تاثیر هورمونهایrFSH و تستوسترون بر بلوغ اسپرماتید گرد موشی در سیستم هم‌کشتی سلول‌های Vero

علیرضا آژین(M.Sc.)[1]، منصوره موحدین(Ph.D.)[2]، مجتبی رضا زاده ولوجردی(Ph.D.)[3]، انوشیروان کاظم نژاد(Ph.D.)[4].

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

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

۳ – استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

٤ – دانشیار، گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

اسپرم‌سازی یک فرآیند سنجیده و دقیق است که در سن بلوغ آغاز شده و در سراسر زندگی تولید مثلی ادامه می‌یابد. سلول‌های ژرمینال در محیط کشت تحت شرایط خاصی قادر به تمایز حین میوز و بعد از آن هستند. سیستم‌های هم‌کشتی در حفظ سلول‌های سازندهٔ اسپرم و روند اسپرم‌سازی نقش مهمی داشته و امکان حمایت از روند اسپرم‌سازی را فراهم می‌نماید. از این رو از این سیستم‌ها جهت بلوغ سلولهای ژرمینال و غلبه بر توقف تمایز سلول‌های سازندهٔ اسپرم استفاده می‌شود. هورمون‌های FSH و تستوسترون نیز در شروع و بقاء اسپرم‌سازی مهم بوده و کاهش آنها سبب نقص در اسپرم سازی در محیط In Vivo می‌گردد. از آنجا که همراهی سیستم هم‌کشتی با هورمون‌ها در مطالعات انجام شده وجود نداشت در این پژوهش، اثرات دو سیستم هم‌کشتی با سلول Vero و سیستم هم‌کشتی با سلولVero حاوی هورمونهایrFSH و تستوسترون بر بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور سوسپانسیون سلولی از بیضه موش نژاد NMRI با سن ۱۲–۸ هفته تهیه و به سه قسمت تقسیم گردید. یک قسمت در محیط DMEM حاوی سرم (گروه شاهد)، قسمت دیگر بر روی تک لایه سلول Vero (آزمون ۱) و بخشی نیز در محیط حاوی تک لایه سلول‌های Vero به اضافه هورمون‌های rFSH و تستوسترون(آزمون۲) به مدت ۹٦ ساعت کشت داده‌شد. تعداد سلول‌های اسپرماتیدگرد، اسپرماتیدهای در حال طویل شدن و اسپرماتیدهای طویل شده قبل از کشت و همچنین روزانه به مدت ۹٦ ساعت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و ثبت گردید. میزان درصد زنده ماندن انواع سلول‌های اسپرماتید نیز در طی ساعات ذکر شده، با استفاده از آزمون تریپان بلو ارزیابی شده و نتایج حاصل توسط آزمون آماری repeated measure ANOVA مقایسه شد. نتایج حاصل حاکی از آن بود که در سیستم هم‌کشتی Vero در ۲٤ ساعت اول کشت تعداد سلول‌های اسپرماتید در حال طویل شدن نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد ($P<0/0001$). در سیستم هم‌کشتی حاوی هورمون‌های rFSH و تستوسترون نیز پس از ۲٤ و٤۸ ساعت کشت، به ترتیب تعداد سلول‌های اسپرماتید در حال طویل شدن و طویل شده نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت($P<0/0001$)؛ ولی پس از سپری شدن زمان‌های فوق، به مرور تعداد انواع سلول‌های اسپرماتید کاهش یافت. از نظر تعداد سلول‌های اسپرماتید درحال طویل شدن در محیط کشت تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمون مشاهده نشد. درتمامی گروه‌ها میزان درصد زنده ماندن سلول‌های اسپرماتید در طول مدت زمان کشت، کاهش داشت و در گروه‌های آزمون به‌دلیل اثرات مثبت سیستم‌های هم‌کشتی وهورمون‌ها حیات سلول‌ها با درصد بالاتری حفظ شد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد در هر دو سیستم هم‌کشتی و هم‌کشتی- هورمون حاصل می‌شود و سلول‌ها برای مدت زمان کوتاهی (حداکثر ٤۸ ساعت) قادر هستند که مراحل تمایزی را پشت سر گذارند. لازم به ذکر است که از جهت زنده ماندن در محیط کشت و همچنین بلوغ، سیستم هم‌کشتی که به آن هورمون افزوده شده باشد بهتر عمل می‌کند.

