

Original Article

Evaluation of the Effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) on Survival and Colonization of Caprine Spermatogonial Stem Cells During In Vitro Culture

Hamed Kadivar¹, Peyman Rahimi-Feyli², Aliasghar Moghaddam²,
Samad Alimohammadi^{3*}

¹School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

²Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

³Department of Basic Sciences, Section of Physiology, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

***Corresponding Author:**
Samad Alimohammadi;
Department of Basic Sciences, Section of Physiology, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

Email:
s.alimohammadi@razi.ac.ir,
samad.am84@gmail.com

Received: 24 Dec, 2019
Accepted: 3 Feb, 2020

Abstract

Background and Objectives: Spermatogonial stem cells are specific cells that have the ability of self-renewal and differentiation. These cells play an essential role in maintaining spermatogenesis and fertility. In this regard, the present study was performed with the purpose of investigating the effect of different concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) on *in vitro* colony formation of caprine spermatogonial stem cells.

Methods: Spermatogonial cells, were isolated from prepubertal goat testis using two-step enzymatic digestion. Then, isolated cells were cultured for 10 days in four groups. In the control group, simple culture of spermatogonial cells was performed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 1% antibiotics and 5% FBS (Fetal Bovine Serum). In the treatment groups 1, 2, and 3, different concentrations of follicle stimulating hormone (5, 10, and 20 IU/ml), was added to the culture medium, respectively. The culture media were changed every 72 hours. Identification of cells was confirmed by immunocytochemical staining against PGP9.5 antigen. Immediately after isolation, percentage of cells viability, surface area, and number of colonies formed on 4th, 7th and 10th days after the culture, were evaluated using an inverted microscope. Data were analyzed using one way ANOVA test.

Results: The findings indicated that viability rate of Spermatogonial stem cells after isolation was $89.4 \pm 2.32\%$. The effect of FSH on the formation of spermatogonial cells colonies was dose dependent. Doses of 5 and 10 IU/ml increased the surface area and number of the spermatogonial cell derived colonies but dose of 20 IU/ml reduced colonies formation ($p < 0.05$).

Conclusion: FSH can provide an appropriate culture medium for the study of spermatogonial cells *in vitro*.

Keywords: Spermatogenesis; Caprine; Spermatogonial cells; Follicle stimulating hormone.

DOI: 10.29252/qums.13.12.1

بررسی اثر هورمون محرک فولیکولی بر بقا و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در کشت آزمایشگاهی

حامد کدیوریان^۱، پیمان رحیمی فیلی^۲، علی اصغر مقدم^۳، صمد علی محمدی^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs: Spermatogonial Stem Cells) سلول‌هایی خاص هستند که دارای توانایی خودنوسازی و تمایز می‌باشند. این سلول‌ها نقشی اساسی در حفظ روند اسپرماتوژنز و باروری دارند. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمون محرک فولیکولی (FSH: Follicle Stimulating Hormone) بر کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در محیط آزمایشگاه انجام شد.

روش بررسی: سلول‌های اسپرماتوگونی طی دو مرحله هضم آنزیمی از بیضه بز نابالغ جداسازی شدند. سلول‌های استخراج‌شده به مدت ۱۰ روز در چهار گروه کشت داده شدند. برای گروه کنترل کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) انجام شد. در گروه‌های تیمار ۱، ۲ و ۳ نیز غلظت‌های مختلف FSH (۵، ۱۰ و ۲۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) به ترتیب به محیط کشت اضافه گردید. تعویض محیط‌های کشت هر ۷۲ ساعت انجام شد. ماهیت سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 تأیید گردید. بلافاصله پس از جداسازی، درصد زنده‌مانی سلول‌ها، مساحت و تعداد کلونی‌های تشکیل‌شده در روزهای چهارم، هفتم و دهم پس از کشت به وسیله میکروسکوپ معکوس ارزیابی شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که میزان زنده‌مانی سلول‌های اسپرماتوگونی پس از جداسازی 89.4 ± 2.32 درصد بوده است. اثر FSH در تشکیل کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی وابسته به دوز بود. دوزهای ۵ و ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر، مساحت و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی را افزایش داد؛ اما دوز ۲۰ واحد بر میلی‌لیتر موجب کاهش تشکیل کلونی‌ها گردید ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: FSH می‌تواند محیط کشت مناسبی را به‌منظور مطالعه سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: اسپرماتوژنز؛ بز؛ سلول‌های اسپرماتوگونی؛ هورمون محرک فولیکولی.

^۱دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

^۲گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

^۳گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

صمد علی محمدی؛ گروه علوم پایه، بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

S.alimohammadi@razi.ac.ir,
Samad.am84@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Kadivarian H, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Evaluation of the Effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) on Survival and Colonization of Caprine Spermatogonial Stem Cells during in Vitro Culture. Qom Univ Med Sci J 2020;13(12):1-12. [Full Text in Persian]

مقدمه

اسپرماتوژنز فرایندی پیچیده و برنامه‌ریزی شده است که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به اسپرم تبدیل می‌شوند. SSCs در غشای پایه لوله‌های منی‌ساز که از توانایی تجدید ذخایر و تمایز سلول‌های عملکردی برخوردار هستند، قرار گرفته است. با توجه به این توانایی، SSCs می‌تواند پس از آسیب به بیضه به دلیل قرارگرفتن در معرض مواد سمی، مواد شیمیایی و اختلالات فیزیکی، اسپرماتوژنز را بازیابی کند (۱). SSCs سلول‌های بنیادی منحصر به فردی هستند که قادر به انتقال اطلاعات ژنتیکی از والدین به زاده‌ها می‌باشند؛ از این رو این سلول‌ها ابزاری مهم در ژنتیک حیوانات، تولید دام‌های تراریخته و تولیدمثل محسوب می‌شوند (۲). SSCs با استفاده از خاصیت خودنوزایی خود در محیط آزمایشگاه توانایی تقسیم‌شدن را حفظ می‌کنند. بسیاری از اطلاعات درباره چگونگی تنظیم و عملکرد این سلول‌ها به‌واسطه کشت این سلول‌ها در شرایط مختلف آزمایشگاهی و مطالعه روند تکثیر و تمایز آن‌ها به‌دست‌آمده است (۳). مطالعات در مورد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌دلیل عدم وجود نشانگرهای اختصاصی جهت شناسایی آن‌ها، تعداد کم این سلول‌ها پس از استخراج و همچنین دانش محدود در زمینه نیازهای غذایی و فاکتورهای رشد ضروری، با مشکلاتی همراه می‌باشد (۴). فهم دقیق مکانیسم‌های مولکولی دخیل در فعالیت SSCs و سرنوشت این سلول‌ها اهمیت ویژه‌ای در خصوص اسپرماتوژنز و باروری جنس نر دارد (۵).

بنابراین تاکنون مطالعات مختلفی در جهت تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت صورت گرفته است. اهداف این مطالعات تکثیر و افزایش تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت با استفاده از عوامل مختلفی مانند ملاتونین (۶)، ویتامین C (۷)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) (۸) و تستوسترون (۱۰) بوده است. هورمون‌هایی از قبیل GnRH (۹) و تستوسترون (۱۰) بوده است. کل فرایند رشد از سلول‌های اسپرماتوگونی تا اسپرماتوزوآ در داخل بافت پوششی لوله‌های منی‌ساز انجام می‌شود. این امر از طریق تعامل و ارتباط نزدیک سلول‌های زایا با سلول‌های سرتولی سوماتیک پشتیبانی می‌شود (۱۱). در طی فرایند اسپرماتوژنز، سلول‌های سرتولی به‌منظور تنظیم مناسب تکثیر و تمایز SSCs،

انواع بسیاری از سایتوکاین‌ها و فاکتورها را ترشح می‌کنند (۱۲). به‌عنوان مثال فاکتور نوروتروفیک مشتق‌شده از سلول‌های گلیال (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) (GDNF) و فاکتور رشد فیبروبلاست ۲ (FGF2) (Fibroblast Growth Factor-2) بر تکثیر و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اثر دارد. در مقابل ترشح فاکتورهای ضروری مانند فاکتور سلول بنیادی (SCF)، پروتئین ریخت‌شناسی استخوان (BMP4) (Bone Morphogenetic Protein 4) و اکتیوین A (Activin A) باعث پیشبرد تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شوند (۱۳).

یکی از هورمون‌های اصلی مرتبط با اسپرماتوژنز، هورمون محرک فولیکولی (FSH) است که علاوه بر افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، نقش تعیین‌کننده‌ای در بقای سلول‌های زایا ایفا می‌کند (۱۴). FSH گلیکوپروتئینی است که توسط غده هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود و همراه با هورمون لوتینه‌کننده (LH) (Luteinizing Hormone) نقش اصلی در تولیدمثل پستانداران دارد (۱۵). FSH به‌طور مستقیم بر غدد جنسی در هر دو جنس عمل می‌کند. این هورمون به گیرنده خود که جزء گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G است و روی سطح سلول‌های سرتولی قرار دارد متصل‌شده و آبشاری از حوادث مولکولی را آغاز می‌کند که با فعال‌شدن مسیرهای خاص سیگنالینگ آغاز می‌شود و با بیان محصولات ژنی پایان می‌یابد (۱۶). تا کنون مطالعات مختلفی با هدف ارزیابی تأثیر FSH بر القاء کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گوساله، گوسفند، موش و رت در محیط آزمایشگاه صورت گرفته است. نتایج مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که FSH نقش مهمی در افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی و نیز میزان زنده‌ماندن این سلول‌ها دارد (۱۷، ۸-۲۰). همچنین با توجه به مطالعات انجام‌شده در ارتباط با بافت بیضه انسان در محیط کشت، گزارش شده است که FSH و تستوسترون به‌عنوان فاکتورهای زنده‌مانی موجب بقای مطلوب و تمایز سلول‌های زایا و سرتولی جداسازی‌شده از طریق کاهش آپاپتوز می‌شوند (۲۱). اما در این زمینه مطالعه‌ای در بز صورت نگرفته است. بنابراین، با توجه به اهمیت گونه دامی بز در تولید حیوانات تراریخته، تولید پروتئین‌های دارویی نو ترکیب و

اهمیت اقتصادی پرورش آن، هدف از انجام مطالعه حاضر جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز در محیط آزمایشگاه و بررسی تأثیر FSH بر مساحت و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در طی مدت کشت محیط آزمایشگاه می‌باشد.

روش بررسی

به منظور انجام این مطالعه، نمونه‌های بیضه از بزهای نابالغ با سن ۲-۳ ماه از کشتارگاه صنعتی بیستون واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان کرمانشاه تهیه شد. بیضه‌ها در کنار یخ و در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی منتقل گردیدند. باید خاطرنشان ساخت که در این مطالعه موازین اخلاقی کار با حیوانات که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی می‌باشد، هنگام کار با حیوانات رعایت گردید. در آزمایشگاه، بیضه از اسکروتوم خارج گشت و متعاقب جدا کردن اپیدیدیم، چند بار با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شد. سپس ۱۰ گرم از بافت پارانشیم بیضه با استفاده از قیچی استریل جدا گردید و به داخل لوله فالكون

(SPL، South Korea) منتقل شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Gibco، UK) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Gibco، Paisley، UK) به آن اضافه گردید. هر کدام از لوله‌ها سه نوبت و هر بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettach، Germany) شدند. جهت جداسازی و استخراج سلول‌های لوله‌های منی‌ساز از بافت پارانشیم بیضه، از روش van Pelt و همکاران (۲۲) و زندی و همکاران (۲۳) استفاده شد. به منظور هضم مکانیکی، بافت پارانشیم بیضه پس از شستشو به داخل پتری دیش منتقل گردید و با استفاده از پنس و قیچی استریل خرد گشت و از هم گسسته شد. در ادامه وارد مرحله هضم آنزیمی گردید. در مرحله اول هضم آنزیمی، آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و تریپسین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (Sigma Chemical Co، St. Louis، MO، USA) به پتری دیش‌های حاوی بافت شیرابه‌ای بیضه اضافه شد و پتری دیش‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،

رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شدند. به منظور افزایش تأثیر آنزیم‌های ذکر شده بر هضم بافت پارانشیم بیضه، هر ۱۰ دقیقه یک بار عمل پیپتاژ صورت گرفت. همچنین جهت ارزیابی هضم آنزیمی و روند باز شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، هر ۱۰ دقیقه یک بار بافت پارانشیم بیضه با استفاده از میکروسکوپ معکوس

(Olympus، IX71® inverted microscope) بررسی گردید. پس از طی این مرحله، به منظور حذف بافت‌های هضم شده حاصل از جدا شدن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، محتویات هریک از پتری دیش‌ها به داخل لوله‌های فالكون منتقل شد و به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۴۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس محتویات زیر لوله‌های فالكون که حاوی لوله‌های منی‌ساز بود، برداشته شد و به داخل پتری دیش‌های استریل منتقل گردید و وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شد. در این مرحله به منظور هضم لوله‌های منی‌ساز و آزادسازی سلول‌های موجود در آن‌ها، آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، هیالورونیداز تیپ ۲ (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دزوکسی‌ریبونوکلئاز (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به نمونه‌ها اضافه گردید و پتری دیش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. شایان ذکر است که به منظور جداسازی سلول‌های انفرادی از قطعات باقی‌مانده، لوله‌های فالكون به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفیوژ شدند. جهت توقف هضم آنزیمی از محلول FBS (Sigma، USA) استفاده گردید. تعلیق حاصل حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و میوئید (Myoid) بود. در مرحله بعد برای حذف سلول‌های میوئید، تعلیق سلولی توسط صافی استریل با اندازه ۵۵ میکرومتر فیلتر شد. در تعلیق حاصل که سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی شناور بودند، پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰ سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شدند. در نهایت، این سلول‌ها برای کشت مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی تیپ A از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن PGP9.5 از روش Heidari و همکاران (۲۴) همچنین Rodriguez-Sosa و همکاران (۲۵) استفاده شد. به این صورت که پس از ۱۰ روز کشت، سلول‌ها در گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده تریپسینه شدند.

بلوک کردن اولین مکان غیراختصاصی به‌وسیله avidin/biotin انجام شد. بلوک مکان غیراختصاصی دیگر هم با قراردادن اسلاید در PBS حاوی پنج درصد سرم گوسفند به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد.

سپس اسلاید با آنتی‌بادی اولیه غیر کونژوگه خرگوش علیه نشانگر PGP9.5 (Dako, Carpinteria, CA, USA) با رقت ۱:۴۰۰ در PBS حاوی ۲/۵ درصد سرم بز به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از سه مرتبه شستشو با PBS (هر بار ۵ دقیقه)، مقطع به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق در معرض آنتی‌بادی ثانویه biotinylated sheep anti-rabbit IgG, Avicenna Research (Institute, Iran) قرار گرفت و مجدداً با TBS/BSA شستشو شد. در ادامه مقطع به مدت ۳۰ دقیقه در تماس با

HPR-conjugated streptavidin (Biosource, USA) با رقت ۱:۲۵۰ قرار داده شد و با TBS/BSA شستشو شد. در مرحله پایانی با افزودن ۳-۳ دی آمینو بنزیدین (Roche, Germany) به مقطع به مدت ۱۰ دقیقه، رنگ نمایان شد. سپس، اسلاید به‌طور کامل در آب مقطر تمیز شد و مجدداً با هریس همتاکسیلین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ‌آمیزی و دوباره با آب مقطر شستشو داده شد. در ادامه، اسلاید با الکل آبگیری و با گزیرلول شفاف و با انتقال (Merck, Germany) پوشانده شد و زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه شمارش و ارزیابی درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از جداسازی به کمک رنگ‌آمیزی تریپان بلوی ۰/۴ درصد (Trypan blue, UK) و میکروسکوپ نوری صورت گرفت. برای این منظور، تعلیق سلولی با تریپان بلوی ۰/۴ درصد به نسبت ۱:۱ مخلوط گردید. سپس با شمارش ۱۰۰ سلول به‌طور تصادفی و با استفاده از هموسیستمتر، تعداد سلول‌های زنده و مرده تعیین شد و درصد زنده‌مانی نمونه محاسبه گردید.

به‌منظور کشت، سلول‌های درون لوله فالکون به پلیت کشت چهار خانه‌ای (TPP, Switzerland) منتقل شدند. هر پلیت حاوی چهار گوده است که گوده یک به‌عنوان گروه کنترل و گوده‌های دو، سه و چهار به‌ترتیب جهت تیمارهای یک، دو و سه اختصاص یافت. ۵۰۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی (حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی) به محیط کشت DMEM حاوی

۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد FBS به داخل هر یک از گوده‌ها ریخته شد. سپس FSH (Fostimon®, Germany) به شرح زیر به گوده‌ها اضافه شد:

گوده شماره یک (گروه کنترل): محیط کشت DMEM بدون FSH

گوده شماره دو (گروه تیمار یک): محیط کشت DMEM حاوی FSH با غلظت ۵ واحد بر میلی‌لیتر

گوده شماره سه (گروه تیمار دو): محیط کشت DMEM حاوی FSH با غلظت ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر

گوده شماره چهار (گروه تیمار سه): محیط کشت DMEM حاوی FSH با غلظت ۲۰ واحد بر میلی‌لیتر

در نهایت، پلیت‌ها در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار داده شدند. تعویض محیط‌های کشت هر ۷۲ ساعت انجام شد. برای ارزیابی مساحت و تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روزهای چهارم، هفتم و دهم پس از کشت از میکروسکوپ معکوس مجهز به عدسی چشمی مدرج استفاده گردید. شایان ذکر است که در این مطالعه دوزهای FSH و انتخاب روزها جهت ارزیابی روند کلونی‌زایی براساس مطالعات قبلی صورت گرفت (۲۰-۱۷، ۸). علاوه بر این، محاسبه مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی بر حسب میلی‌متر مربع از طریق نرم‌افزار

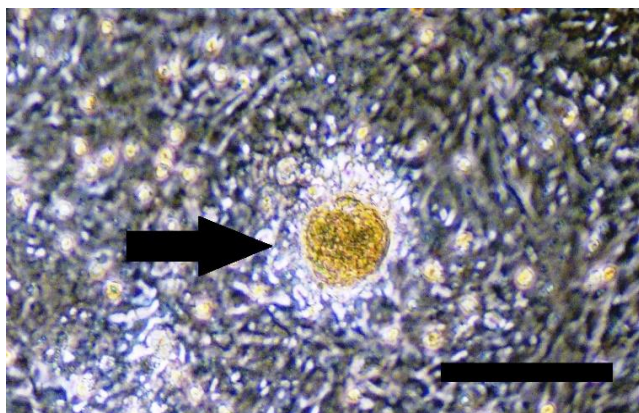
Image J (Bethesda, MD, USA), National Institutes of Health) انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این مطالعه از نرم‌افزار SPSS 21 استفاده گردید. داده‌ها براساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Mean $\pm$ SE) ارائه شدند. داده‌های جمع‌آوری شده از نظر نرمال بودن ارزیابی گردیدند و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شدند. مقایسه میانگین مساحت و تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف و روزهای متفاوت کشت با استفاده از آزمون تکمیلی توکی در سطح معناداری ($P < 0.05$) صورت پذیرفت.

یافته‌ها

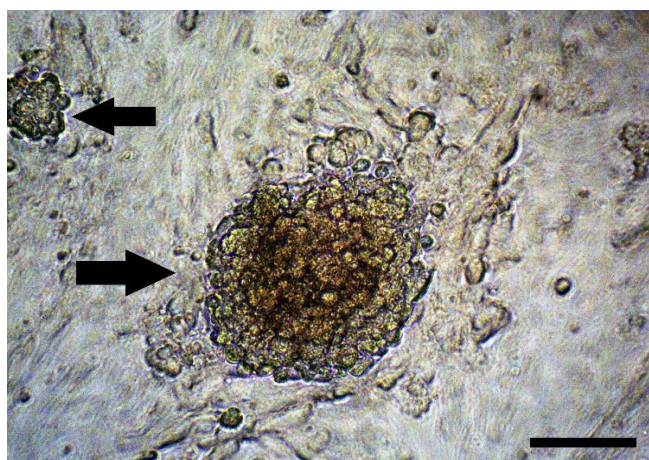
در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلافاصله پس از جداسازی ۸۹/۴ $\pm$ ۲/۳۲ درصد بود.

با گذشت زمان، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موجود در داخل پلیت، کلونی تشکیل دادند و با رشد آن‌ها بر تعداد و اندازه کلونی‌ها افزوده شد.

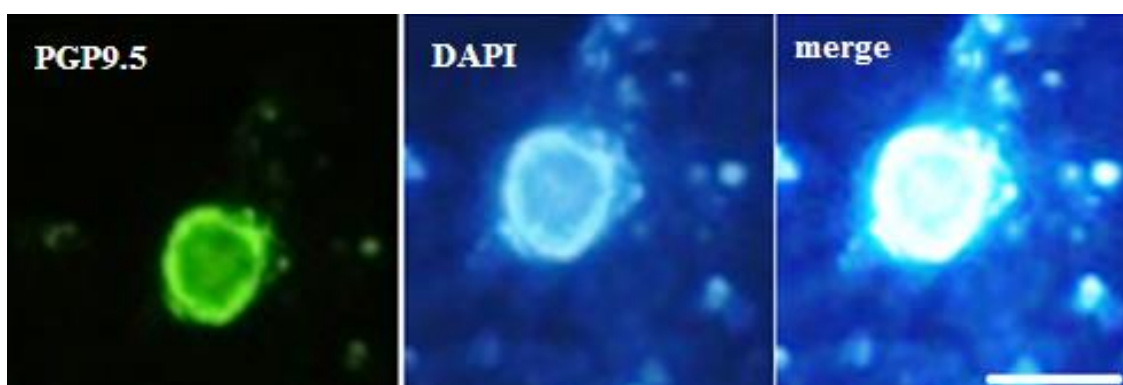
در اشکال ۱ و ۲، کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای چهارم و دهم کشت نشان داده شده است. پس از پایان دوره کشت، این سلول‌ها آنتی‌ژن PGP9.5 را بیان کردند (شکل ۳).



شکل شماره ۱: کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روز چهارم کشت که روی لایه‌ای از سلول‌های سرتولی قرار دارند (نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)



شکل شماره ۲: کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در روز دهم کشت (نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر)



شکل شماره ۳: رنگ‌آمیزی ایمونو فلورسنت علیه آنتی‌ژن PGP9.5؛ هسته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) مشخص شده است (نوار مقیاس: ۴۰ میکرومتر)

جدول شماره ۱: مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی (mm^2) در گروه‌های متفاوت آزمایشی در روزهای مختلف پس از کشت

روز	کنترل	۱ (FSH) (۵ واحد بر میلی لیتر)	۲ (FSH) (۱۰ واحد بر میلی لیتر)	۳ (FSH) (۲۰ واحد بر میلی لیتر)	میانگین روز
۴	0.39 ± 0.04^{ad}	0.41 ± 0.08^{ad}	0.80 ± 0.19^{bc}	0.27 ± 0.03^{ad}	0.47 ± 0.06^b
۷	0.49 ± 0.04^{ad}	0.52 ± 0.06^{ad}	0.99 ± 0.13^{abc}	0.29 ± 0.05^{ae}	0.57 ± 0.08^{ab}
۱۰	0.77 ± 0.19^{ad}	0.82 ± 0.18^{ad}	1.38 ± 0.14^{ac}	0.35 ± 0.06^{ad}	0.84 ± 0.11^a
میانگین گروه	0.55 ± 0.08^d	0.59 ± 0.08^d	1.04 ± 0.10^c	0.3 ± 0.03^e	

داده‌ها براساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد بیان شده‌اند. داده‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) آنالیز شدند. جهت مقایسه میانگین مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون توکی استفاده شد.

مقادیر متفاوت در داخل هر ستون (روزهای آزمایش) که با حروف a و b نشان داده شده‌اند، از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

مقادیر متفاوت در داخل هر ردیف (گروه‌های آزمایش) که با حروف c، d و e نشان داده شده‌اند، از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

در جدول ۱ مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه‌های مختلف آزمایشی و در روزهای متفاوت پس از کشت مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای چهارم، هفتم و دهم پس از کشت در گروه دو بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی بوده است ($P < 0.05$). همچنین میانگین کل مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمامی روزهای پس از کشت در گروه ۲ بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی بوده است ($P < 0.05$). بر مبنای نتایج، میانگین کل مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام گروه‌های آزمایشی در روز دهم پس از کشت به شکل معناداری بیشتر از روز چهارم بوده است ($P < 0.05$).

جدول شماره ۲: تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف آزمایشی در روزهای متفاوت پس از کشت

روز	کنترل	۱ (FSH) (۵ واحد بر میلی لیتر)	۲ (FSH) (۱۰ واحد بر میلی لیتر)	۳ (FSH) (۲۰ واحد بر میلی لیتر)	میانگین روز
۴	$15/25 \pm 2/69^{bd}$	$16/25 \pm 2/14^{bd}$	$30/75 \pm 4/41^{bc}$	$11/25 \pm 1/55^{ad}$	$18/38 \pm 2/31^b$
۷	$22/50 \pm 3/86^{bd}$	$23/75 \pm 3/82^{abd}$	$36/75 \pm 3/52^{abc}$	$13/00 \pm 2/97^{ad}$	$26/50 \pm 3/58^{ab}$
۱۰	$34/75 \pm 2/37^{ad}$	$34/25 \pm 2/39^{ad}$	$40/50 \pm 4/68^{ac}$	$19/75 \pm 3/90^{ae}$	$36/06 \pm 3/62^a$
میانگین گروه	$24/17 \pm 2/90^d$	$24/75 \pm 2/69^d$	$31/25 \pm 3/77^c$	$14/67 \pm 1/90^e$	

داده‌ها براساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد بیان شده‌اند. داده‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) آنالیز شدند. جهت مقایسه میانگین تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون توکی استفاده شد.

مقادیر متفاوت در داخل هر ستون (روزهای آزمایش) که با حروف a و b نشان داده شده‌اند، از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

مقادیر متفاوت در داخل هر ردیف (گروه‌های آزمایش) که با حروف c، d و e نشان داده شده‌اند، از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

در جدول ۲ به مقایسه تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی بین گروه‌های متفاوت آزمایشی در روزهای مختلف پس از کشت پرداخته شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای چهارم، هفتم و دهم پس از کشت در گروه ۲ بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی بوده است ($P < 0.05$).

همچنین میانگین کل تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمامی روزهای پس از کشت در گروه ۲ به‌طور معناداری بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی بوده است ($P < 0.05$). بر مبنای نتایج، میانگین کل تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام گروه‌های آزمایشی در روز دهم پس از کشت به شکل معناداری بیشتر از روز چهارم بوده است ($P < 0.05$).

بحث

اسپرماتوژنز یک فرایند پیچیده و تنظیم‌شده‌ای است که شامل تکثیر، تمایز و بلوغ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) می‌باشد (۲۴). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دلیل توانایی در ایجاد تعادل بین تقسیمات خودنوسازی و تمایزی؛ موجب تداوم روند اسپرماتوژنز، حفظ باروری و انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد می‌شوند (۲۶). انجام مطالعات آزمایشگاهی بر روی این سلول‌ها در دام‌های اهلی، امکان استفاده از آن‌ها برای حفظ باروری، اصلاح نژاد، تولید حیوانات تراریخته و تولید پروتئین‌های دارویی نو ترکیب را فراهم آورده است (۲۷، ۲۴). در میان گونه‌های دامی، بزها برای تولید پروتئین‌های دارویی در شیر خود به‌طور منحصر به فردی مناسب هستند، زیرا سریع‌تر از گاوها بالغ می‌شوند، دوره آبستنی کوتاه‌تری دارند و بازده تولید شیر و محتوای پروتئینی آن نسبتاً بالا می‌باشد (۲۸). به این منظور تاکنون مطالعات مختلفی در جهت تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت صورت گرفته است. برای مثال، در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Wang و همکاران صورت گرفت نشان داده شد که کشت کوتاه مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بز با افزودن ویتامین C به محیط کشت، راهکار مناسب‌تری جهت تکثیر این سلول‌ها می‌باشد (۷). بنابراین هدف از انجام مطالعه حاضر نیز جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیضه بز نابالغ و بررسی اثرات غلظت‌های مختلف هورمون محرک فولیکولی (FSH) بر تشکیل کلونی‌های مشتق از این سلول‌ها در محیط کشت بود. با توجه به تعداد نسبتاً کم سلول‌های بنیادی و نیز وجود نسل‌های مختلف سلول‌های زایا در بیضه حیوانات بالغ، خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نسبت به حیوانات نابالغ به مراتب دشوار است (۲۹).

بنابراین سن مناسب برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه بز، پیش از بلوغ می‌باشد. اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز بیضه بز در این سن دارای دو نوع سلول مشخص می‌باشند: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A و سلول‌های سرتولی (۳۰، ۲۴). در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلافاصله بعد از جداسازی 89.4 ± 2.32 درصد بود. این یافته با نتایج مطالعات قبلی انجام‌شده از نظر درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گوسفند (۲۵، ۲۳)، گاو (۲۹، ۱۷) و موش (۳۱) قابل مقایسه است که نشان‌دهنده روش صحیح جداسازی، انتخاب دوز مناسب آنزیم‌های مورد استفاده و نیز کنترل صحیح فرایند می‌باشد.

همچنین، در مطالعه حاضر برای تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیپ A، از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی ژن PGP9.5 استفاده شد. نتایج نشان داد که سلول‌های کلونی در محیط کشت این نشانگر را بیان کردند. این یافته با مطالعات قبلی که ثابت کرده بودند سلول‌های اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف این نشانگر را بیان کرده‌اند، مطابقت داشت (۲۵-۲۴، ۳۳-۳۲). در پژوهش حاضر، مساحت و تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در تمام گروه‌ها با گذشت زمان افزایش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل عملکرد مناسب محیط کشت انتخابی و شرایط آزمایشگاه برای رشد کلونی‌ها در طی مدت کشت باشد.

در این راستا، Anjamrooz و همکاران (۸)، Narenji Sani و همکاران (۱۸) و Tajik و همکاران (۱۹) در مطالعاتی که با هدف ارزیابی تأثیر FSH بر القاء کلونی‌زایی SSCs به‌ترتیب در موش، گوساله و گوسفند در محیط آزمایشگاه انجام دادند، نتایج مشابهی را گزارش کردند.

بر طبق مطالعات پیشین، دستکاری‌های مختلفی در محیط کشت صورت گرفته و همچنین از فاکتورهای رشد و هورمون‌ها برای بهبود وضعیت بقاء، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده شده است (۳۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تأثیر FSH بر مساحت و تعداد کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی وابسته به دوز بود، به‌طوری که این پارامترها در گروه‌های دریافت‌کننده FSH به میزان ۵ و ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر افزایش

پیدا کرد که فقط در گروه ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل معناداری بود. اما افزایش غلظت FSH نقش مثبتی در تزیاد کلونی‌های کشت شده نداشت و در گروه ۲۰ واحد بر میلی‌لیتر مساحت و تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل و تیمارهای ۵ و ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر بود. مطالعات Tajik و همکاران (۱۷) و Narenji Sani و همکاران (۱۸) نشان داد که تعداد کلونی‌های SSCs گوساله در گروه‌های تیمار شده با FSH با غلظت‌های متفاوت بیشتر از گروه کنترل بود. علاوه بر این، افزودن FSH سبب کاهش مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی شد که این اختلاف در روز ۱۰ پس از کشت معنادار بود. این یافته با یافته‌های مطالعه حاضر تا حدودی هم‌خوانی دارد. در مطالعه دیگری نیز مشاهده شد که مساحت و تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی گوسفند در محیط کشت در گروه‌های دریافت‌کننده FSH با غلظت‌های متفاوت روند کاهشی داشت که وابسته به دوز بود، به‌طوری که بیشترین میزان کاهش در پارامترهای ذکر شده در گروه دریافت‌کننده FSH با بالاترین غلظت بود (۱۹).

نتایج Anjamrooz و همکاران (۸) نشان داد که مساحت و تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی موش در گروه‌های تحت درمان با FSH تا روز ۱۱ کشت به‌طور معناداری پایین‌تر از گروه کنترل بود که با مطالعه ما هم‌خوانی نداشت. با این وجود، پس از این مدت مساحت و تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی به‌صورت تأخیری در پایان روز ۱۴ کشت افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت. همچنین، در مطالعه دیگری افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه درمانی با FSH در رت نشان داده شده است (۲۰). تفاوت‌های مشاهده‌شده میان تغییرات در میزان کلونی‌زایی این سلول‌ها در مطالعه حاضر و مطالعات دیگران ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های آزمایشگاهی، تفاوت در دوزهای مورد استفاده و نیز تفاوت گونه‌ای باشد.

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در خصوص فهم عواملی که باعث تقویت و تمایز SSCs می‌شوند، انجام شده است. افزایش کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در *in vitro* با افزودن فاکتورهای رشد و هورمون‌های مختلف احتمالاً نشان‌دهنده خودنوزایی و بقا SSCs بوده و کاهش کلونی‌زایی می‌تواند

نشان‌دهنده مرگ و یا تمایز این سلول‌ها باشد (۴).

سلول‌های سرتولی ارتباط نزدیکی با سلول‌های اسپرماتوگونی دارند و طی فرایند اسپرماتوژنز دامنه بالایی از فاکتورهای رشد و سایتوکین‌های مختلف تنظیم‌کننده تکثیر، تمایز و متابولیسم سلول‌های اسپرماتوگونی را ترشح می‌کنند که به روش Paracrine و Juxtacrine عمل می‌کنند (۳۵).

FSH به‌طور مستقل و یا همراه با تستوسترون، بر تکثیر، بلوغ و عملکرد سلول‌های پشتیبانی‌کننده سرتولی در شرایط *in vitro* تأثیر می‌گذارد (۱۴). FSH از طریق اتصال به گیرنده‌های خود (Follicle Stimulating Hormone Receptor) (FSHR) سبب تحریک آنزیم آدنیلیل سیکلاز (AC) می‌شود. این آنزیم تولید cAMP از ATP را کاتالیز می‌کند. cAMP وارد محل تنظیمی پروتئین کیناز A (PKA) شده و باعث فسفریله‌شدن پروتئین‌ها، تحریک بیشتر مسیر سیگنالینگ داخل سلولی، تغییر در فعالیت سلول و رونویسی ژن می‌شود (مسیر cAMP/PKA) (۳۶). همچنان که قبلاً اشاره شد، افزودن FSH به محیط کشت در غلظت‌های ۵ و ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر سبب افزایش کلونی‌زایی SSCs شد ولی غلظت ۲۰ واحد بر میلی‌لیتر موجب کاهش کلونی‌زایی این سلول‌ها در گروه تیمار گردید.

مطالعات پیشین نشان داده است که FSH در شرایط *in vitro* تولید فاکتورهایی که سبب خودنوزایی و تکثیر SSCs می‌شوند را از سلول‌های سرتولی تحریک می‌کند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به فاکتور نوروتروفیک مشتق‌شده از سلول‌های گلیال (GDNF) و فاکتور رشد فیبروبلاست ۲ (FGF2) اشاره کرد (۳۷، ۱۳-۱۲). در این راستا، تأثیر مثبت فاکتورهای رشد GDNF و FGF2 بر افزایش کلونی‌زایی SSCs بز در محیط کشت نشان داده شده است (۳۸). وجود این دو سیتوکاین و فاکتور رشد در محیط کشت از طریق کاهش آپاپتوز القاء‌شده (Apoptosis) منجر به خودنوزایی، تکثیر و تثبیت SSCs می‌شود (۳۹).

از سوی دیگر، یکی از مهم‌ترین عللی که در خصوص اثر کاهشی FSH در محیط کشت بیان‌شده این است که افزودن FSH منجر به تحریک سلول‌های سرتولی و ترشح فاکتورهای ضروری نظیر فاکتور سلول بنیادی (SCF) (Stem Cell Factor)، پروتئین ریخت‌شناسی استخوان (BMP4) و اکتیوین A (Activin A)

افزودن آن با غلظت‌های پایین به محیط کشت، تأثیر مثبتی بر القای کلونی‌زایی SSCs داشت؛ اما در غلظت بالا سبب کاهش تشکیل کلونی‌های SSCs شد. اثر FSH بر افزایش یا کاهش تشکیل کلونی‌های SSCs احتمالاً می‌تواند از طریق تولید فاکتورها و یا سایر مکانیسم‌های ذکر شده واسطه‌گری شود. در این راستا، انجام مطالعات بیشتر جهت آشکارسازی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری عمومی دام‌پزشکی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه رازی می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه رازی (به دلیل حمایت‌های مالی) تقدیر و تشکر می‌گردد.

می‌شود که باعث پیش‌برد تمایز و خروج SSCs از روند کلونی‌زایی می‌شوند (۴۰، ۱۳). همچنین نشان داده شده است که افزایش غلظت یک هورمون و اتصال مداوم گیرنده‌های سلول و هورمون سبب کاهش تعداد گیرنده‌های فعال می‌شود. در این صورت حساسیت بافت هدف نسبت به اثرات هورمون به شدت کاهش می‌یابد (۴۱). در این رابطه Monaco و همکاران (۴۲) گزارش کرده‌اند که بیان ژن گیرنده‌های FSH در سلول‌های سرتولی در پاسخ به دوزهای بالاتر FSH دچار Downregulation می‌شود که منجر به تولید ناکافی فاکتورهای مورد نیاز جهت تکثیر SSCs می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اثر FSH در تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وابسته به دوز بود؛ به‌طوری‌که

References:

1. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000;21(6):776-98. PMID: 11105904
2. Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, et al. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):14931-6. PMID: 12391306
3. de Rooij DG. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development* 2017;144(17):3022-30. PMID: 28851723
4. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 2005;113(11-12):727-42. PMID: 16480445
5. La HM, Hobbs RM. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell Mol Life Sci* 2019;76(20):4071-102. PMID: 31254043
6. Niu B, Li B, Wu C, Wu J, Yan Y, Shang R, et al. Melatonin promotes goat spermatogonia stem cells (SSCs) proliferation by stimulating glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production in Sertoli cells. *Oncotarget* 2016;7(47):77532-42. PMID: 27769051
7. Wang J, Cao H, Xue X, Fan C, Fang F, Zhou J, et al. Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. *Theriogenology* 2014;81(4):545-55. PMID: 24368149
8. Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 2006;18(6):709-20. PMID: 16930518

9. Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL. Effect of the GnRH-agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tissue Cell* 2001;33(2):200-7. PMID: 11392673
10. Chen LY, Brown PR, Willis WB, Eddy EM. Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. *Endocrinology* 2014;155(12):4964-74. PMID: 25181385
11. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008;24:263-86. PMID: 18588486
12. Ding LJ, Yan GJ, Ge QY, Yu F, Zhao X, Diao ZY, et al. FSH acts on the proliferation of type A spermatogonia via Nur77 that increases GDNF expression in the Sertoli cells. *FEBS Lett* 2011;585(15):2437-44. PMID: 21726557
13. de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 2009;72(8):580-5. PMID: 19263493
14. Oduwale OO, Peltoketo H, Huhtaniemi IT. Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Front Endocrinol* 2018;9:763. PMID: 30619093
15. Simoni M, Casarini L. Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *Eur J Endocrinol* 2014;170(3):R91-107. PMID: 24288354
16. Hansson V, Skalhogg BS, Tasken K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;73(1-2):81-92. PMID: 10905822
17. Tajik P, Narenji Sani R, Moezifar M, Yousefi MH, 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* 2013;23(4):901-6. Link
18. Narenji Sani R, Tajik P, Yousefi MH, Movahedin M, Qasemi-Panahi B, Shafiei S, et al. Follicle stimulating hormone increases spermatogonial stem cell colonization during in vitro co-culture. *Vet Res Forum* 2012;4(1):37-41. PMID: 25593684
19. Tajik P, Mokhber-Dezfuli MR, Alighazi N, Rahimi-Feyli P; Shafiei S. The effect of follicle stimulating hormone (FSH) on colony formation of ovine spermatogonial stem cells in vitro. *J Isfahan Med Sch* 2014;31(268):2228-37. Link
20. Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* 2000;220(2):225-37. PMID: 10753512
21. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, et al. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 2002;17(7):1811-19. PMID: 12093844
22. van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biol Reprod* 1996;55(2):439-44. PMID: 8828852
23. Zandi A, Rahimi-Feyli P, Moghaddam AA, Nikousefat Z. Effect of testosterone on of ovine spermatogonial colony formation in-vitro. *Feyz* 2016;20(3):205-13. Link
24. Heidari B, Rahmati-Ahmadabadi M, Akhondi MM, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Shirazi A, et al. Isolation, identification, and culture of goat spermatogonial stem cells using c-kit and PGP9.5 markers. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(10):1029-38. PMID: 22782689
25. Rodriguez-Sosa JR, Dobson H, Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology* 2006;66(9):2091-103. PMID: 16870245
26. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365(1546):1663-78. PMID: 20403877

27. Houdebine LM. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009;32(2):107-21. PMID: 18243312
28. Abbasi H, Tahmoorespur M, Hosseini SM, Nasiri Z, Bahadorani M, Hajian M, et al. THY1 as a reliable marker for enrichment of undifferentiated spermatogonia in the goat. *Theriogenology* 2013;80(8):923-32. PMID: 23987985
29. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002;124(1):85-94. PMID: 12090922
30. Shirazi MS, Heidari B, Shirazi A, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Rahmati-Ahmadabadi M, et al. Morphologic and proliferative characteristics of goat type A spermatogonia in the presence of different sets of growth factors. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(11):1519-31. PMID: 25194750
31. Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *Int J Nanomedicine* 2013;8:4563-76. PMID: 24348035
32. 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. PMID: 10542373
33. Zhang Z, Hill J, Holland M, Kurihara Y, Loveland KL. Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures. *J Androl* 2008;29(4):418-30. PMID: 18326509
34. Savvulidi F, Ptacek M, Savvulidi Vargova K, Stadnik L. Manipulation of spermatogonial stem cells in livestock species. *J Anim Sci Biotechnol* 2019;10:46. PMID: 31205688
35. Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 1993;147:25-96. PMID: 8225836
36. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol* 2002;174(2):195-204. PMID: 12176658
37. Mullaney BP, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology* 1992;131(6):2928-34. PMID: 1446630
38. Bahadorani M, Hosseini SM, Abedi P, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. 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* 2015;33(3):181-91. PMID: 26154310
39. Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development* 2012;139(10):1734-43. PMID: 22491947
40. Rossi P, Dolci S. Paracrine Mechanisms involved in the control of early stages of mammalian spermatogenesis. *Front Endocrinol* 2013;4:181. PMID: 24324457
41. Zhang S, Li W, Zhu C, Wang X, Li Z, Zhang J, et al. Sertoli cell-specific expression of metastasis-associated protein 2 (MTA2) is required for transcriptional regulation of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene during spermatogenesis. *J Biol Chem* 2012;287(48):40471-83. PMID: 23086931
42. Monaco L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) induces CREM gene expression in Sertoli cells: involvement in long-term desensitization of the FSH receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10673-7. PMID: 7479863