Archive of SID

Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.44; No 4

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

Effect of different concentrations of melatonin on SSCs colony formation (*In vitro*)

Hesam Jamshidi-Seykevandi[1], Peyman Rahimi-Feyli[1*], Ali-Asghar Moghaddam[1]

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

(Received:2019/08/25 Accept: 2019/12/10)

Abstract

Background: *Spermatogonial Stem Cells (SSCs) are used as an excellent model system for differentiation, development, and functioning of testes and provide a source of cells for infertility treatment and production of transgenic animals and recombinant drugs. The aim of the present study was to determine the effects of different concentrations of melatonin on prepubertal lamb's spermatogonial colony formation.*

Methods: *An experimental study was conducted. Each treatment was replicated 5 times. Testicular cells were isolated from testes of prepubertal lambs using two-step enzymatic digestion and then cultured for 10 days. Control cells (C) were grown in basic DMEM media with %1 antibiotic and %5 FBS. Treated cells were grown in basic media with 1 µmol/ml (T1) or 1 nmol/ml (T2) melatonin. Culture media was changed every 72h and SSCs colony formation was monitored via inverted microscope. Data were analyzed running one way ANOVA. P values less than %5 were considered as statistically significant.*

Results: *SSCs were identified via immunocytochemistry assay against PGP9.5. Number and surface area of colonies were greater in T1 group than C and T2 groups on day 7 (P=0.04587).*

Conclusion: *The findings suggest that simultaneous addition of 1 µmol/ml melatonin to culture media may increase in vitro colony formation of prepubertal sheep SSCs. So, addition of above dose of melatonin to SSCs culture media is suggested.*

Keywords: *Spermatogonial Stem cell; Colony formation; Melatonin*

** Corresponding Author:Peyman Rahimi-Feyli*

Email:drp.rahimi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ٤٤، شماره ٤، ١٣٩٩، صفحات ٥٨٠ تا ٥٨٦

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف ملاتونین بر القای کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی *(In vitro)* در شرایط آزمایشگاه

حسام جمشیدی سیکه‌وندی[1]، پیمان رحیمی‌فیلی[1*]، علی‌اصغر مقدم[1]

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۸/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۱۹

چکیده:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (*SSCs*) مدلی عالی برای کمک به درک بیشتر روند تمایز، رشد و عملکرد بیضه‌هاست و در نتیجه امکان استفاده بیشتر از این سلول‌ها در درمان نازایی، تولید حیوان‌های تراریخته و داروهای نوترکیب را فراهم می کنند. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین بر القای کلونی‌زایی *SSCs* است. مطالعه حاضر در بازه زمانی تابستان ۱۳۹۶ و در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد.

مواد و روش‌ها: نوع مطالعه حاضر تجربی بود. در مجموع پنج بار نمونه‌گیری از کشتارگاه و تکرار آزمایش انجام شد. سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه بره‌های نابالغ با استفاده از هضم آنزیمی دو مرحله‌ای استخراج شد و سپس به مدت ۱۰ روز در سه گروه شامل گروه شاهد (کشت ساده در محیط پایه *DMEM* حاوی ۱درصد آنتی بیوتیک و ۵درصد سرم گوساله جنینی(*FBS*)) و تیمارهای ۱ و ۲ (به ترتیب کشت در محیط کشت پایه مذکور توام با اضافه کردن یک میکرومول و یک نانومول ملاتونین) کشت شدند. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت یک‌بار انجام و همزمان تعداد و قطر کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. آزمون آماری مورد استفاده آنالیز واریانس یکطرفه و سطح معناداری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: ماهیت بنیادینگی سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن *PGP۹٫۵* تایید شد. تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز هفتم کشت در تیمار یک به طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بود ($P=0/04578$) .

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد افزودن ملاتونین با دوز یک میکرومول تاثیر مثبتی بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه دارد. نویسندگان استفاده از هورمون ملاتونین را با دوز فوق برای کشت اسپرماتوگونی گوسفند پیشنهاد می کنند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، کلونی‌زایی، ملاتونین

مقدمه:

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی[1] (SSCs) تنها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می کنند(۱) و از طریق تکثیر و تزاید مداوم، فرآیند اسپرماتوژنز را پیش می‌برند. وجود تعداد اندک سلول‌های بنیادی در بیضه‌های بالغان، جداسازی آن‌ها را برای مطالعه‌های آزمایشگاهی با محدودیت مواجه کرده است(۲). از طرف دیگر، شیمی درمانی یا اشعه درمانی طولانی‌مدت در بیماران مبتلا به سرطان، اثر مخربی روی این سلول‌ها دارد و می‌تواند به ناباروی این بیماران پس از درمان منجر شود(۳). بنابراین، روش‌های کارا و با کفایت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه نقش مهمی در حفظ و نگه داری اسپرم و درمان ناباروری بویژه در بیماران نجات یافته از سرطان دارد(۴و۵). تاکنون جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انسان(۸-۶) و حیوان‌هایی نظیر موش(۹) رت(۱۰) ، ماهی(۱۱) ، دام‌های اهلی از جمله گاو(۱۲) ،بز(۱۳) و خوک(۱۴) انجام شده است. کشت این سلولها در محیط کشت سرم‌دار و فاقد سرم(۱۵و۱۶) همراه با لایه تغذیه‌کننده سلول‌های سرتولی(۱۷) ولایه تغذیه‌کننده سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش(۱۸) انجام گرفته است. در مطالعه‌های اخیر که عوامل مرتبط با رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت از جمله فاکتور نوتروتروپیک مشتق شده از سلول‌های گلیال(GDNF)(۱۹) ، فاکتورمهارکننده لوسمی(LIF)(۱۹) ، فاکتوررشد فیبروبلاستی(FGF)(۱۹) و فاکتور سلول بنیادی(SCF)(۲۰) بررسی شده‌اند،

1 Spermatogonial stem cells

نویسنده مسئول: پیمان رحیمی‌فیلی
پست الکترونیک: *drp.rahimi@gmail.com*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

مشخص شد که تمامی این عوامل در رشد و تکامل SSCs در محیط آزمایشگاه نقش حیاتی دارند. ملاتونین هورمون مهمی با خواص آنتی اکسیدانی، پاسخ ایمنی، برقراری ارتباطات سلولی و حفاظت از بافت عصبی است(۲۱). در خلال متابولیسم فیزیولوژیک طبیعی سلول، گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر(ROS) بویژه در میتوکندری تولید می‌شود که اثر مخربی بر ارتباطات سلولی دخیل در تنظیم تکثیر و بقای سلول دارد(۲۲). ملاتونین نقش مهمی در کاهش تولید ROS سلولی و مهار جهش‌های بالقوه DNA ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو دارد(۲۳). ماهیت آمفی فیلیک ملاتونین نقش مهمی در محافظت گامت‌ها و رویان‌های پستانداران در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و مرگ سلولی در محیط کشت دارد(۲۴). گیرنده‌های ملاتونین (MT۱, MT۲) گیرنده‌های متصل شونده به پروتئین G هستند و ظهور این گیرنده‌ها در سلول‌های سرتولی رت، موش، گوسفند، گاو و انسان(۲۸-۲۵) و همچنین در اسپرماتوزوئید و اسپرماتوسیت(۳۱-۲۹) گزارش شده است. با این حال، اثر ملاتونین به عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده تولید مثل بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به خوبی مشخص نشده است. از طرفی با توجه به اهمیت گونه دامی گوسفند در تولید حیوان‌های مدل، تراریخته و داروهای نوترکیب انسانی ضرورت انجام این مطالعه آشکار می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اضافه کردن ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان به محیط کشت و تعیین اثر آن روی تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بره در محیط کشت بود. مطالعه حاضر در باره زمانی تیر ماه تا شهریور ۱۳۹۶ انجام شد. نمونه‌گیری از کشتارگاه صنعتی بیستون و کشت سلول‌ها در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد.

مواد و روش‌ها:

مطالعه حاضر تجربی است. تمامی مواد و آنزیم‌های مصرفی در این مطالعه ساخت شرکت Sigma کشور آمریکاست. در موارد غیر از این، شرکت سازنده ذکر شده است.

نمونه‌گیری و انتقال نمونه:

نمونه‌های بیضه از بره‌های نابالغ دو تا چهار ماهه از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان کرمانشاه تهیه و در کنار یخ در عرض کمتر از دو ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی منتقل شد. در آزمایشگاه بیضه از اسکروتوم خارج و متعاقب جدا کردن اپی دیدیم، بیضه چند بار شست‌وشو و به کمک قیچی استریل ۱۰ گرم از بافت پارانشیم بیضه جدا و به داخل لوله فالکون (SPL, South Korea) حاوی ۱۰ میلیلیتر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, UK) محتوی ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنیسیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco, Paisley, UK) منتقل و هر کدام از لوله‌ها سه نوبت و هر بار به مدت یک دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ (Hettach, Germany) شد(۳۲).

جداسازی سلول‌های بنیادی:

برای استخراج سلول‌های بنیادی بیضه از روش Aponte و همکاران (۳۳) به شرح زیر استفاده شد.

هضم مکانیکی بافت پارانشیم بیضه:

بافت پارانشیم بیضه پس از شست‌وشو به داخل پتری دیش استریل منتقل و با استفاده از قیچی استریل به طور کامل قطعه قطعه شد.

هضم آنزیمی بافت پارانشیم بیضه:

در مرحله اول هضم آنزیمی به پتری دیش‌های حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و تریپسین (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و پتری دیش‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. برای افزایش بازدهی تاثیر آنزیم‌های مذکور بر هضم بافت پارانشیم بیضه هر ۱۰ دقیقه یک‌بار عمل پیپتاژ انجام شد و برای ارزیابی هضم آنزیمی و روند باز شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر هر ۱۰ دقیقه یک بار بافت پارانشیم بیضه در زیر میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX۷۱ضد inverted microscope) بررسی شد. نمونه پس از مرحله اول هضم آنزیمی سه مرتبه با دور ۱۴۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله دوم آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دزوکسی ریبو نوکلئاز (۵درصد میلی گرم بر میلی‌لیتر) به نمونه اضافه شد و پتری دیش‌ها به مدت ۱۵ تا۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. برای جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعه‌های باقی‌مانده، لوله‌های فالکون در دور ۸۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. برای حذف سلول‌های میوئید، تعلیق سلولی مذکور از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرونی استریل عبور داده شد. در ادامه برای رسوب سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی لوله‌های فالکون در دور ۸۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و برای کشت استفاده شد.

شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی با رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی:

برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه نشانگر PGF۹.۵ از روش حیدری و همکاران (۱۳) استفاده شد. پس از جداسازی سلول‌ها بلوک مکان غیر اختصاصی به وسیله avidin/bioyin و بلوک مکان غیر اختصاصی دیگر با قرار دادن اسلاید در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. سپس اسلاید با آنتی بادی اولیه غیرکونژوگه خرگوش علیه نشانگر PGF۹.۵ (Dako, Carpinteria, USA) با رقت ۱:۱۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. مقطع پس از سه مرتبه شست‌وشو با TBS/BSA (هر بار پنج دقیقه) در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه در تماس با آنتی بادی ثانویه (Avicenna, Biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Research Institute, Iran) قرار گرفت و با TBS/BSA شست‌وشو شد. در ادامه مقطع به مدت ۳۰ دقیقه در تماس با (HPR-conjugted streptavidin (Biosource, USA با رقت ۱:۵۰۰ قرار داده شد و با TBS/BSA شست‌وشو شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی آمینو بنزیدین (Roche, Germany) به مقطع به مدت ۸ تا۱۰ دقیقه، رنگ نمایان شد. سپس اسلاید با آب مقطر کاملا تمیز شد و با هریس هماتوکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی و با آب مقطر شست‌وشو شد. در ادامه، اسلاید با الکل آبگیری و با گزیلول شفاف و با انتتال (Merck, Germany) پوشانده شد. در انتها، سطح اسلاید به وسیله گلیسرول و PBS پوشانده شد و زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

شمارش و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها:

وضعیت حیات سلول‌ها به کمک رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK) ارزیابی شد. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط و به مدت چند دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس با شمارش ۱۰۰ سلول به طور تصادفی، تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین و بر این اساس درصد حیات نمونه محاسبه شد.

انتقال سلول‌های جدا شده به پلیت و افزودن ملاتونین:

پس از شمارش سلول‌ها با لام هماسیتومتر، در هر گوده از پلیت کشت چهارخانه‌ای (TPP, Switzerland) ۵۰ هزار سلول کشت داده شد.

گوده شماره۱، گروه شاهد: محیط پایه شامل تعلیق سلولی در ۵۰۰ میکرولیتر DMEM حاوی یک درصد FBS و آنتی‌بیوتیک(پنی‌سیلین، استرپتومایسین به ترتیب با غلظت یک واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

گوده شماره۲: ۵۰۰ میکرولیتر محیط پایه حاوی یک میکرومول ملاتونین(Melatonine, Sigma, Germany)

گوده شماره۳: یک نانومول بر میلی‌لیتر ملاتونین.

سپس پلیت کشت به مدت ۱۰ روز درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شد. تعویض محیط کشت هر ۷۲ ساعت یک‌بار انجام شد.

تعیین تعداد و مساحت کلونی‌های سلولی:

ارزیابی تعداد و مساحت کلونی سلول های اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ کشت به کمک میکروسکوب معکوس مجهز به عدسی مدرج استفاده شد. برای محاسبه مساحت کلونی بر حسب میلی‌متر مربع از نرم افزار Image J (version ۱,۲۴۰; National Institutes of Health , ,Bethesda , MD, USA) استفاده شد(۳۲).

روش تجزیه وتحلیل آماری:

نتایج حاصل از پنج بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده از لحاظ نرمال بودن ارزیابی شدند. سپس روی داده‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

نرمال آزمون آنالیز واریانس انجام شده و اثر غلظتهای مختلف ملاتونین، طول مدت کشت و اثر متقابل ملاتونین × طول مدت کشت بررسی شد. مقایسه تعداد و مساحت کلونیها در تیمارهای مختلف با آزمون تکمیلی دانکن در سطح معنادار (P<۰/۰۵) انجام شد.

مدل آماری استفاده شده به صورت زیر است : آنالیز تکرار شده در قالب طرح کاملا تصادفی

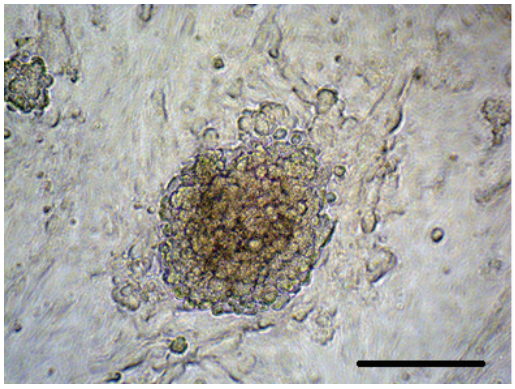
μ = subject (treatment) + time +treatment*time

یافته‌ها:

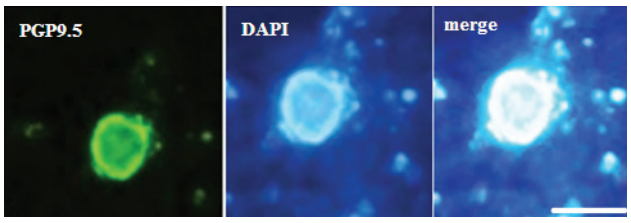
درصد زنده‌مانی سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی ۱/۸±۸۵/۱ به دست آمد.

شکل‌گیری کلونی‌های اسپرماتوگونی:

با گذشت زمان سلولهای اسپرماتوگونی موجود در داخل پلیت، کلونی تشکیل داده و با رشد خود بر تعداد و اندازه کلونیها افزوده میشود. در شکل شماره یک کلونی اسپرماتوگونی در روز دهم کشت نشان داده شده است. پس از پایان دوره کشت با استفاده از آزمون ایمنوفلورسانت بیان آنتی ژن PGP۹,۵ در کلونی‌ها تایید شد (شکل شماره۲) .



شکل۱- کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی در روز دهم پس از کشت. میله: ۱۰۰ میکرومتر



شکل۲- رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانت علیه آنتی‌ژن PGP۹,۵. هسته سلول‌های اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI مشخص شده است.میله: ۴۰ میکرومتر.

تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی

همان‌طور که در جدول شماره یک مشاهده میشود میانگین تعداد کلونی‌ها در روز هفتم پس از کشت در گروه میکرو(۵/۴۳±۱۱۳/۴) به طور معناداری از گروه شاهد (۲۵/۵۷±۷۳/۶) بیشتر است (P<0. 05)، ولی میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه نانومول با هیچ‌کدام از دوگروه دیگر اختلاف معناداری ندارد (P>0. 05). همچنین میانگین کل تعداد کلنی در گروه میکرو(۶۷/۹۶±۱۱۱/۳) به طور معناداری از گروه شاهد (۳۳/۹۸±۸۰/۳) بیشتر است(P<0. 05)، ولی میانگین کل تعداد کلونی‌ها در گروه نانومول با هیچ‌کدام از دوگروه دیگر اختلاف معناداری ندارد (P>0. 05). میانگین و میانگین کل تعداد کلونی‌ها در روزهای مختلف کشت (روزهای ۴، ۷ و ۱۰) با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند.

جدول ۱- تعداد کلونیهای اسپرماتوگونی (میانگین ± خطای استاندارد) در گروههای مختلف آزمایشی و روزهای مختلف پس از کشت

		گروه‌های آزمایشی	
روز پیگیری	شاهد	میکرومول	نانومول
۴	۸۱±۹/۶	۱۰۲/۵±۶/۵	۱۰۱/۵±۱۴/۲
۷	۸۳/۲۵±۶/۵ [b]	۱۱۳/۵±۴/۴ [a]	۹۲/۷۵±۶/۲ [ab]
۱۰	۸۶/۷۵±۲/۶	۱۱۹±۷/۹	۱۱۴/۵±۱۵/۳

a و b: مقادیر متفاوت در هر ردیف با حروف مختلف از نظر آماری اختلاف معناداری دارند (P<۰/۰۵)

مساحت کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی:

همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، مجموع مساحت کلونی‌ها در روز هفتم پس از کشت در گروه میکرومول (۰/۰۵۷ ± ۱/۰۳۵) به طور معناداری از گروه شاهد(۰/۰۶ ± ۰/۷۱۶) بیشتر است(P<0. 05)، ولی مجموع مساحت کلونی‌ها در گروه نانومول با هیچ‌کدام از دوگروه دیگر اختلاف معناداری ندارد (P>0. 05). همچنین میانگین کل مساحت کلونی‌ها در روز۱۰ پس از کشت (۰/۰۶ ± ۰/۹۹۹) به طور معناداری از روز چهارم پس از کشت (۰/۰۶۳ ± ۰/۸۱۵) بیشتر بوده، ولی از این نظر اختلاف معناداری بین روز هفت پس از کشت و روزهای چهار و ۱۰ پس از کشت وجود نداشت.

جدول ۲: مجموع مساحت(mm^2) کلونیهای اسپرماتوگونی (میانگین ± خطای استاندارد) گروه‌های آزمایشی مختلف در روزهای مختلف پس از کشت

		گروه‌های آزمایشی	
روز پیگیری	شاهد	میکرومول	نانومول
۴	۰/۶۹۴±۰/۸	۰/۹۱۲±۰/۰۴	۰/۸۳۹±۰/۱۶۱
۷	۰/۷۱۶±۰/۱ [b]	۱/۰۳۵±۰/۱ [a]	۰/۸۲۱±۰/۰۷۳ [ab]
۱۰	۰/۸۴۴±۰/۱	۱/۰۸۲±۰/۰۴	۱/۰۷۲±۰/۱۲۹

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

بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد اضافه کردن ملاتونین به میزان یک میکرومول به محیط کشت SSCs سبب افزایش معنادار تعداد و مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روز هفتم پس از کشت می‌شود (P<۰/۰۵).

میانگین درصد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی زنده بلافاصله بعد از جداسازی در مطالعه حاضر ۱/۸±۸۵/۰۵ درصد بود که رقمی قابل قبول است. در مطالعه‌های دیگر که در گونه‌های مختلف انجام شده، درصد حیات سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی را ۱/۲±۸۵/۳ ، ۲/۲±۸۹/۲۵ و ۳/۶۳±۸۶/۷۷ درصد گزارش کردند(۳۲و ۳۵- ۳۴). نتایج مطالعه حاضر از نظر درصد حیات سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی با نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

مطالعه‌های فوق همخوانی دارد که بیانگر اجرای صحیح تکنیک جداسازی و انتخاب دوز صحیح آنزیم‌هاست.

در مطالعه حاضر برای شناسایی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتیژن PGP۹.۵ استفاده شد و دیده شد که سلول‌های جدا شده از بیضه این نشانگر پروتئینی را بیان کردند، بنابراین می‌توان از این نشانگر برای شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی در گوسفند بهره برد. در چندین مطالعه از آنتیبادی علیه آنتیژن PGP۹.۵ برای شناسایی ایمنوسیتوشیمی و ایمنوهیستوشیمی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A در گونههای مختلف از جمله گوسفند (۳۶)، انسان (۳۷)، موش (۳۸) و بز (۱۳) استفاده شده است.

Bowen Niu و همکاران نشان دادند افزودن یک میکرومول ملاتونین به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در مقایسه با افزودن یک نانومول، منجر به افزایش بیشتر تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی شد(۱). در جدیدترین مطالعه، شادان و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثر آزمایشگاهی ملاتونین بر کلونیزاسیون سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد پرداختند(۳۹). در آن مطالعه تعداد و قطر کلونی‌های SSC در روزهای ۷ و ۱۴ کشت و بیان Ig۴، Plzf و C-kit با استفاده ازreal-time PCR در انتهای دوره کشت بررسی شد. در این مطالعه میزان زنده ماندن سلول‌های کشت شده در حضور ملاتونین (۱۰۰ میلی مولار ملاتونین) به طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بود و تعداد و قطر کلونی‌ها در سلول‌های تیمار شده با ملاتونین همانند نتایج مطالعه حاضر افزایش یافت. این محققان ثابت کردند که اضافه کردن ملاتونین به میزان ۱۰۰ میکرومول به محیط کشت سبب کاهش بازرتولید ROS و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود. در برخی از مطالعه‌ها اضافه کردن ملاتونین به محیط کشت سلول‌هایی همچون اووسیت و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با کاهش استرس سلولی ناشی از ROS توام بوده است(۴۱-۴۰). غلامی و همکاران در یک سری تحقیق‌ها در باره اثر ملاتونین روی پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به موش‌های مبتلا به آزواسپرمی نشان دادند که ملاتونین سبب بهبود ساختار بافت بیضه می‌شود(۴۲). همین محققان در مطالعه‌ای دیگر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نشان دادند که اضافه کردن ملاتونین سبب تکثیر سلول‌های طبیعی و آپوپتوز سلول‌های آسیب دیده می‌شود(۴۳). ملاتونین محرک آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل سوپراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز و مهارکننده لیپواکسیژناز است. ملاتونین با تثبیت غشاهای میکروزومی، سبب مقاومت در برابر آسیب اکسیداسیونی می‌شود. ملاتونین در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع قوی‌تر از ویتامین E، مانیتول، گلوتاتیون دو برابر کارآمدتر از استرولوکس است(۲۱). Bustos-Obregon و همکاران به بررسی نقش محافظتی ملاتونین در اسپرماتوژنز موش تیمار شده توسط آرسنیت سدیم پرداختند. این محققان تغییر در وزن بیضه و اندازه‌گیری‌های هیستوپاتولوژیکی، مورفومتریک، بیان آنزیم‌های COX-۲ و آنزیم گیرنده آندروژن (AR) و سطح پراکسیداسیون لیپید را ارزیابی کردند. تیمار آرسنیک به تنهایی به کاهش قطر لوله و بیان AR و افزایش منطقه بینابینی، قطر لومینال، سطح بیان COX-۲ و پراکسیداسیون لیپید منجر شد، اما تیمار همزمان آرسنیک و ملاتونین سبب کاهش نسبی دژنراسیون سلول‌های بنیادی و میزان بیان AR و بهبود پارامترهای هیستوپاتولوژیک بیضه شد(۴۴). اثبات تایید شده که اضافه کردن ملاتونین به محیط کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز سبب تحریک تولید GDNF توسط سلول‌های سرتولی و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود(۱). GDNF یک عضو دور از خانواده رشد دهنده فاکتور β است (β -TGF) و یک عامل مهم نوروتروف در تنظیم بقا و تمایز سلول‌های عصبی است. با توجه به اهمیت GDNF در مطالعه‌های آزمایشگاهی و درون تنی در چند سال گذشته، GDNF به عنوان یک عامل ضروری برای حفظ کشت طولانی SSC و تکثیر و خودسازی آن در مدل‌های آزمایشگاهی مورد توجه قرار گرفته است(۴۵). می‌توان از تعیین تعداد و قطر کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به عنوان یک معیار مرفولوژیکی در مطالعه‌های آزمایشگاهی استفاده کرد(۴۶).

Aponte و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی اثر فاکتورهای رشد FGF۲، GDNF، EGFو LIF به ترتیب با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های بنیادی گاو در طول مدت دو هفته کشت پرداختند و مشاهده کردند که در گروهی که تمامی این فاکتورهای رشد به صورت ترکیبی استفاده شد، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A به صورت معناداری ازگروه شاهد و سایر گروه‌هایی که تک تک فاکتورهای رشد را اضافه کردند، بیشتر بود. همچنین بیشترین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A بین گروه‌هایی که تک تک فاکتورهای رشد به صورت مجزا به آن‌ها اضافه کردند، مربوط به گروه دریافت کننده GDNF بود. معتقدند حضور تعداد محدودی سلول سوماتیک درمحیط کشت می‌تواند از طریق ترشح سایتوکین‌ها به تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی کمک کند(۳۳). در ضمن نشان دادند که ملاتونین می‌تواند ترشح GDNF را در سلول‌های سرتولی افزایش دهد. GDNF به RET-GFRa۱ متصل می‌شود و به فسفریلاسیون مسیرهای AKT و ERK برای تنظیم تکثیر و خودنوزایی SSCs منجر می‌شود(۱). با توجه به مطالعه‌های بالا و حضور سلول‌های سرتولی در محیط کشت ما و ترشح GDNF توسط این سلول‌ها و نقش مهم GDNF در فرآیند اسپرماتوژنز و تاثیر بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، افزایش تعداد کلونی‌ها می‌تواند به احتمال به دلیل اثر ملاتونین بر سلول‌های سرتولی باشد. ملاتونین با اثر ضد آپوپتوزی، آنتی اکسیدانی و تاثیر بر گیرنده سلول‌های سرتولی و ترشح GDNF به احتمال می‌تواند بر افزایش رشد وخود نوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقش مثبت و قابل توجهی داشته باشد. و این اثر افزایشی وابسته به دوز و از طریق سلول‌های سرتولی امکان پذیر است.