گل واژگان: ناباروری، توقف اسپرم‌سازی، اسپرماتید، هم‌کشتی، بلوغ درمحیط کشت، rFSH، و تستوسترون.

آدرس مکاتبه: دکتر منصوره موحدین، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، بزرگراه جلال آل احمد، تهران، ایران.

پست الکترونیک: movahedm @hotmail.com

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

اسپرم‌سازی[1] که شامل مراحل پیچیده و دقیق تمایز سلولی در پستانداران است، در سن بلوغ آغاز شده و در طول زندگی تولیدمثلی ادامه می‌یابد که در نتیجهٔ آن سلول‌های بنیادی[2]، تقسیم شده و حاصل تقسیمات میوزی، اسپرماتیدهای هاپلوئیدی است که در بیضه و اپی‌دیدیم تغییرات اساسی روی آنها صورت گرفته تا اسپرمی با عملکرد کامل ایجاد شود. تمامی مراحل اسپرم‌سازی همزمان به‌طور کامل صورت می‌گیرد؛ بطوریکه در شرایط پاتولوژیک، کوچکترین اختلالی می‌تواند سبب ناباروری شود(۱). در ۳۰-٤٪ بیوپسی‌های بیضه در بیماران مبتلا به آزواسپرمی[3] و الیگواسپرمی[4] شدید، توقف روند اسپرم‌سازی گزارش شده‌است(۲). این توقف می‌تواند در هر مرحله از تشکیل سلول‌های ژرمینال اتفاق افتد. در انسان توقف روند اسپرم‌سازی نقطهٔ پایان و معضل مأیوس‌کننده‌ای برای زوج‌هایی است که آرزوی داشتن فرزند را دارند. از روش‌های ارائه شده توسط محققان علم باروری، تزریق داخل سیتوپلاسمی(ICSI)[5] انواع سلول‌های اسپرماتید به تخمک بارور نشده‌است که با این روش نوزادانی طبیعی در خرگوش(۳)، گاو(٤)، موش(٥) و انسان(٦) متولد شده است. تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم نسبت به تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرماتید گرد[6]، اسپرماتید طویل[7]، هسته اسپرماتید گرد[8] موفقیت بیشتری در لقاح داشته است(۷). علت عدم موفقیت کامل در استفاده از سایر سلول‌ها را می‌توان به عواملی نظیر تغییرات ایجاد شده در عملکرد سانتروزوم، فعالیت تخمک و فعال شدن ژنوم جنینی، همزمان نبودن سیکل سلولی و بلوغ پروتئین هسته(۸) و عدم تشخیص صحیح سلول‌های اسپرماتید درون جمعیت ناهمگن[9] سلول‌های بیضه(۹) نسبت داد. لذا بلوغ اسپرماتید در محیط کشت جهت کاربرد در لقاح مصنوعی ضروری به نظر می‌رسد. سیستم‌های هم‌کشتی[10] در تولید مثل کمکی اثرات مفیدی دارند(۱۰). در روش هم کشتی دو سلول به‌طور همزمان کشت می‌شوند که این هم‌کشتی می‌تواند به‌صورت مکانیسم مثبت یا منفی عمل کرده و سبب اصلاح ویژگیهای سلول نظیر بهبود روند ظرفیت‌گیری اسپرم(۱۱)، افزایش تعداداسپرم وجنین حاصله(۱۲) و... شود. هورمون‌های تستوسترون و FSH نیز در شروع و ادامه روند اسپرم‌سازی نقش ویژه‌ای داشته و کاهش آنها سبب اختلال در این فرایند می‌شود. دانشمندان بسیاری اثرات سیستم‌های هم‌کشتی وهمچنین هورمون‌ها را بر میزان بلوغ سلول‌های سازندهٔ اسپرم بررسی کرده‌اند(١٦- ١٣). Cremades و همکاران (١٣،١٤) در دو تحقیق جداگانه به بررسی اثرات هورمون‌های تستوسترون، FSH و سیستم هم‌کشتی Vero جهت بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد پرداختند که نتایج حاصله بیانگر پیشرفت روند اسپرمیوژنز در این سلول‌ها با استفاده از سیستم‌های فوق بود. Tesarik و همکاران در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که افزودن هورمون‌های rFSH و تستوسترون به محیط کشت سلول‌های اسپرماتید گرد قادر است مراحلی از تمایز در محیط کشت را القا نماید(١٦-١٥).

با توجه به نقش مثبت هم‌کشتی و همچنین هورمون در بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد و با ذکر این نکته که همراه کردن این دو سیستم به منظور بلوغ اسپرماتید در مطالعات انجام شده یافت نشد، هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیر افزودن هورمون‌های تستوسترون و

1- Spermatogenesis
2- Stem cells
3- Azoospermia
4- Oligoospermia
5- Intracytoplasmic sperm injection
6- Round spermatid injection
7- Elongated spermatid injection
8- Round spermatid nucleus injection
9- Heterogeneous
10- Co- culture systems

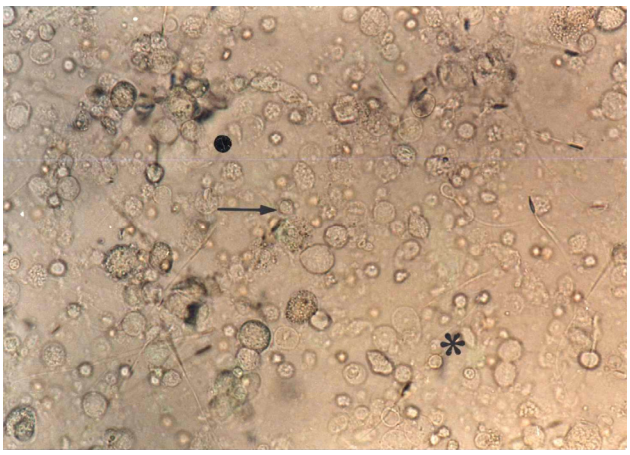
Downloaded from http://www.jri.ir

rFSH به محیط هم‌کشتی به منظور تسهیل اسپرمیوژنز در محیط کشت بود.

مواد و روشها

در این پژوهش از موش‌های نر سفید نژاد NMRI با سن ۱۲-۸ هفته استفاده شد و در مجموع ۱۵ موش مورد مطالعه قرار گرفت (در هر گروه ۵ موش در طی ۵ بار آزمایش).

موش‌های نر استفاده شده در پژوهش به روش قطع نخاع از ناحیه گردن کشته شده و بیضه‌های حیوان از بدن خارج و در پتری‌دیش حاوی محیط کشت DMEM[1] (Gibco) قرار گرفت. غشاء اطراف بیضه‌ها برش داده شد به‌طوری‌که تمام لوله‌های سمینی‌فروس داخل محیط کشت قرار گرفت. با استفاده از سرنگ انسولین، لوله‌های سمینی‌فروس قطعه قطعه گردید تا رده‌های مختلف سلول‌های بیضه وارد محیط کشت شود. پتری دیش محتوی سلول‌های بیضه به مدت ۱۰ دقیقه داخل انکوباتور $37^{\circ}C$ با $5\%\ CO_2$ قرار گرفت تا به تعادل رسیده و سلولها به‌طور کامل داخل محیط قرار گیرد. سپس با استفاده از پیپت پاستور فقط محیط کشت

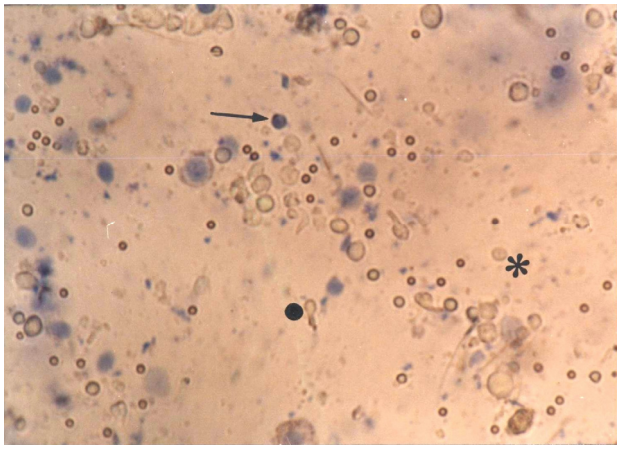


تصویر ۱- سوسپانسیون سلولی غیر منجمد حاصل از بیضه موش (در تصویر اسپرماتید گرد (→) Elongating (*) و Elongated (●) مشاهده می شود. بزرگنمایی × ۴۰۰).

1- Dulbeccos Modified Eagles Medium

حاوی انواع مختلف سلول‌ها داخل لوله آزمایش استریل شده‌ای جمع آوری گردید. در انجام این عمل دقت شد که بقایای لوله‌های سمینی‌فروس به لوله آزمایش منتقل نشود. محیط محتوی انواع مختلف سلول به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ *rpm* سانتریفوژ وپس از تشکیل رسوب سلولی مجدداً توسط محیط کشت DMEM شستشو داده شد. رسوب سلولی حاصل، به نسبت ۱ به ۱۰ توسط محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS[2] (دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران) رقیق شده و برای کشت سلولی به مدت ۹۶ ساعت مورد استفاده قرار گرفت.

به منظورتشخیص افتراقی انواع سلول‌های اسپرماتید ملاک‌های زیر موردنظر بود: اسپرماتید گرد[3]، سلولی گرد بوده و سطح سیتوپلاسم آن صاف و یکنواخت است. هسته، گرد و مرکزی است که علائمی از تراکم در آن دیده نمی‌شود. در اطراف هسته کمی سیتوپلاسم بوده و در بخش فوقانی هسته، نقطه روشنی مشابه وزیکول آکروزومی دیده می‌شود. در این مرحله فلاژلی وجود ندارد. دراسپرماتید در حال طویل شدن[4]، سلول



تصویر ۲- سوسپانسیون سلولی غیرمنجمد حاصل از بیضه موش پس از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو (در تصویر اسپرماتید گرد مرده (→) و زنده (*) و Elongated زنده (●) مشاهده می شود. بزرگنمایی × ۴۰۰).

2- Fetal Bovine Serum
3- Round
4- Elongating

Downloaded from http://www.jri.ir

بیضی بوده و آثاری از فلاژل قابل رؤیت است. اسپرماتید طویل شده[1]، سلولی طویل بوده و سطح حاشیه سیتوپلاسمی کاملاً در قطب خلفی هسته قرار دارد(۱۵،۱۶) (شکل ۱).

جهت شمارش سلول‌های اسپرماتید گرد، اسپرماتید در حال طویل شدن واسپرماتید طویل شده حجم معلومی از سوسپانسیون سلولی و محیط کشت را که رقت آن ۱ به ۱۰ بود، توسط پیپت پاستور برداشت و بر روی لام نئوبار تخلیه گردید. سلول‌های نامبرده در میدان دید لام نئوبار توسط میکروسکوپ نوری و روش مشاهده مستقیم با عدسی ٤٠ شئی مشاهده و شمارش گردید.

برای شمارش تعداد سلول‌های مرده و زنده از خاصیت نفوذپذیری غشاء سلول‌ها نسبت به رنگ تریپان بلو[2] استفاده شد. به این ترتیب که یک قطره از سوسپانسیون سلولی رقیق شده، توسط پیپت پاستور روی لام قرار گرفته و سپس یک قطره تریپان بلو به آن اضافه شد. روی قطره توسط لامل پوشانده شده و زیر میکروسکوپ نوری با عدسی شئی ٤٠ مشاهده گردید و تعداد سلول‌های زنده درحداقل صد سلول شمارش شده از انواع مورد نظر، محاسبه شد (شکل ۲).

سلول‌های زنده Vero در محیط DMEM و۱۰٪FBS در داخل فلاسک به حجم ۵۰*ml* کشت داده شدند که دو یا سه روز تکثیر یافته و بعد محیط کشت روی سطح سلول‌ها تخلیه شد. سپس ