

A Comparison between the Colony Formation of Adult Mouse Spermatogonial Stem Cells in Co cultures with Sertoli and STO (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line)

Syede Momeneh Mohamamadi, M.Sc.¹, Mansoureh Movahedin, Ph.D.^{1*},
Seyed Morteza Koruji, Ph.D.²

1. Anatomical Sciences Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Anatomical Sciences Department, School of Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Anatomical Scienc Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: mansoureh@modares.ac.ir

Received: 28/Jul/2009, Accepted: 2/Jan/2010

Abstract

Objective: The aim of this study was to compare the colony formation of spermatogonial stem cells (SSCs) on sertoli and STO (Mouse embryonic fibroblast cell line) feeder cell layers during a two-week period.

Materials and Methods: Initially, sertoli cells and SSCs were isolated from adult mouse testes using a two-step enzymatic digestion and lectin immobilization. Characteristics of the isolated cells were immunocytochemically confirmed by examining for the presence of Oct-4, CDH1, promyelocytic leukaemia zinc finger factor (PLZF), SSC C-kit, and the distribution of Sertoli cell vimentin. SSCs were then cultured above the Sertoli, STO and the control (without co-culture) separately for two weeks. In all three groups, the number and diameter of colonies were evaluated using an invert microscope on the 3rd, 7th, 10th and 14th day. β_1 and α_6 -integrin m-RNA expressions were assessed using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR. Furthermore, Oct-4 m RNA expression was assessed using real time PCR. Statistical analysis was performed using ANOVA; and the paired two-sample t test and Tukey's test were used as post-hoc tests for the data analysis of the three sertoli, STO and control cocultures.

Results: At the four specified time points, our results showed significant differences ($p < 0.05$) in colony numbers and diameters among the sertoli, STO and control groups. The number and diameter of colonies increased more rapidly in the sertoli coculture than in the other two. Our results at all four time points also showed significant differences ($p < 0.05$) in the mean colony numbers and diameters between the three groups, with the Sertoli coculture having the highest mean values for colony numbers and diameters. The RT-PCR results, after two-weeks of culturing, showed that β_1 -integrin was expressed in all three groups cocultures, but α_6 -integrin was not expressed. Additionally, based on real time PCR results, the three genes (β_1 -integrin, α_6 -integrin, Oct-4) mentioned were also expressed in all three cocultures groups.

Conclusion: Based on the optimal effects of sertoli feeder cells on spermatogonial stem cells in a co culture system, as also confirmed by several other studies, their use is suggested to achieve better colonization of SSCs.

Keywords: Adult Spermatogonial Stem Cells, Colony Formation, Co Culture, Mouse

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 231-240

مقایسه کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و فیبروبلاست موشی (STO)

سیده مومنه محمدی ^۱M.Sc.، منصوره موحدین ^۲Ph.D.، سیدمرتضی کروجی ^۳Ph.D.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Email: mansoure@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۴/۷، پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۱۴

چکیده

* **هدف:** مقایسه میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بین دو روش هم‌کشتی با لایه‌های تغذیه‌کننده سرتولی و سلول‌های رده فیبروبلاست موشی، در طول دو هفته کشت

* **مواد و روش‌ها:** ابتدا سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه موش بالغ با استفاده از دو مرحله هضم آنزیمی جدا شدند. ماهیت سلول‌های سرتولی توسط ویمنتین و سلول‌های اسپرماتوگونی توسط نشان‌گرهای Oct-4، CDH1 (Cancer-1، Promyelocytic Leukemia Zinc-Finger (PLZF) و C-kit تایید شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی لایه‌های تغذیه‌کننده سرتولی و STO (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line) به مدت دو هفته کشت داده شد و یک گروه کنترل بدون هم‌کشتی در نظر گرفته شد. تعداد و قطر کلونی‌ها توسط میکروسکوپ معکوس در روزهای سوم، هفتم، دهم و چهاردهم به‌ازای سه تکرار، اندازه‌گیری شد. همچنین بیان ژن‌های اینترگرین β_1 و اینترگرین α_6 توسط تکنیک‌های Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) و Real Time PCR و ژن Oct-4 توسط Real Time PCR ارزیابی شد. تحلیل آماری در قالب تحلیل واریانس و آزمون‌های تعقیبی t زوجی و توکی برای مقایسه سه گروه سلول‌های سرتولی، STO و کنترل انجام شد.

* **یافته‌ها:** در هر یک از روزهای مورد بررسی، بین سه گروه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$) و تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که در هر یک از گروه‌های هم‌کشتی با سلول سرتولی، هم‌کشتی با STO و کنترل، در تعداد و قطر کلونی‌ها، بین چهار نقطه زمانی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$)، اما تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه هم‌کشتی با سلول سرتولی نسبت به دو گروه دیگر افزایش بیشتری داشت ($p < 0.05$). نتایج به‌دست آمده RT-PCR نشان داد که بعد از دو هفته کشت، ژن اینترگرین β_1 در هر سه گروه بیان شد و در حالی که ژن اینترگرین α_6 بیان نشده. همچنین بر اساس نتایج Real Time PCR نیز سه ژن ذکر شده بیان شدند.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به اثر بهینه‌ای که سلول‌های سرتولی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با این سلول‌ها فراهم می‌کند - که این موضوع توسط سایر مطالعات نیز تایید شده است - استفاده از سلول‌های سرتولی برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیشنهاد می‌شود.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ، کلونی‌زایی، هم‌کشتی، موش

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۴۰-۲۳۱

مقدمه

اسپرم‌زایی فرایندی است که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells; SSCs) پس از انجام تقسیمات میتوزی و میوزی منظم به اسپرماتوزای بالغ تبدیل می‌شود (۱). در پستانداران، روزانه میلیون‌ها اسپرماتوزا از سلول‌های بنیادی یا اسپرماتوگونی در بیضه تولید می‌شوند (۲). در هر بیضه انسان، 10^8 سلول وجود دارد که از این تعداد، 2×10^4 سلول از نوع سلول‌های بنیادی می‌باشند (۳).

غنی‌سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت امر مهمی است و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی، منبع با ارزشی از سلول‌های ژرم را فراهم می‌آورد که می‌توانند در مواردی مثل انجماد، پیوند سلول‌های ژرم جهت درمان ناباروری، دست‌کاری ژنتیکی، ترانسفکت ژنی سلول‌ها و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه، از اهمیت خاصی برخوردار باشند. در حالت عادی، کشت سلول‌های ژرم بنیادی اسپرماتوگونی

مردانه به دلایل مختلفی از جمله تعداد کم آنها، مشکل است و کاهش قابل توجهی نیز در بقای سلول‌های کشت داده شده طی هفته اول ایجاد می‌شود (۴). طی چند سال اخیر مطالعات زیادی نگهداری و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی را در محیط کشت گزارش کرده‌اند که اکثر آنها در مورد هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با یک لایه تغذیه‌کننده هم‌عقیده بودند (۵، ۶). تا به حال روش‌های مختلفی برای هم‌کشتی ارائه شده است؛ برخی از محققین علاوه بر یک لایه تغذیه‌کننده از فاکتورهای رشد برای حمایت سلول‌های مورد کشت استفاده نموده‌اند (۷). البته باید در نظر داشت در محیط کشتی که فاقد سرم و لایه تغذیه‌کننده باشد، سلول‌های اسپرماتوگونی نمی‌توانند بیش از یک هفته زنده بمانند (۸).

سلول‌های سرتولی، تنها سلول‌های سوماتیک هستند که ارتباط تنگاتنگ و مستقیم با سلول‌های ژرم دارند و فاکتورهایی را ترشح می‌کنند که برای زنده ماندن و تکثیر سلول‌های ژرم ضروری هستند. به عنوان مثال Stem Cell Factor (SCF) (۸)، اکتیوین (Activin)،

در این روش تعلیق سلولی به پتری دیش‌های پوشیده از ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از لکتین داجورا استرامونیوم آگلوتینین در بافر فسفات منتقل و به مدت یک ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂، انکوبه شد. سلول‌های آزاد در تعلیق بعد از انکوباسیون جهت جمع‌آوری شدند. سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش سلول‌های سرتولی بودند (۱۲).

برای جدا کردن سلول‌های اسپرماتوسیت از تعلیق سلولی فوق، از روش ون پلت (Van Pelt)، استفاده شد (۱۳). در این روش تعلیق سلولی پس از جداسازی سلول‌های سرتولی به پتری دیش‌های پوشیده از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از PNA در بافر فسفات منتقل و به مدت یک ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO₂، انکوبه شد. سلول‌های چسبیده به کف پتری دیش سلول‌های اسپرماتوسیت بودند. بعد از جدا کردن سلول‌های سرتولی و اسپرماتوسیت، سلول‌های اسپرماتوگونی که در تعلیق شناور بودند به همراه محیط جمع‌آوری شده و پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور (معادل ۲۲۰۰ RPM) شست‌وشو شد.

هم‌کشتی سلول‌های سرتولی، STO و کنترل با سلول‌های اسپرماتوگونی

یک هفته بعد از کشت، سلول‌های سرتولی کف پتری دیش توسط سلول‌ها پر شده و برای هم‌کشتی با سلول‌های اسپرماتوگونی و به عنوان لایه تغذیه‌کننده مناسب شدند. تعلیق سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی روی این لایه تغذیه‌کننده در حضور محیط DMEM دارای ۱۰ درصد سرم در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته کشت شدند. از مرکز تحقیقاتی پاستور، رده (Line) سلول‌های STO تهیه و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شد. زمانی که Confluency آنها به حد قابل قبول رسید، به عنوان لایه تغذیه‌کننده مورد استفاده قرار گرفتند. پس از شکل‌گیری لایه‌ی تغذیه‌کننده سلول‌های STO، به مدت ۲ تا ۳ ساعت در حضور DMEM حاوی Mytomyocin C (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند تا سلول‌های STO غیرفعال شوند. سپس سلول‌ها چند بار با PBS شست‌وشو داده شدند. پس از غیرفعال شدن سلول‌های STO با Mytomyocin C تعلیق سلولی حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی روی این لایه تغذیه‌کننده در حضور محیط DMEM دارای ۱۰ درصد سرم در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته کشت داده شدند. تعلیق حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم و بدون هیچ لایه تغذیه‌کننده، به عنوان گروه کنترل کشت داده شدند. برای هر یک از گروه‌ها و مقاطع زمانی مورد بررسی آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد.

ارزیابی کلونی‌زایی در سلول‌های اسپرماتوگونی

کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در طول دو هفته کشت و در هر سه گروه مورد مطالعه، در روزهای ۳، ۷، ۱۰ و ۱۴ از نظر تعداد و قطر کلونی‌ها با میکروسکوپ معکوس (Zeiss, Germany, Invert-Phase Microscope) مجهز به عدسی چشمی مدرج ارزیابی شدند.

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی با آزمون‌های ایمنو‌هیستوشیمی

ماهیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی با تعیین نشانگر اختصاصی ویمنتین (Vimentin) برای سلول‌های سرتولی و نشانگر

فاکتور رشد شبه انسولین-۱ (Insulin Like Growth Factor-1)، فاکتور رشد تبدیل‌کننده Beta، فاکتور رشد تبدیل‌کننده Alpha (۹) و Lukemia Inhibitory Factor (LIF) از جمله فاکتورهایی هستند که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شوند. بنابراین برای نگهداری و کشت سلول‌های ژرم در محیط کشت به صورت دراز مدت، وجود سلول‌های سرتولی ضروری به نظر می‌رسد (۱۰). با توجه به مطالعات مختلف مبنی بر سودمند بودن لایه‌ی تغذیه‌کننده در کشت سلول‌های ژرم، هدف از انجام این پروژه، مقایسه میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش پس از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و سلول‌های رده فیبروبلاست موشی (Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line; STO) است.

مواد و روش‌ها حیوانات آزمایشگاهی

در پژوهش حاضر از موش‌های بالغ ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. موش‌های بالغ (نژاد NMRI) از موسسه رازی کرج خریداری و در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نگهداری شدند. این پژوهش بر اساس مصوبه اخلاق دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

برای هر بار جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی جهت کشت، بیضه‌های ۶ سر موش خارج شدند. کپسول بیضه‌ها بعد از شست‌وشو با Phosphate Buffer Serum (PBS) جدا گردید و سپس به محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی آنزیم (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز-دیسپاز، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپسین ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دناز) جهت هضم آنزیمی مرحله اول منتقل گردیدند. در این مرحله، بیضه‌های بدون کپسول در محیط کشت حاوی آنزیم‌های هضم آنزیمی به طور مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در طی این مدت، هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی توسط سمپلر و به مدت ۱ دقیقه تکان داده می‌شدند. 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 ۳۰۰ دور (معادل ۱۲۰۰ RPM) سانتریفیوژ شدند (۴-۳ بار). بعد از هر بار سانتریفیوژ 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 (۱۱). در این مرحله، لوله‌ها در محیطی مشابه مرحله اول به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس تعلیق فوق جهت جداسازی قطعات هضم نشده با سرعت ۳۰ دور (معادل ۴۰۰ RPM) سانتریفیوژ شد. قطعات هضم نشده لوله‌های منی‌ساز در ته لوله رسوب کرده و سلول‌های جدا شده و برخی از تجمع‌ها سلولی، در بالای تعلیق قرار گرفتند. به طور عمده تعلیق حاصل حاوی سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی اسپرماتوسیت و اسپرماتید و تعداد کمی سلول‌های بافت بینابینی بود.

از روش اسکارپینو (Scarpino)، برای جدا کردن سلول‌های سرتولی از تعلیق سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی استفاده شد.

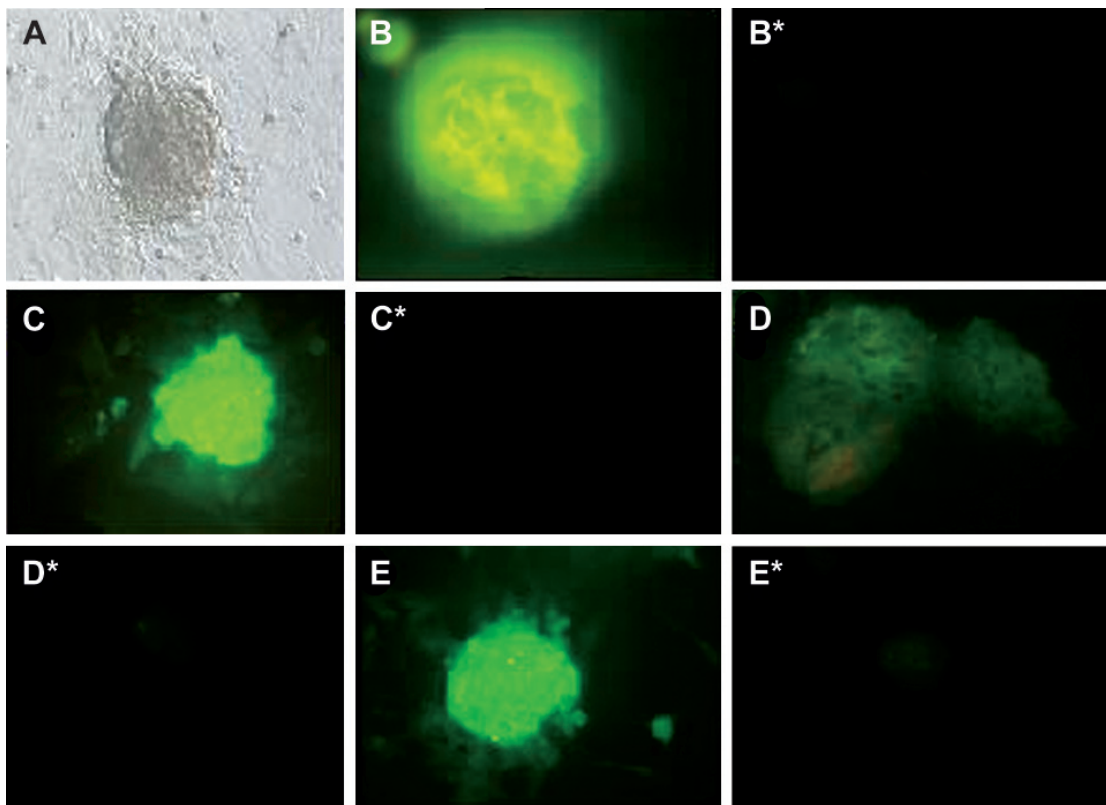
بررسی بیان ژن‌های $\alpha 6$ Integrin، $\beta 1$ Integrin و OCT-4 به روش Real-Time PCR

برای تعیین میزان بیان ژن‌های $\alpha 6$ Integrin، $\beta 1$ Integrin و OCT-4 در گروه‌های مورد مطالعه از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. همه مراحل RT-PCR مانند SYBR Green هم استفاده می‌شود. برای هر گروه ژن رفرنس GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) و ژن هدف یکسانی در نظر گرفته شد. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $2^{-CT\Delta\Delta}$ محاسبه گردید.

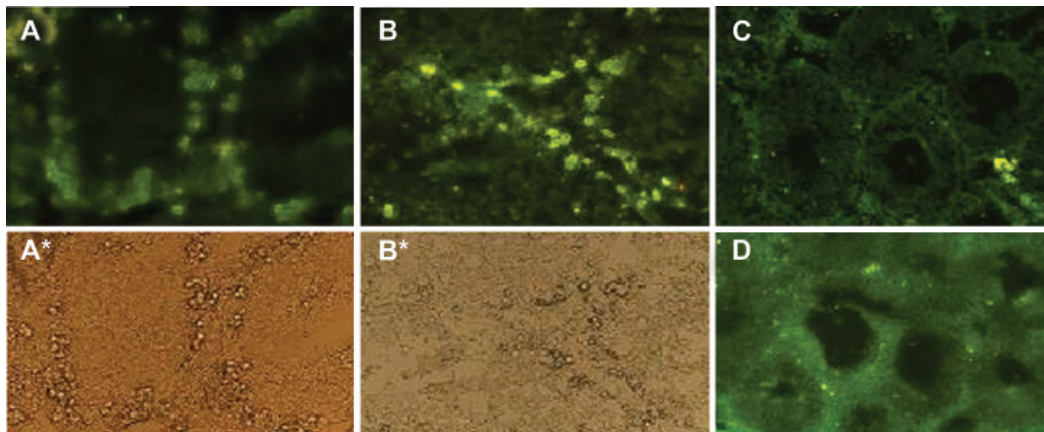
مقایسه میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها در روزها و گروه‌های مختلف به ترتیب، تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری، تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون‌های زوجی و با تعدیل بونفرونی و توکی، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. همچنین بر اساس یک مطالعه مقدماتی با سه تکرار روی قطر و تعداد کلونی‌ها، اطلاعات اولیه شامل انحراف معیار ادغام شده سه گروه و اختلاف میانگین بین گروه‌ها به دست آمد، سپس با در نظر گرفتن سطح خطای ۰/۰۵ و مقدار اسمی ۰/۸ برای توان آزمون، حجم نمونه به ازای هر یک از دو کمیت با استفاده از نرم‌افزار Minitab 15 برابر ۳ به دست آمد که در این حالت توان واقعی آزمون‌ها به تقریب برابر ۰/۹ شد (۱۴).

یافته‌ها

جداسازی و تایید ماهیت سلول‌های اسپرمانوگونی و سرتولی
سلول‌های بنیادی اسپرمانوگونی در گروه‌های مختلف ایجاد کلونی نمودند که این سلول‌ها به نسبت گرد و حدود سلولی آنها در، کلونی قابل تشخیص بود (شکل ۲A). شکل‌های B و 1A مربوط به سلول‌های سرتولی و STO می‌باشند که کف پتری دیش را به طور کامل پر نموده بودند. نشانگر اختصاصی ویمنتین در سیتوپلاسم اطراف هسته سلول‌های سرتولی بیان تثبیت شد (شکل 1C). نتایج حاصل از بررسی شناسایی سلول‌های اسپرمانوگونی جداسازی شده، توسط نشان‌گرهای اختصاصی $\alpha 6$ ، $\beta 1$ ، $\beta 3$ ، $\beta 4$ ، $\beta 5$ ، $\beta 6$ ، $\beta 7$ ، $\beta 8$ ، $\beta 9$ ، $\beta 10$ ، $\beta 11$ ، $\beta 12$ ، $\beta 13$ ، $\beta 14$ ، $\beta 15$ ، $\beta 16$ ، $\beta 17$ ، $\beta 18$ ، $\beta 19$ ، $\beta 20$ ، $\beta 21$ ، $\beta 22$ ، $\beta 23$ ، $\beta 24$ ، $\beta 25$ ، $\beta 26$ ، $\beta 27$ ، $\beta 28$ ، $\beta 29$ ، $\beta 30$ ، $\beta 31$ ، $\beta 32$ ، $\beta 33$ ، $\beta 34$ ، $\beta 35$ ، $\beta 36$ ، $\beta 37$ ، $\beta 38$ ، $\beta 39$ ، $\beta 40$ ، $\beta 41$ ، $\beta 42$ ، $\beta 43$ ، $\beta 44$ ، $\beta 45$ ، $\beta 46$ ، $\beta 47$ ، $\beta 48$ ، $\beta 49$ ، $\beta 50$ ، $\beta 51$ ، $\beta 52$ ، $\beta 53$ ، $\beta 54$ ، $\beta 55$ ، $\beta 56$ ، $\beta 57$ ، $\beta 58$ ، $\beta 59$ ، $\beta 60$ ، $\beta 61$ ، $\beta 62$ ، $\beta 63$ ، $\beta 64$ ، $\beta 65$ ، $\beta 66$ ، $\beta 67$ ، $\beta 68$ ، $\beta 69$ ، $\beta 70$ ، $\beta 71$ ، $\beta 72$ ، $\beta 73$ ، $\beta 74$ ، $\beta 75$ ، $\beta 76$ ، $\beta 77$ ، $\beta 78$ ، $\beta 79$ ، $\beta 80$ ، $\beta 81$ ، $\beta 82$ ، $\beta 83$ ، $\beta 84$ ، $\beta 85$ ، $\beta 86$ ، $\beta 87$ ، $\beta 88$ ، $\beta 89$ ، $\beta 90$ ، $\beta 91$ ، $\beta 92$ ، $\beta 93$ ، $\beta 94$ ، $\beta 95$ ، $\beta 96$ ، $\beta 97$ ، $\beta 98$ ، $\beta 99$ ، $\beta 100$ ، $\beta 101$ ، $\beta 102$ ، $\beta 103$ ، $\beta 104$ ، $\beta 105$ ، $\beta 106$ ، $\beta 107$ ، $\beta 108$ ، $\beta 109$ ، $\beta 110$ ، $\beta 111$ ، $\beta 112$ ، $\beta 113$ ، $\beta 114$ ، $\beta 115$ ، $\beta 116$ ، $\beta 117$ ، $\beta 118$ ، $\beta 119$ ، $\beta 120$ ، $\beta 121$ ، $\beta 122$ ، $\beta 123$ ، $\beta 124$ ، $\beta 125$ ، $\beta 126$ ، $\beta 127$ ، $\beta 128$ ، $\beta 129$ ، $\beta 130$ ، $\beta 131$ ، $\beta 132$ ، $\beta 133$ ، $\beta 134$ ، $\beta 135$ ، $\beta 136$ ، $\beta 137$ ، $\beta 138$ ، $\beta 139$ ، $\beta 140$ ، $\beta 141$ ، $\beta 142$ ، $\beta 143$ ، $\beta 144$ ، $\beta 145$ ، $\beta 146$ ، $\beta 147$ ، $\beta 148$ ، $\beta 149$ ، $\beta 150$ ، $\beta 151$ ، $\beta 152$ ، $\beta 153$ ، $\beta 154$ ، $\beta 155$ ، $\beta 156$ ، $\beta 157$ ، $\beta 158$ ، $\beta 159$ ، $\beta 160$ ، $\beta 161$ ، $\beta 162$ ، $\beta 163$ ، $\beta 164$ ، $\beta 165$ ، $\beta 166$ ، $\beta 167$ ، $\beta 168$ ، $\beta 169$ ، $\beta 170$ ، $\beta 171$ ، $\beta 172$ ، $\beta 173$ ، $\beta 174$ ، $\beta 175$ ، $\beta 176$ ، $\beta 177$ ، $\beta 178$ ، $\beta 179$ ، $\beta 180$ ، $\beta 181$ ، $\beta 182$ ، $\beta 183$ ، $\beta 184$ ، $\beta 185$ ، $\beta 186$ ، $\beta 187$ ، $\beta 188$ ، $\beta 189$ ، $\beta 190$ ، $\beta 191$ ، $\beta 192$ ، $\beta 193$ ، $\beta 194$ ، $\beta 195$ ، $\beta 196$ ، $\beta 197$ ، $\beta 198$ ، $\beta 199$ ، $\beta 200$ ، $\beta 201$ ، $\beta 202$ ، $\beta 203$ ، $\beta 204$ ، $\beta 205$ ، $\beta 206$ ، $\beta 207$ ، $\beta 208$ ، $\beta 209$ ، $\beta 210$ ، $\beta 211$ ، $\beta 212$ ، $\beta 213$ ، $\beta 214$ ، $\beta 215$ ، $\beta 216$ ، $\beta 217$ ، $\beta 218$ ، $\beta 219$ ، $\beta 220$ ، $\beta 221$ ، $\beta 222$ ، $\beta 223$ ، $\beta 224$ ، $\beta 225$ ، $\beta 226$ ، $\beta 227$ ، $\beta 228$ ، $\beta 229$ ، $\beta 230$ ، $\beta 231$ ، $\beta 232$ ، $\beta 233$ ، $\beta 234$ ، $\beta 235$ ، $\beta 236$ ، $\beta 237$ ، $\beta 238$ ، $\beta 239$ ، $\beta 240$ ، $\beta 241$ ، $\beta 242$ ، $\beta 243$ ، $\beta 244$ ، $\beta 245$ ، $\beta 246$ ، $\beta 247$ ، $\beta 248$ ، $\beta 249$ ، $\beta 250$ ، $\beta 251$ ، $\beta 252$ ، $\beta 253$ ، $\beta 254$ ، $\beta 255$ ، $\beta 256$ ، $\beta 257$ ، $\beta 258$ ، $\beta 259$ ، $\beta 260$ ، $\beta 261$ ، $\beta 262$ ، $\beta 263$ ، $\beta 264$ ، $\beta 265$ ، $\beta 266$ ، $\beta 267$ ، $\beta 268$ ، $\beta 269$ ، $\beta 270$ ، $\beta 271$ ، $\beta 272$ ، $\beta 273$ ، $\beta 274$ ، $\beta 275$ ، $\beta 276$ ، $\beta 277$ ، $\beta 278$ ، $\beta 279$ ، $\beta 280$ ، $\beta 281$ ، $\beta 282$ ، $\beta 283$ ، $\beta 284$ ، $\beta 285$ ، $\beta 286$ ، $\beta 287$ ، $\beta 288$ ، $\beta 289$ ، $\beta 290$ ، $\beta 291$ ، $\beta 292$ ، $\beta 293$ ، $\beta 294$ ، $\beta 295$ ، $\beta 296$ ، $\beta 297$ ، $\beta 298$ ، $\beta 299$ ، $\beta 300$ ، $\beta 301$ ، $\beta 302$ ، $\beta 303$ ، $\beta 304$ ، $\beta 305$ ، $\beta 306$ ، $\beta 307$ ، $\beta 308$ ، $\beta 309$ ، $\beta 310$ ، $\beta 311$ ، $\beta 312$ ، $\beta 313$ ، $\beta 314$ ، $\beta 315$ ، $\beta 316$ ، $\beta 317$ ، $\beta 318$ ، $\beta 319$ ، $\beta 320$ ، $\beta 321$ ، $\beta 322$ ، $\beta 323$ ، $\beta 324$ ، $\beta 325$ ، $\beta 326$ ، $\beta 327$ ، $\beta 328$ ، $\beta 329$ ، $\beta 330$ ، $\beta 331$ ، $\beta 332$ ، $\beta 333$ ، $\beta 334$ ، $\beta 335$ ، $\beta 336$ ، $\beta 337$ ، $\beta 338$ ، $\beta 339$ ، $\beta 340$ ، $\beta 341$ ، $\beta 342$ ، $\beta 343$ ، $\beta 344$ ، $\beta 345$ ، $\beta 346$ ، $\beta 347$ ، $\beta 348$ ، $\beta 349$ ، $\beta 350$ ، $\beta 351$ ، $\beta 352$ ، $\beta 353$ ، $\beta 354$ ، $\beta 355$ ، $\beta 356$ ، $\beta 357$ ، $\beta 358$ ، $\beta 359$ ، $\beta 360$ ، $\beta 361$ ، $\beta 362$ ، $\beta 363$ ، $\beta 364$ ، $\beta 365$ ، $\beta 366$ ، $\beta 367$ ، $\beta 368$ ، $\beta 369$ ، $\beta 370$ ، $\beta 371$ ، $\beta 372$ ، $\beta 373$ ، $\beta 374$ ، $\beta 375$ ، $\beta 376$ ، $\beta 377$ ، $\beta 378$ ، $\beta 379$ ، $\beta 380$ ، $\beta 381$ ، $\beta 382$ ، $\beta 383$ ، $\beta 384$ ، $\beta 385$ ، $\beta 386$ ، $\beta 387$ ، $\beta 388$ ، $\beta 389$ ، $\beta 390$ ، $\beta 391$ ، $\beta 392$ ، $\beta 393$ ، $\beta 394$ ، $\beta 395$ ، $\beta 396$ ، $\beta 397$ ، $\beta 398$ ، $\beta 399$ ، $\beta 400$ ، $\beta 401$ ، $\beta 402$ ، $\beta 403$ ، $\beta 404$ ، $\beta 405$ ، $\beta 406$ ، $\beta 407$ ، $\beta 408$ ، $\beta 409$ ، $\beta 410$ ، $\beta 411$ ، $\beta 412$ ، $\beta 413$ ، $\beta 414$ ، $\beta 415$ ، $\beta 416$ ، $\beta 417$ ، $\beta 418$ ، $\beta 419$ ، $\beta 420$ ، $\beta 421$ ، $\beta 422$ ، $\beta 423$ ، $\beta 424$ ، $\beta 425$ ، $\beta 426$ ، $\beta 427$ ، $\beta 428$ ، $\beta 429$ ، $\beta 430$ ، $\beta 431$ ، $\beta 432$ ، $\beta 433$ ، $\beta 434$ ، $\beta 435$ ، $\beta 436$ ، $\beta 437$ ، $\beta 438$ ، $\beta 439$ ، $\beta 440$ ، $\beta 441$ ، $\beta 442$ ، $\beta 443$ ، $\beta 444$ ، $\beta 445$ ، $\beta 446$ ، $\beta 447$ ، $\beta 448$ ، $\beta 449$ ، $\beta 450$ ، $\beta 451$ ، $\beta 452$ ، $\beta 453$ ، $\beta 454$ ، $\beta 455$ ، $\beta 456$ ، $\beta 457$ ، $\beta 458$ ، $\beta 459$ ، $\beta 460$ ، $\beta 461$ ، $\beta 462$ ، $\beta 463$ ، $\beta 464$ ، $\beta 465$ ، $\beta 466$ ، $\beta 467$ ، $\beta 468$ ، $\beta 469$ ، $\beta 470$ ، $\beta 471$ ، $\beta 472$ ، $\beta 473$ ، $\beta 474$ ، $\beta 475$ ، $\beta 476$ ، $\beta 477$ ، $\beta 478$ ، $\beta 479$ ، $\beta 480$ ، $\beta 481$ ، $\beta 482$ ، $\beta 483$ ، $\beta 484$ ، $\beta 485$ ، $\beta 486$ ، $\beta 487$ ، $\beta 488$ ، $\beta 489$ ، $\beta 490$ ، $\beta 491$ ، $\beta 492$ ، $\beta 493$ ، $\beta 494$ ، $\beta 495$ ، $\beta 496$ ، $\beta 497$ ، $\beta 498$ ، $\beta 499$ ، $\beta 500$ ، $\beta 501$ ، $\beta 502$ ، $\beta 503$ ، $\beta 504$ ، $\beta 505$ ، $\beta 506$ ، $\beta 507$ ، $\beta 508$ ، $\beta 509$ ، $\beta 510$ ، $\beta 511$ ، $\beta 512$ ، $\beta 513$ ، $\beta 514$ ، $\beta 515$ ، $\beta 516$ ، $\beta 517$ ، $\beta 518$ ، $\beta 519$ ، $\beta 520$ ، $\beta 521$ ، $\beta 522$ ، $\beta 523$ ، $\beta 524$ ، $\beta 525$ ، $\beta 526$ ، $\beta 527$ ، $\beta 528$ ، $\beta 529$ ، $\beta 530$ ، $\beta 531$ ، $\beta 532$ ، $\beta 533$ ، $\beta 534$ ، $\beta 535$ ، $\beta 536$ ، $\beta 537$ ، $\beta 538$ ، $\beta 539$ ، $\beta 540$ ، $\beta 541$ ، $\beta 542$ ، $\beta 543$ ، $\beta 544$ ، $\beta 545$ ، $\beta 546$ ، $\beta 547$ ، $\beta 548$ ، $\beta 549$ ، $\beta 550$ ، $\beta 551$ ، $\beta 552$ ، $\beta 553$ ، $\beta 554$ ، $\beta 555$ ، $\beta 556$ ، $\beta 557$ ، $\beta 558$ ، $\beta 559$ ، $\beta 560$ ، $\beta 561$ ، $\beta 562$ ، $\beta 563$ ، $\beta 564$ ، $\beta 565$ ، $\beta 566$ ، $\beta 567$ ، $\beta 568$ ، $\beta 569$ ، $\beta 570$ ، $\beta 571$ ، $\beta 572$ ، $\beta 573$ ، $\beta 574$ ، $\beta 575$ ، $\beta 576$ ، $\beta 577$ ، $\beta 578$ ، $\beta 579$ ، $\beta 580$ ، $\beta 581$ ، $\beta 582$ ، $\beta 583$ ، $\beta 584$ ، $\beta 585$ ، $\beta 586$ ، $\beta 587$ ، $\beta 588$ ، $\beta 589$ ، $\beta 590$ ، $\beta 591$ ، $\beta 592$ ، $\beta 593$ ، $\beta 594$ ، $\beta 595$ ، $\beta 596$ ، $\beta 597$ ، $\beta 598$ ، $\beta 599$ ، $\beta 600$ ، $\beta 601$ ، $\beta 602$ ، $\beta 603$ ، $\beta 604$ ، $\beta 605$ ، $\beta 606$ ، $\beta 607$ ، $\beta 608$ ، $\beta 609$ ، $\beta 610$ ، $\beta 611$ ، $\beta 612$ ، $\beta 613$ ، $\beta 614$ ، $\beta 615$ ، $\beta 616$ ، $\beta 617$ ، $\beta 618$ ، $\beta 619$ ، $\beta 620$ ، $\beta 621$ ، $\beta 622$ ، $\beta 623$ ، $\beta 624$ ، $\beta 625$ ، $\beta 626$ ، $\beta 627$ ، $\beta 628$ ، $\beta 629$ ، $\beta 630$ ، $\beta 631$ ، $\beta 632$ ، $\beta 633$ ، $\beta 634$ ، $\beta 635$ ، $\beta 636$ ، $\beta 637$ ، $\beta 638$ ، $\beta 639$ ، $\beta 640$ ، $\beta 641$ ، $\beta 642$ ، $\beta 643$ ، $\beta 644$ ، $\beta 645$ ، $\beta 646$ ، $\beta 647$ ، $\beta 648$ ، $\beta 649$ ، $\beta 650$ ، $\beta 651$ ، $\beta 652$ ، $\beta 653$ ، $\beta 654$ ، $\beta 655$ ، $\beta 656$ ، $\beta 657$ ، $\beta 658$ ، $\beta 659$ ، $\beta 660$ ، $\beta 661$ ، $\beta 662$ ، $\beta 663$ ، $\beta 664$ ، $\beta 665$ ، $\beta 666$ ، $\beta 667$ ، $\beta 668$ ، $\beta 669$ ، $\beta 670$ ، $\beta 671$ ، $\beta 672$ ، $\beta 673$ ، $\beta 674$ ، $\beta 675$ ، $\beta 676$ ، $\beta 677$ ، $\beta 678$ ، $\beta 679$ ، $\beta 680$ ، $\beta 681$ ، $\beta 682$ ، $\beta 683$ ، $\beta 684$ ، $\beta 685$ ، $\beta 686$ ، $\beta 687$ ، $\beta 688$ ، $\beta 689$ ، $\beta 690$ ، $\beta 691$ ، $\beta 692$ ، $\beta 693$ ، $\beta 694$ ، $\beta 695$ ، $\beta 696$ ، $\beta 697$ ، $\beta 698$ ، $\beta 699$ ، $\beta 700$ ، $\beta 701$ ، $\beta 702$ ، $\beta 703$ ، $\beta 704$ ، $\beta 705$ ، $\beta 706$ ، $\beta 707$ ، $\beta 708$ ، $\beta 709$ ، $\beta 710$ ، $\beta 711$ ، $\beta 712$ ، $\beta 713$ ، $\beta 714$ ، $\beta 715$ ، $\beta 716$ ، $\beta 717$ ، $\beta 718$ ، $\beta 719$ ، $\beta 720$ ، $\beta 721$ ، $\beta 722$ ، $\beta 723$ ، $\beta 724$ ، $\beta 725$ ، $\beta 726$ ، $\beta 727$ ، $\beta 728$ ، $\beta 729$ ، $\beta 730$ ، $\beta 731$ ، $\beta 732$ ، $\beta 733$ ، $\beta 734$ ، $\beta 735$ ، $\beta 736$ ، $\beta 737$ ، $\beta 738$ ، $\beta 739$ ، $\beta 740$ ، $\beta 741$ ، $\beta 742$ ، $\beta 743$ ، $\beta 744$ ، $\beta 745$ ، $\beta 746$ ، $\beta 747$ ، $\beta 748$ ، $\beta 749$ ، $\beta 750$ ، $\beta 751$ ، $\beta 752$ ، $\beta 753$ ، $\beta 754$ ، $\beta 755$ ، $\beta 756$ ، $\beta 757$ ، $\beta 758$ ، $\beta 759$ ، $\beta 760$ ، $\beta 761$ ، $\beta 762$ ، $\beta 763$ ، $\beta 764$ ، $\beta 765$ ، $\beta 766$ ، $\beta 767$ ، $\beta 768$ ، $\beta 769$ ، $\beta 770$ ، $\beta 771$ ، $\beta 772$ ، $\beta 773$ ، $\beta 774$ ، $\beta 775$ ، $\beta 776$ ، $\beta 777$ ، $\beta 778$ ، $\beta 779$ ، $\beta 780$ ، $\beta 781$ ، $\beta 782$ ، $\beta 783$ ، $\beta 784$ ، $\beta 785$ ، $\beta 786$ ، $\beta 787$ ، $\beta 788$ ، $\beta 789$ ، $\beta 790$ ، $\beta 791$ ، $\beta 792$ ، $\beta 793$ ، $\beta 794$ ، $\beta 795$ ، $\beta 796$ ، $\beta 797$ ، $\beta 798$ ، $\beta 799$ ، $\beta 800$ ، $\beta 801$ ، $\beta 802$ ، $\beta 803$ ، $\beta 804$ ، $\beta 805$ ، $\beta 806$ ، $\beta 807$ ، $\beta 808$ ، $\beta 809$ ، $\beta 810$ ، $\beta 811$ ، $\beta 812$ ، $\beta 813$ ، $\beta 814$ ، $\beta 815$ ، $\beta 816$ ، $\beta 817$ ، $\beta 818$ ، $\beta 819$ ، $\beta 820$ ، $\beta 821$ ، $\beta 822$ ، $\beta 823$ ، $\beta 824$ ، $\beta 825$ ، $\beta 826$ ، $\beta 827$ ، $\beta 828$ ، $\beta 829$ ، $\beta 830$ ، $\beta 831$ ، $\beta 832$ ، $\beta 833$ ، $\beta 834$ ، $\beta 835$ ، $\beta 836$ ، $\beta 837$ ، $\beta 838$ ، $\beta 839$ ، $\beta 840$ ، $\beta 841$ ، $\beta 842$ ، $\beta 843$ ، $\beta 844$ ، $\beta 845$ ، $\beta 846$ ، $\beta 847$ ، $\beta 848$ ، $\beta 849$ ، $\beta 850$ ، $\beta 851$ ، $\beta 852$ ، $\beta 853$ ، $\beta 854$ ، $\beta 855$ ، $\beta 856$ ، $\beta 857$ ، $\beta 858$ ، $\beta 859$ ، $\beta 860$ ، $\beta 861$ ، $\beta 862$ ، $\beta 863$ ، $\beta 864$ ، $\beta 865$ ، $\beta 866$ ، $\beta 867$ ، $\beta 868$ ، $\beta 869$ ، $\beta 870$ ، $\beta 871$ ، $\beta 872$ ، $\beta 873$ ، $\beta 874$ ، $\beta 875$ ، $\beta 876$ ، $\beta 877$ ، $\beta 878$ ، $\beta 879$ ، $\beta 880$ ، $\beta 881$ ، $\beta 882$ ، $\beta 883$ ، $\beta 884$ ، $\beta 885$ ، $\beta 886$ ، $\beta 887$ ، $\beta 888$ ، $\beta 889$ ، $\beta 890$ ، $\beta 891$ ، $\beta 892$ ، $\beta 893$ ، $\beta 894$ ، $\beta 895$ ، $\beta 896$ ، $\beta 897$ ، $\beta 898$ ، $\beta 899$ ، $\beta 900$ ، $\beta 901$ ، $\beta 902$ ، $\beta 903$ ، $\beta 904$ ، $\beta 905$ ، $\beta 906$ ، $\beta 907$ ، $\beta 908$ ، $\beta 909$ ، $\beta 910$ ، $\beta 911$ ، $\beta 912$ ، $\beta 913$ ، $\beta 914$ ، $\beta 915$ ، $\beta 916$ ، $\beta 917$ ، $\beta 918$ ، $\beta 919$ ، $\beta 920$ ، $\beta 921$ ، $\beta 922$ ، $\beta 923$ ، $\beta 924$ ، $\beta 925$ ، $\beta 926$ ، $\beta 927$ ، $\beta 928$ ، $\beta 929$ ، $\beta 930$ ، $\beta 931$ ، $\beta 932$ ، $\beta 933$ ، $\beta 934$ ، $\beta 935$ ، $\beta 936$ ، $\beta 937$ ، $\beta 938$ ، $\beta 939$ ، $\beta 940$ ، $\beta 941$ ، $\beta 942$ ، $\beta 943$ ، $\beta 944$ ، $\beta 945$ ، $\beta 946$ ، $\beta 947$ ، $\beta 948$ ، $\beta 949$ ، $\beta 950$ ، $\beta 951$ ، $\beta 952$ ، $\beta 953$ ، $\beta 954$ ، $\beta 955$ ، $\beta 956$ ، $\beta 957$ ، $\beta 958$ ، $\beta 959$ ، $\beta 960$ ، $\beta 961$ ، $\beta 962$ ، $\beta 963$ ، $\beta 964$ ، $\beta 965$ ، $\beta 966$ ، $\beta 967$ ، $\beta 968$ ، $\beta 969$ ، $\beta 970$ ، $\beta 971$ ، $\beta 972$



شکل ۲: مورفولوژی یک کلونی به دست آمده از هم‌کشتی سلول‌های ژرم و سلول‌های سرتولی (A). سلول‌های کلونی نشان‌گرهای PLZF (B)، Oct 4 (C)، CDH1 (E) را بیان نمودند. ولی بیان نشان‌گر C-kit (D) در آنها ضعیف بود (بزرگ‌نمایی A: $\times 100$ ، B, D, E: $\times 200$ و C: $\times 400$). شکل‌های که با «*» نشان داده شده‌اند، شکل‌های کنترل منفی هستند (بزرگ‌نمایی همه شکل‌ها کنترل منفی $\times 200$ است).



شکل ۳: بررسی نشان‌گرهای CDH1 (A) و PLZF (B) در بیضه موش بالغ به عنوان گروه کنترل (بزرگ‌نمایی A و B: $\times 400$). شکل‌های C و D به ترتیب شکل‌های کنترل منفی نشان‌گرهای CDH1 و PLZF هستند (بزرگ‌نمایی C و D: $\times 200$).

ارزیابی نتایج حاصل از کشت مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها به‌ازای هر گروه شامل ۳ تکرار در جدول ۱ ارائه شده است. در روز سوم پس از کشت، بین میانگین تعداد کلونی‌ها در سه گروه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p = 0/630 > 0/05$) و $p = 0/038 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) ولی در روزهای هفتم ($p = 0/038 < 0/05$) و $p = 0/000 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) = ۷۳/۳۹ و چهاردهم ($p = 0/001 > 0/05$) (F_(۲, ۸)) = ۲۳/۳۴ و میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه کنترل و STO بیشتر بود. اگرچه میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه STO نسبت به گروه کنترل تا اندازه‌ای کمتر بود ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

ارزیابی نتایج حاصل از کشت مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها به‌ازای هر گروه شامل ۳ تکرار در جدول ۱ ارائه شده است. در روز سوم پس از کشت، بین میانگین تعداد کلونی‌ها در سه گروه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p = 0/630 > 0/05$) و $p = 0/038 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) ولی در روزهای هفتم ($p = 0/038 < 0/05$) و $p = 0/000 < 0/05$ (F_(۲, ۸)) = ۷۳/۳۹ و چهاردهم ($p = 0/001 > 0/05$) (F_(۲, ۸)) = ۲۳/۳۴ و میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه کنترل و STO بیشتر بود. اگرچه میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه STO نسبت به گروه کنترل تا اندازه‌ای کمتر بود ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

جدول ۱: مقایسه تعداد کلونی‌ها در گروه‌های مختلف به تفکیک روزها (به‌ازای 2×10^6 تعداد سلول اولیه)

روز سوم	روز هفتم	روز دهم	روز چهاردهم	
کنترل	$1/33 \pm 0/58$	$3/00 \pm 1/00$	$1/53 \pm 5/67$	
سرتولی	$7/00 \pm 4/36^a$	$3/00 \pm 18/00^a$	$7/94 \pm 26/00^a$	
STO	$0/33 \pm 0/58^b$	$0/58 \pm 1/33^b$	$0/58 \pm 1/67^b$	
P-value	$p(ک-س) = 0/035$	$p(س-اس) < 0/0001$	$p(ک-س) = 0/002$	
	$p(س-اس) = 0/019$	$p(ک-س) < 0/0001$	$p(س-اس) = 0/001$	

* (انحراف معیار \pm میانگین) مربوط به تعداد کلونی‌ها گزارش شده است.

آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شده است.

a: در مقایسه با گروه کنترل در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

b: در مقایسه با گروه سرتولی در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

c: مقدار P-value مربوط به مقایسه‌های معنی‌دار دو گروه با حروف مخفف مورد نظر؛ ک: گروه کنترل، س: گروه سرتولی، اس: گروه STO

جدول ۲: مقایسه قطر (میکرومتر) کلونی‌ها در گروه‌های مختلف به تفکیک روزها

روز سوم	روز هفتم	روز دهم	روز چهاردهم	
کنترل	$0/23 \pm 0/13^0$	$0/40 \pm 0/13$	$0/77 \pm 0/11$	
سرتولی	$0/32 \pm 0/18$	$0/21 \pm 1/17^a$	$1/74 \pm 0/2^a$	
STO	$0/00 \pm 0/00$	$0/17 \pm 0/29^b$	$1/28 \pm 0/33^{ab}$	
P-value	$p(ک-س)^c = 0/005$	$p(ک-س) = 0/005$	$p(ک-س) = 0/001$	
	$p(س-اس) = 0/001$	$p(ک-اس) = 0/042$	$p(س-اس) = 0/010$	
		$p(س-اس) = 0/047$	$p(س-اس) = 0/049$	

* (انحراف معیار \pm میانگین) مربوط به تعداد کلونی‌ها گزارش شده است.

آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شده است.

a: در مقایسه با گروه کنترل در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

b: در مقایسه با گروه سرتولی در همان روز از نظر آماری در سطح $0/05$ معنی‌دار است ($p < 0/05$).

c: مقدار P-value مربوط به مقایسه‌های معنی‌دار دو گروه با حروف مخفف مورد نظر؛ ک: گروه کنترل، س: گروه سرتولی، اس: گروه STO

این روند افزایش در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر شیب قابل ملاحظه‌ای داشت و در روز چهاردهم به بیشترین مقدار ($7/20 \pm 1/74$) خود رسید. این افزایش در گروه STO به این ترتیب بود که در روز هفتم میانگین قطر کلونی‌ها از گروه کنترل کوچکتر بود ولی در روزهای دهم و چهاردهم با یک افزایش قابل ملاحظه، میانگین آن از گروه کنترل بزرگتر شد ($p < 0/05$).

نتایج حاصل از RT-PCR

بیان ژن‌های Alpha6 integrin و Beta1 Integrin با استفاده از تکنیک RT-PCR در گروه‌های هم‌کشتی و گروه کنترل بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ژن Beta1 Integrin در هر سه گروه بیان شد ولی ژن Alpha6 Integrin در آنها بیان نشد. بیان ژن‌های Alpha6 Integrin، Beta1 Integrin در بیضه موش بالغ به عنوان گروه کنترل بررسی و هر دو ژن مزبور در آن بیان شد (شکل‌های B و ۴A).

ارائه نتایج حاصل از Real Time PCR

مقایسه بیان ژن‌های مختلف در گروه‌های کنترل، سرتولی و STO

تغییرات زمانی میانگین تعداد کلونی‌ها در هر سه گروه کنترل ($p = 0/000 < 0/05$)، سرتولی ($F_{(3,18)} = 53/36$)، $p = 0/001 < 0/05$ و STO ($F_{(3,18)} = 27/88$)، $p = 0/004 < 0/05$ و $F_{(3,18)} = 13/60$) یک روند افزایشی معنی‌دار را نشان داد؛ به‌طوری که در روزهای دهم و چهاردهم، میانگین تعداد کلونی‌ها نسبت به روزهای سوم و هفتم بیشتر بود ولی این روند افزایش در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر، شیب قابل ملاحظه‌ای داشت و در روز چهاردهم به بیشترین مقدار ($26/00 \pm 7/94$) خود رسید. نتایج مقایسه میانگین قطر کلونی‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

در روز سوم، بین میانگین قطر کلونی‌ها در سه گروه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$). ولی در روزهای هفتم، دهم و چهاردهم، میانگین قطر کلونی‌ها در گروه سرتولی نسبت به دو گروه کنترل و STO بیشتر بود ($p < 0/05$). اگرچه میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه STO نسبت به گروه کنترل تا اندازه‌ای کمتر بود ولی این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). تغییرات زمانی میانگین قطر کلونی‌ها در هر سه گروه، یک روند افزایشی معنی‌دار را نشان داد ($p < 0/05$)؛ به‌طوری که در روزهای دهم و چهاردهم، میانگین قطر کلونی‌ها نسبت به روزهای سوم و هفتم بیشتر بود ولی

شده است. ون پلت و همکاران برای افزایش خلوص سلول‌های اسپرماتوگونی و جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی A از رت بالغ، از نقص ویتامین A استفاده کردند (۱۳). شینوهارا و همکاران، ذره‌های مغناطیسی و آنتی‌بادی‌هایی را علیه نشان‌گرهای Beta1 Integrin و Alpha6 Integrin، برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی به کار بردند (۱۵).

در این پژوهش، از سلول‌های بیضه موش‌های بالغ ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی A تمایز نیافته، از موش بالغ مشکل است، زیرا بیضه موش بالغ حاوی انواع مختلفی از سلول‌های ژرم می‌باشد. برای به دست آوردن یک بازده بالا از اسپرماتوگونی A تمایز نیافته، بهتر است سایر سلول‌های ژرم حذف شوند (۱۶). برای جداسازی سلول‌های بیضه از روش هضم آنزیمی استفاده شد. کروجی و همکاران برای جداسازی و کشت سلول‌های موش بالغ از این روش استفاده کردند (۱۷).

در سیستم کشت مطالعه حاضر، سلول‌های با حاشیه نامنظم و ظاهر گرانولار، سلول‌های سرتولی بودند که ایجاد تک لایه کرده و به عنوان لایه تغذیه کننده برای هم‌کشتی با سلول‌های اسپرماتوگونی استفاده شدند. برای تایید ماهیت این سلول‌ها نشان‌گر اختصاصی ویمنتین به کار رفت. پروتئین سایتواسکلتون ویمنتین در سیتوپلاسم اطراف هسته سلول‌های سرتولی بیان شد. یافته‌های این بررسی با نتایج پژوهش‌های انجام شده در این زمینه مطابقت دارد (۱۱، ۱۸، ۱۹ و ۲۰). ویمنتین یک پروتئین سایتواسکلتون است که در سلول‌های اسپرماتوگونی یافت شده و این نشان‌گر از روز چهاردهم به بعد در سلول‌های سرتولی و در اطراف هسته آنها بیان می‌شود (۱۲).

برای حصول اطمینان از ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده، از نشان‌گرهای اختصاصی CDH1، c-kit، Oct-4 و PLZF استفاده شد. نشان‌گر Oct-4 در کلونی‌های تشکیل شده، بیان شد. بنابراین با توجه به اینکه Oct-4 نشان‌گر خاص سلول‌های بنیادی است، کلونی‌های تشکیل شده نیز ماهیت سلول‌های بنیادی را دارند. مطالعات دیگر در این زمینه نشان دادند که سلول‌های اسپرماتوگونی نشان‌گر Oct-4 را بیان می‌کنند (۱۱، ۲۴-۲۰).

در کلونی‌های مطالعه حاضر، بیان شدن نشان‌گر CDH1 نشان دهنده این موضوع است که کلونی‌های مزبور حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A بودند. ماسوتاکا توکودا و همکاران، نیز در مطالعه خود نشان دادند که نشان‌گر CDH1 در سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A موش بیان می‌شود. آنها به این نتیجه رسیدند که سلول‌هایی که نشان‌گر CDH1 را بیان نمودند، نشان‌گر PLZF را نیز بیان کردند (۲۵).

نشان‌گر PLZF برای خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی ضروری است. این نشان‌گر در سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته ضروری است. Apr (A pair) و As (A single)، Aal (A aline) بیان می‌شود. نشان‌گر PLZF در کلونی‌های تشکیل شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه بیان شد. این یافته با یافته‌های سایر پژوهش‌گران مطابقت دارد (۲۷-۲۵).

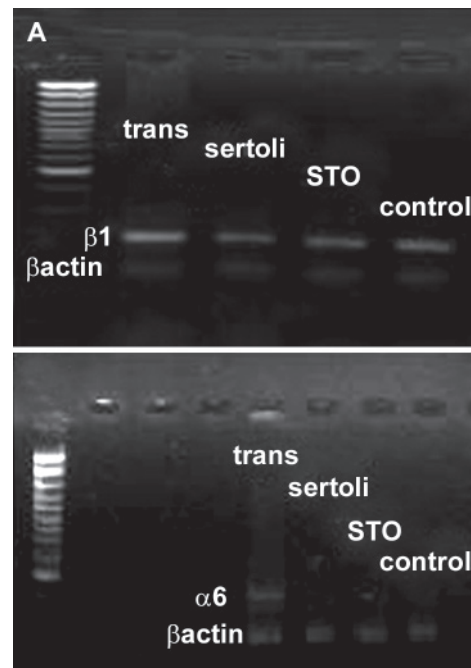
نشان‌گر C-kit، یکی از اعضای خانواده گیرنده تیروزین کیناز است که در Aal Late و اسپرماتوگونی‌های تمایز یافته بیان می‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر نیز این نشان‌گر به صورت ضعیف در بعضی از کلونی‌ها و در حاشیه آنها بیان شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های موجود در حاشیه این کلونی‌ها، به

پس از اصلاح آنها نسبت به ژن مرجع در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: مقایسه بیان ژنی ژن‌های Alpha6 Integrin، Beta1 Integrin و Oct-4 در گروه‌های مختلف بر اساس Real Time-PCR

Oct-4	Beta1 integrin	Alpha6 integrin	
۰/۰۳۸ ± ۰/۰۰۲۱	۷/۴۳ ± ۲/۴۷	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۰	کنترل
۰/۰۵۸ ± ۰/۰۰۶۹	۰/۵۷ ± ۰/۷۲	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۳	سرتولی
۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۲۲	۱۳/۳۷ ± ۲۱/۱۶	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۲	STO

* (انحراف معیار ± میانگین) مربوط به بیان ژنی ژن‌ها پس از اصلاح آنها نسبت به ژن مرجع گزارش شده است. آزمایش برای هر گروه ۳ بار تکرار شده است.



شکل ۴: ژل بیان ژن Beta1 Integrin (A)، Alpha6 Integrin (B) برای انجام RT-PCR

برای ژن‌های Beta1 Integrin، Alpha6 Integrin و Oct-4 بین هیچ یک از گروه‌های کنترل، سرتولی و STO اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$). به عبارت دیگر، میانگین بیان ژنی پس از اصلاح آن نسبت به ژن مرجع در گروه‌های کنترل، سرتولی و STO به تقریب یکسان بود.

بحث

در این مطالعه، جهت ایجاد محیط کشت بهینه، سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه موش بالغ با سلول‌های سرتولی و STO هم‌کشتی داده شدند. سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت، کلونی‌زایی کردند. سپس بعد از دو هفته کشت، بیان ژن‌های Oct-4، Beta1 Integrin و Alpha6 Integrin در کلونی‌ها بررسی شد.

تاکنون روش‌های مختلفی برای جداسازی و غنی‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی A در محیط کشت ارائه شده است که به دلیل عدم وجود نشان‌گرهای اختصاصی این سلول‌ها همچنان ناخالصی دیده

سمت تمایز رفتند. بعضی از مطالعات نیز به نتیجه‌ی مشابهی دست یافته بودند (۱۷، ۱۸).

در ارزیابی تاثیر سیستم هم‌کشتی سرتولی و STO بر تشکیل کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ در محیط آزمایشگاه، این نتیجه حاصل شد که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی نسبت به هم‌کشتی با سلول‌های STO باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد و قطر کلونی‌ها شده است. به عبارت دیگر یافته‌های این مطالعه، روند تغییرات میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها را رو به افزایش نشان داد و این افزایش در گروه‌های کنترل و STO به صورت غیر قابل ملاحظه و در گروه سرتولی نسبت به دو گروه دیگر برجسته و معنی‌دار بود. همچنین این افزایش به صورت یکنواخت در تمام مدت هم‌کشتی ادامه یافت. نتایج مطالعات مشابه انجام شده در این زمینه نیز یافته‌های مطالعه‌ی حاضر را تایید می‌کند (۱۱، ۱۸، ۲۸-۳۱).

کروچی در مطالعه خود (با هدف بررسی سیستم‌های هم‌کشتی برای غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ)، به این نتیجه دست یافت که بعضی از سیستم‌های هم‌کشتی (یعنی هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی و فاکتورهای رشد) در نیل به هدف مطالعه به شکل قابل توجهی موثر بودند، به طوری که بعضی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این سیستم‌های کشت با انجام تقسیمات زیاد توانستند کلونی ایجاد کنند و تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان افزایش یافت که نشان‌دهنده تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است (۱۱). سلول‌های سرتولی با ترشح فاکتورهایی از بقاء، تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی حمایت می‌کنند. یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود، Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) است. این فاکتور، یک محرک قوی برای تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی است (۳۲). در جوندگان، خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی به شدت تحت تاثیر GDNF است (۳۳).

بنابراین همان‌طور که در یافته‌های مطالعه حاضر و همچنین در یافته‌های مطالعات ذکر شده ملاحظه شد، سیستم هم‌کشتی سرتولی توانست تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را حمایت نماید.

یکی از فاکتورهای مهمی که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود، GDNF است. این فاکتور نقش مهمی در خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی دارد. ناگانو و همکاران با افزودن GDNF به محیط کشت، مشاهده نمودند که میزان زنده ماندن و تکثیر آنها در محیط افزایش می‌یابد (۶). کروچی و همکاران نیز به این نتیجه دست یافتند (۱۷، ۳۴). این فاکتور از طریق تنظیم بیان ژن‌های *etv5* و *bcl6b*، خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

بنابراین سلول‌های سرتولی با ترشح GDNF، از خودنوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی حمایت می‌کنند. به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر یکی از دلایل حمایت سلول‌های سرتولی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این مدت زمان کوتاه (دو هفته کشت)، ترشح GDNF باشد.

فرآوردی دیگر سلول سرتولی، فاکتور رونویسی ERM است و به طور منحصر در سلول‌های سرتولی بالغ بیان می‌شود. نتایج مطالعه دادونه، نشان داده است که فاکتور ERM برای خودنوزایی و تداوم

اسپرم‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش بالغ ضروری است (۳۵).

نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات ناگانو و همکاران و هاستورپ و همکاران، هم‌خوانی ندارد. آنها نشان دادند که هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی، تعداد و قطر کلونی‌های اسپرماتوگونی را افزایش نمی‌دهد (۶، ۳۶).

در هم‌کشتی سلول‌های STO با سلول‌های اسپرماتوگونی، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که STO میزان زنده ماندن سلول‌های اسپرماتوگونی را افزایش می‌دهد ولی حمایت آنها از کلونی‌زایی (تکثیر) سلول‌های اسپرماتوگونی قابل ملاحظه نبود. این موضوع با یافته‌های ناگانو و همکاران، هم‌خوانی دارد (۵). در مطالعه حاضر وجود سلول‌های گرد زنده بر روی سلول‌های STO مشاهده شد که شاید مدت دو هفته کشت، زمان کافی برای تکثیر آنها نبوده برای بررسی بیان ژن‌های *Beta1* و *Alpha6 Integrin* از تکنیک RT-PCR استفاده شد. ژن *Beta1 integrin* در هر یک از گروه‌های کنترل، سرتولی و STO بیان شد ولی ژن *Alpha6 Integrin* در گروه‌های مزبور بیان نشد. از آنجا که ژن *Alpha6 Integrin* یکی از ژن‌هایی است که در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود و توسط تکنیک RT-PCR معمولی در گروه‌های مورد مطالعه بیان نشد، بنابراین جهت بررسی بیان ژنی این ژن به همراه ژن‌های *Beta1 Integrin* و *Oct-4*، تکنیک قوی‌تر *Real Time PCR* به کار رفت.

ژن‌های *Beta1 Integrin* و *Alpha6 Integrin* از نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند (۳۷). برخی از مطالعات در این زمینه نشان دادند که نشان‌گر *Oct-4* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود (۲۱، ۳۸).

در حالت کلی، برای هر یک از ژن‌های مورد بررسی بین گروه‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. ولی هر سه ژن که از نشان‌گرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند، در کلونی‌های حاصل از کشت در هر سه گروه بیان شد که نشان می‌دهد کلونی‌ها حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند و اختلاف معنی‌داری در بیان ژن‌ها مشاهده نشد. به نظر می‌رسد، سیستم هم‌کشتی توانسته در بیان این ژن‌ها از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حمایت لازم را بنماید.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر بهینه‌ای که سلول‌های سرتولی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هم‌کشتی با این سلول‌ها فراهم می‌کنند - که این موضوع توسط سایر مطالعات نیز تایید شده است - استفاده از سلول‌های سرتولی برای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پیشنهاد می‌شود. همچنین در مطالعات آتی می‌توان پس از پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هم‌کشت شده با لایه تغذیه کننده به بیضه موش نابارور، تاثیر لایه‌های تغذیه کننده را بررسی کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله در راستای پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح و از محل بودجه پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و تنظیم شده است.

References

- de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*. 1998; 79(2): 67-80.
- Meistrich ML, Van Beek MEAB. In: Cell and molecular biology of testis, eds. Desjardins C. and Ewing L.L. Oxford University Press, New York. 1993; 266-295.
- Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(25): 9524-9529.
- Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl*. 1996; 17(6): 708-717.
- Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue cell*. 1998; 30(4): 389-397.
- 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.
- Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, et al. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(3): 229-259.
- Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effect of stem cell factor and granulocyte macrophage colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol Reprod*. 1999; 61(1): 225-230.
- Kojima Y, Kominami K, Dohmae K, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, et al. Cessation of spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (jsd/jsd) mice. *Int J Urol*. 1997; 4(5): 500-507.
- Hofmann MC, Van Der Wee KS, Dargart JL, Dirami G, Dettin L, Dym M. Establishment and characterization of neonatal mouse sertoli cell lines. *J Androl*. 2003; 24(1): 120-130.
- Koruji M. 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. 2007.
- Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Fröysa B, Söder O, Boitani C. A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 146(1-2): 121-127.
- 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): 439-444.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 5th ed. New York: Pearson Press; 1998; 235-260.
- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(10): 5504-5509.
- Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc*. 2009; 4(2): 143-154.
- Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. In: *Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009; 45(5-6): 281-289.
- 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): 272-281.
- Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of Sertoli cell function. *Biol Reprod*. 2003; 68(3): 996-1002.
- Absalan F, Movahedin M, Mowla SJ. Combination of in vivo cryptorchid testis and In vitro co-culture system to obtain high purification and proliferation of mouse spermatogonial stem cells. *Int J Fertil & Steril*. 2008; 2(3): 115-120.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*. 1998; 71(1-2): 89-98.
- Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl*. 2003; 24(5): 661-669.
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Dev Dyn*. 1997; 208(1): 125-136.
- Oke BO, Suarez-Quian CA. Localization of secretory, membrane-associated and cytoskeletal proteins in rat testis using an improved immunocytochemical protocol that employs polyester wax. *Biol Reprod*. 1993; 48(3): 621-631.
- Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod*. 2007; 76(1): 130-141.
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 2004; 36(6): 653-659.
- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2004; 36(6): 647-652.
- Aponte PM, Van Braget MP, de Rooij DG, Van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*. 2005; 113(11-12): 727-742.
- Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla S. Graft efficiency of co-cultured spermatogonial stem cells using sperm assay in epididymal lumen of recipient mice. *Yakhteh*. 2006; 7(4): 242-249.
- Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*. 1993; 290(2): 193-200.
- Zhang DY, He DW, Wei GH, Song XF, Li XL, In T. Long-term coculture of spermatogonial stem cells on sertoli cells feeder layer in vitro. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2008; 39(1): 6-9.
- Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol*. 2005; 279(1): 114-124.
- Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonia

- nial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24: 263-286.
34. Koruji SM, Movahedin M, Mowla SJ, Gorabi H, Arfaei Aaj. The effect of inducer factors on adult mouse spermatogonial cells colony formation in vitro. *Yakhteh Med J.* 2007; 9(2): 141-150.
35. Dadune JP. New insights into male gametogenesis what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobial.* 2007; 45(3): 141-147.
36. Hasthorpe S, Barbic S, Farmer PJ, Hutson JM. Growth factor and somatic cell regulation of mouse gonocyte-derived colony formation in vitro. *J Reprod Fertil.* 2000; 119(1): 85-91.
37. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(10): 5504-5509.
38. He Z, Jiang J, Hofmann MC, Dym M. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod.* 2007; 77(4): 723-733.
-