انجماد - ذوب به میزان بالایی زنده ماندند و در محیط آزمایشگاه کلونی‌زایی نمودند. این یافته با مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت دارد (ایزد یار و همکاران ۲۰۰۲، کروجی و همکاران ۲۰۰۶).

در نهایت می‌توان ذکر کرد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ تازه و منجمد - ذوب شده، در محیط کشت قادر به کلونی‌زایی و تکثیر هستند. فاکتور رشد EGF تأثیر بالایی بر کلونی‌زایی بنیادی اسپرماتوگونی بالغ تازه ندارد ولی در بین آنها غلظت ۵۰ نانوگرم مناسب‌تر از دیگر غلظت‌هاست. دو هفته هم‌کشتی سلول اسپرماتوگونی با سلول سرتولی، برای کشت این سلول‌ها کافی و مناسب است.

می‌باشد. کلونی‌هایی که در محیط کشت از تقسیم سلول‌های بنیادی ژرم حاصل شده بود از نظر اندازه بسیار متنوع بودند. این موضوع حاکی از آن است که این سلول‌ها یا به شکل همزمان وارد فرایند کلونیزاسیون نمی‌شوند و یا اینکه ظرفیت آنها از نظر سرعت و تعداد تقسیمات متفاوت است. برینستر و همکاران (۱۹۹۸) ثابت کردند که سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A یک مجموعه ناهمگون از سلول‌ها است که درصد بسیار کمی از آنها ظرفیت خودسازی دارند و تشکیل کلونی می‌دهند و بخش عمده این سلول‌ها به خاطر نداشتن قابلیت خودسازی مسیر تمایز را انتخاب می‌کنند (برینستر و همکاران ۱۹۹۸). هر چند که وجود مسیر سومی که در آن سلول‌ها ضمن تقسیم متمایز می‌شوند، قابل انکار نیست. لذا وجود سلول‌های ژرم تمایز یافته در کلونی‌ها قابل توجیه است. تعداد کلونی‌ها در ۲ گروه EGF به شکل معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود بنابراین انتخاب مسیر تمایز توسط بعضی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قابل قبول است زیرا سلول ژرم تمایز یافته نمی‌تواند در محیط کشت کلونی ایجاد کند. پس از گذشت ۱۱ روز از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی، قطر کلونی‌ها تحت تأثیر EGF به شکل قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. تصور می‌شود که علت این افزایش قطر که به دنبال تقسیم سلول‌ها در کلونی می‌باشد، تحت تأثیر خاصیت القاء تقسیم توسط EGF است. EGF به دو شکل مختلف عمل می‌کند، یا به شکل مستقیم از طریق اثر بر سلول‌های ژرم (راداکریشنا و همکاران ۱۹۹۲) و یا به شکل غیرمستقیم از طریق اثر بر سلول‌های سرتولی (اکمل و همکاران ۱۹۹۷). در مسیر مستقیم سلول‌های بنیادی ژرم را تحریک به تقسیم می‌کند (راداکریشنا و همکاران ۱۹۹۲). بنابراین افزایش قطر کلونی در انتهای هفته دوم قابل انتظار است. تعداد پایین کلونی‌ها در مقایسه با گروه کنترل ممکن است به خاطر مسیر غیرمستقیمی باشد که EGF انتخاب

منابع مورد استفاده

- Akmal KM, Dufour JM and Kim KH, 1997. Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids. *Biology of Reproduction* 56:549-556.
- Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T and Mowla SJ, 2006. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 18: 709-720.
- Anway MD, Folmer J, Wright WW and Zirkin BR, 2003. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function. *Biol Reprod* 68(3): 996-1002.
- Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG and van Pelt AM, 2005. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 113: 727-742.
- Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ and de Rooij DG, 2006. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology* 65: 1828-1847.
- Aponte PM and de Rooij DG, 2008. Biomanipulation of Bovine Spermatogonial Stem Cells. *Anim Reprod* 5: 16-22.
- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A and Gyssler C, 1993. Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Development Suppl* 118: 125-137.
- Brinster RL and Nagano M, 1998. Spermatogonial stem cell transplantation cryopreservation and culture. *Semin Cell Dev Biol* 9: 401-409.
- Caires K, Broady J and McLean D, 2010. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol* 205(2):133-45.
- Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM and de Rooij DG, 2002. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction* 124: 791-799.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D and Wreford N, 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod* 13 Suppl 1:1-8.
- Goossens E, Frederickx V, De Block G, Van Steirteghem AC and Tournaye H, 2003. Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model. *Hum Reprod* 18(9): 1874-80.
- Herrid M, Davey RJ, and Hill JR, 2007. Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation. *Cell Tissue Res* 330(2): 321-9.
- Izadyar F, Matthijs-Rijssenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H and de Rooij DG, 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonial. *J Androl* 23: 537-45.
- Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M and De Rooij DG, 2003. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 68: 272-281.
- Jeong D, McLean DJ, and Griswold MD, 2003. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl* 24: 661-669.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S and Shinohara T, 2003a. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 69: 612-616.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S and Shinohara T, 2003b. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod* 18: 2660-2667.
- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A and Shinohara T, 2005a. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 72: 985-991.

- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takeshahi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A and Shinohara T, 2005b. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development* 132: 4155-4163.
- Koruji M, 2007. Autograft of fresh and freezed spermatogonial cells of adult mouse after coculture with sertoli cells and treatment with GDNF, SCF and GM-CSF cytokines to the azoospermic mice with Gamma-Ray, Presented for the Ph.D., Tehran. Tarbiat Modares University.
- Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H and Arfaee AJ, 2009. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45: 281-289.
- Kubota H, Avarbock MR and Brinster RL, 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16489-16494.
- Lamb DJ, Spotts GS, Shubhada S and Baker KR, 1991. Partial characterization of a unique mitogenic activity secreted by rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 79(1-3):1-12.
- Liu S, Tang Z, Xiong T and Tang W, 2011. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 9:141.
- Nagano M, Patrizio P and Brinster RL, 2002. Long-term survival of human Spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril* 78: 1225-1233.
- Ning L, Goossens E, Geens M, Saen DV and Tournaye H, 2012. Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. *Mid East Fertil Soc J* 17:1-7.
- Oatley JM and Brinster RL, 2006. Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol* 419: 259-82.
- Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR and Brinster RL, 1999. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Bioi Reprod* 60(2): 515-21.
- OkeBO, Suarez-Qui and CA, 1993. Localization of secretory, membrane-associated and cytoskeletal proteins in rat testis using an improved immunocytochemical protocol that employs polyester wax. *Bioi Reprod* 48: 621-631.
- Orth JM, Jester WF, Li LH and Laslett AL, 2000. Gonocyte-Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Cuff Top Dev BioI* 50:103-24. Review.
- Phillips BT, Gassei K and Orwig KE, 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1546): 1663-78.
- Pramod RK and Mitra A, 2014. In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (*Capra hircus*). *J Assist Reprod Genet* 31(8):993-1001
- Radford J, Shalet S and Lieberman B, 1999. Fertility after treatment for cancer. Questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. *BMJ* 319: 935-6.
- Radhakrishnan B, Oke BO, Papadopoulos. V, DiAugustine RP and Suarez-Quian CA, 1992. Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. *Endocrinology* 131(6):3091-9.
- Russell LD, 1993. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell interactions In: Russell LD, Griswold MD (eds). *The Sertoli Cell*, Clearwater FL, Cache River Press: 365-390.
- Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Froyso B, Soder O and Boitani CA, 1998. Rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Mol Cell Endocrinol* 146:121-127.
- Tegelenbosch RA and de Rooij DG, 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stemcell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 290: 193-200.
- Toumaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goossens A, Silber JS, Steirteghem VA and Devroey P, 1996. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 11: 127-132.
- Van Pelt AMM, van Dissel-Emiliani FM, Gaemers I, van der Burg M, Tanke HJ and de Rooij DG, 1995. Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biology of Reproduction* 53: 570-578.

Isolation and maintenance of calves type A spermatogonia in vitro: in influence of epidermal growth factor on number of cells, colony size and spermetogoa viability

M Torkzaban¹, Gh Moghaddam^{2*}, P Tajik³ and A Barin³

Received: November 30, 2015

Accepted: June 20, 2017

¹Gratuated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding author: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

Introduction: Mammalian spermatogenesis is a complex process of germ cell development within the seminiferous tubules, including the mitotic phase in which type-A spermatogonial stem cells renew themselves. The process of spermatogenesis is regulated not only by gonadotropins, i.e. FSH and LH, but also by the interactions between spermatogenic cells and somatic Sertoli cells (Skinner 1991 and Griswold 1995). Culture systems for recapitulating spermatogenesis in vitro enable us to identify and characterize the factors or genes involved in germ cell proliferation, meiosis and spermatogenesis. In mice, undifferentiated germ cell lines have been established by immortalizing the germ cells with the simian virus 40 large tumor antigens, or with telomerase catalytic component (Fenget al.2002), Type A spermatogonia include a very small number of SSCs and their more numerous differentiating daughter cells. Initial attempts to isolate SSCs started with the isolation of type A spermatogonia and SSC purification. Type A spermatogonia can be obtained in large numbers from young prepubertal bulls, and it is important to note that there are breed differences. Type A spermatogonia isolation can be achieved through mechanical dissociation and enzymatic digestion of the testicular tissue followed by two purification steps, with a final typical bovine type A spermatogonia suspension of 70%. An evaluation for SSC activity using a transplantation assay adapted for bovine SSCs is described. Bovine Type A spermatogonia can be maintained in vitro for short periods (7 to 15 days) with simple culture conditions. However, expansion of SSC can only be achieved under certain conditions such as specially supplemented medium, specific growth factors, and serial sub-culturing for longer periods of time. After expansion, bovine spermatogonia can be cryopreserved while retaining the ability to proliferate and survive (.Aponte&de Rooij 2008). Bovine culture systems require some form of feeder layer to support the germ cells. Autogenous Sertoli cells (Aponte et al. 2006) or embryonic fibroblasts (Oatley etal. 2004) have been used.

Material and methods: Initially, sertoli cells and SSCs were isolated from 3–7-month-old calvesand, and The minced pieces of testis were suspendedin DMEM, which contained 0.5 mgmL⁻¹ collagenase/dispace, 0.5 mgmL⁻¹ trypsin and 0.08 mgmL⁻¹ DNase, for 60 min (with shaking) at 37°C.). After three washes in DMEM medium and removal of most of the interstitial cells, a second digestion step (45 min at 32°C) was performed in DMEM by adding fresh enzymes to the seminiferous cord fragments. Separated from the remaining tubule fragments by centrifugation at 30g for 2 min at 37°C. After filtration through a 70-µm nylon filter, the medium was aspirated, the cells were washed twice and fresh medium was added. Coated plastic dishes were prepared by incubation with a solution of 5µgmL⁻¹ of datura stramonium agglutinin in phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C for 60 min, followed by extensive washing with PBS, supplemented with 0.5% bovine serum albumin The Sertoli cells were isolated using a procedure described by Scarpinoet al. (1998.) with some modifications. The mixed population of the cells obtained by

enzymatic digestion was placed on lectin-coated dishes at a concentration of 1.5×10^5 cells cm^{-2} and incubated for 1 h at 32°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air. After the incubation, the non-adhering cells were collected by being washed twice with medium. After the incubation, the Non-adhering cells were collected by being washed twice with medium. Alternatively, 48 h after being plated on the lectin-coated dishes, the Sertoli cells were detached by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)–trypsin treatment (0.02% EDTA–0.1% trypsin in Ca^{2+} - and Mg-free PBS) for 5 min at 37°C , counted and adjusted to desired densities into each well of a 24-well multidish for secondary culture in DMEM at 32°C in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco). This method helped isolate the Sertoli cells with more than 95% purity. After the Sertoli cells had been isolated by DSA lectin, the spermatogonia that remained in suspension were collected and kept at 32°C in a humidified atmosphere and the presence of 10% FBS. More than 95% of the cells were spermatogonial cells. The number of the Sertoli and spermatogonial cells was determined with a hemocytometer. Cell viability was evaluated by means of the dye exclusion test (0.04% trypan blue solution). Two days after the above-mentioned procedure, the Sertoli cells formed a confluent layer, and spermatogonial cells were co-cultured on top of them. Highly purified human FSH and) were added to spermatogonial cell (EGF supplementation: three groups received 4, 12, 20 and 50 ngmL^{-1} of fresh EGF every 3 days for 2 weeks). The diameters and the number of colonies were determined every 3 days after the appearance of the colonies for 2 weeks. An inverted microscope (Zeiss, Germany) was used to determine the number of the colonies, their diameters being measured by ocular grid. The nature of cells in addition to the morphology and the activity of alkaline phosphatase were confirmed through specific markers Oct-4 and vimentin in colonies and Sertoli cells. In the last stage these cells were frozen-melted in the in vitro environment until the purity and strength of biological stem cell is evaluated.

Results and discussion: The number and diameter of colonies increased more rapidly in the sertoli coculture, that it agreed with results of Anjamrooz et al., 2006 and Mohamamadi 2010. The numbers of colonies in the EGF-supplemented groups were not significantly different with the control group ($P < 0.05$) (table 1-3), that they were Similar to results of Anjamrooz et al.2006 .The diameters of the colonies in the EGF-treated, in4, 12, 20 ngmL^{-1} , had not significantly different with the control group ($P < 0.05$) but in 50 ngmL^{-1} increased the diameters of the colonies slightly ($P < 0.05$) that were Similar to results of Anjamrooz et al.2006 and Koruji et al.2009. In the EGF-treated groups, two pathways seem to have affected the spermatogonial cells. In these groups, the number of the colonies was lower than that of the control group.

Conclusion: The results of this study show that spermatogonial stem cells can be separated with high purity from the testicles of calves and also the mutual relationship between spermatogonial stem cells and Sertoli cells and some growth factors can be used to initiate, maintaining the process of spermatogenesis and the enrichment of stem cells during the culture and increasing the purity and viability of them during solidification.

Keywords: Stem cells, Spermatogony, Colonization, Co-culture, EGF