در تمام گروه‌های آزمایشی تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی از روز چهار تا روز۱۰ به طور غیر معنادار افزایش یافت. همچنین میانگین کل مساحت کلونی‌ها در روز۱۰ پس از کشت به طور معناداری از روز چهارم پس از کشت بیشتر بود. شهبازی و همکاران به بررسی اثر غلظت‌های متفاوت ژل رویال بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بره در محیط آزمایشگاه پرداختند و نشان دادند که تعداد و مساحت کلونی‌ها در تمامی گروه‌ها همانند نتایج مطالعه حاضر مدام در حال افزایش بود(۴۷). کروجی و همکاران نشان دادند که همکشتی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی با سلول-های سرتولی سبب افزایش تعداد کلونیها با گذشت زمان میشود(۴۸). در مطالعه تاجیک و همکاران (۲۰۱۳) افزایش تعداد کلونی‌ها تا روز ۱۰ مدت کشت مشاهده شد، ولی بعد از آن تا پایان زمان کشت (روز شانزدهم) کاهش یافت. همچنین مساحت کلونی‌ها تا روز هفتم افزایش داشت و بعد از آن دچار افت و خیز شد(۴۹). در مطالعه غلامپور وهمکاران نیز تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. همچنین در این مطالعه افزایش مساحت کلونی‌های روز۱۰ نسبت به روز چهار معنادار بود(۵۰) مزایای استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بخصوص گونه‌های دامی در تحقیق‌ها عبارت است از: ۱- استحصال و استخراج این سلول‌ها بسیار راحت است. به عنوان مثال؛ در مورد دام اهلی می‌توان با مراجعه به کشتارگاه و اخذ بافت بیضه بدون نگرانی در مورد بحث اخلاق پزشکی و رفاه و آسایش حیوان‌ها نمونه را به دست آورد. ۲- با تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه و پیوند آن‌ها به مدل آزواسپرمی می‌توان باروری را دوباره در بیماران سرطانی که تحت رادیوتراپی بوده‌اند، برگرداند و همچنین می‌توان از این تکنیک در حفظ حیوان‌های در حال انقراض بهره جست ۳- از آنجا که اسپرماتوزوا تنها سلول بدن است که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کند، می‌توان با دستکاری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوان ترانسژن طراحی کرد.

از جمله محدودیت استفاده از این سلول‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱- تعدادشان در بدن کم است ۲- به دلیل اینکه جزو سلول‌های بنیادی بالغ هستند، پس از چند مرحله کشت دچار پیری می‌شوند. ۳- جداسازی و کنترل مراحل کشت آن سخت‌تر از سلول‌های بنیادی جنینی است. (۵۱).

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد افزودن ملاتونین به محیط کشت تاثیر مثبتی در القای کلونیزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد و اضافه کردن آن به محیط کشت با دوز کلونی زایی مورد استفاده در این مطالعه (یک میکرومول) توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی:

این مقاله استخراج شده از رساله دکتری عمومی دامپزشکی است و تمامی هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه رازی تامین شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

منـابع:

1. Niu B, Li B, Wu C, Wu J, Yan Y, Shang R, Bai C, Li G, Hua j. Melatonin promotes goat spermatogonia stem cells (SSCs) proliferation by stimulating glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production in Sertoli cells. Oncotarget. 2016;7:77532-42.

2. 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;17:708–17.

3. Navid S, Abbasi M, Hoshino Y .The effects of melatonin on colonization of neonate spermatogonial mouse stem cells in a three-dimensional soft agar culture system. Stem Cell Res Ther. 2017; 8:233.

4. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA. 2009;302:2127–34.

5. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. Reprod Biol Endocrinol. 2011;9:141.

6. Chen Z, Niu M, Sun M, Yuan Q, Yao C, Hou J et al.Transdifferentiation of human male germline stem cells to hepatocytes in vivo via the transplantation under renal capsules. Oncotarget. 2017;8:14576-92.

7. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AM In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. JAMA. 2011; 305: 2416–18.

8. Ramathal C, Angulo B, Sukhwani M, Cui J, Durruthy-Durruthy J, Fang F, et al. DDX3Y gene rescue of a Y chromosome AZFa deletion restores germ cell formation and transcriptional programs. Sci Rep. 2015; 5: 15041.

9. Helsel AR, Oatley MJ, Oatley JM. Glycolysis-Optimized Conditions Enhance Maintenance of Regenerative Integrity in Mouse Spermatogonial Stem Cells during Long-Term Culture. 2017;8:1430-41.

10. Hamra FK, Richie CT, Harvey BK. Long Evans rat spermatogonial lines are effective germline vectors for transgenic rat production. Transgenic Res. 2017; 26: 477-89.

11. Loppion G, Crespel A, Martinez AS, Auvray P, Sourdaine P. Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, Scyliorhinus canicula L. Cell Tissue Res. 2008; 33: 533–42.

12. 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, 85–94.

13. 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: 1029-38.

14. Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol reprod. 1999; 61: 225-30.

15. Creemers LB, Den Ouden K, Van Pelt AM, De Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction. 2002; 124: 791-99

16. Kanatsu Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. Biol reprod. 2005; 72: 985-91.

17. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. Andrologia. 2012;44:41-55.

18. Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-Term Culture and Transplantation of Murine Testicular Germ Cells. J Androl. 2003; 24: 661-9.

19. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biol Reprod. 2003;69:612–6.

20. Lee J, Boekelheide K, Blanchard KT. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedioneinduced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression 1. Endocrinology. 1998;139(1):236–44.

21. Anisimov VN, et al. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. Biochim Biophys Acta. 2006;1757(5):573–89.

22. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell Signal. 2012;24(5):981–90.

23. He C, et al. Melatonin to ameliorate its function and improve mitochondria synthesize mice oocyte's quality under in vitro conditions. Inter J Mol Sci.2016;17(6):939.

24. Cruz MHC, et al. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. Anim Reprod Sci. 2014;145(3):150–60.

25. Yang W-C, et al. Melatonin regulates the development and function of bovine sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. Anim Reprod Sci. 2014;147(1):10–6.

26. Chabra A et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. Hum Exp Toxicol. 2014;33(2):185-95.

27. Liu Y, et al. Melatonin modulates acute testicular damage induced by carbon ions in r mice. Pharmazie. 2009;64(10):685.

28. Deng SL, et al. Melatonin promotes development of haploid germ cells from early developing spermatogenic cells of Suffolk sheep under in vitro condition. J Pineal Res. 2016;60(4):435–47.

29. Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 2012; 24:953-961.

30. Liu C, Gao P, Xu SC, Wang Y, Chen CH, He MD, Yu ZP, Zhang

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 20:38 +0330 on Friday December 4th 2020

L, Zhou Z. Mobile phone radiation induces mode-dependent DNA damage in a mouse spermatocyte-derived cell line: a protective role of melatonin. Int J Radiat Biol. 2013; 89:993-1001.

31. Yang WC, Tang KQ, Fu CZ, Riaz H, Zhang Q, Zan LS. Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. Anim Reprod Sci. 2014; 147:10-16.

32. Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA. [Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro]. Feyz. 2016; 20 :205-213. (Persian)

33. Aponte, P.M., T. Soda, K.J. Teerds, S.C. Mizrak, H.J. van de Kant and D.G. de Rooij, 2008. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. Reproduction 136, 543-557.

34. 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: 12740-12745.

35. Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. Int J Nanomedicine. 2013;8:4563-76.

36. Rodriguez-Sosa, J.R., H. Dobson and A. Hahnel, 2006. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. Theriogenology 66, 2091-2103.

37. 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): 1104-1112.

38. 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.

39. Shadan Navid, Mehdi Abbasi and Yumi Hoshino. The effects of melatonin on colonization of neonate spermatogonial mouse stem cells in a three-dimensional soft agar culture system. Curr Stem Cell Res Ther (2017) 8:233

40. Tan SS, et al. Melatonin protects human adipose-derived stem cells from oxidative stress and cell death. Archive Plastic Surg. 2016;43(3):237–41.

41. Maitra SK, Hasan KN. The role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. Front Endocrinol. 2016; 7:38.

42. Gholami M, et al. Melatonin improves spermatogonial stem cells transplantation efficiency in azoospermic mice. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(2):93.

43. Gholami M, et al. Effect of melatonin on the expression of apoptotic genes in vitrified-thawed spermatogonia stem cells type A of 6-day-old mice. Iran J Basic Med Sci. 2013;16(8):906–9.

44. Bustos-orbegon, E; Poblete, D; Catriao, R; Fernandes, FH. 2013.Protective role of melatonin in mouse spermatogenesis induced by sodium arsenite. Int. J. Morphol., 31(3):849-856,

45. Bahadorani M, Hosseini SM, Abedi P, Abbasi H, Nasr- Esfahani MH. 2015. Glial cell line-derived neurotrophic factor in combination with insulin-like growth factor 1 and basic fibroblast growth factor promote in vitro culture of goat spermatogonial stem cells. Growth Factors.; 33:181-191.

46. Aliakbari F, et al. Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. Cell Reprogram. 2016;18(2):87–95.

47. Shahbazi M, Moghaddam AA, Rahimi-Feyli P. Effect of royal jelly from nurse bees on In vitro culture of spermatogonia stem cells from pre-pubertal lambs. Onl J Vet Res. 2017: 21(8):484-489.

48. Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. Int J Reprod BioMed 2007; 5(3): 109-115.

49. Tajik P, Narenji-Sani R, Moezifar M, Yousefi MM, Movahedin 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): 901-906.

50. Gholampour Y, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S., Effect of gonadotropin releasing hormone on In Vitro caprine spermatogonial stem cell proliferation. Onl J Vet Res 2019; 23 (5): 414-430.

52. Honaramooz, A and Yang, Y. Recent Advances in Application of Male Germ Cell Transplantation in Farm Animals. Vet Med Inter. 2011; 2011: 1-9.

www.SID.ir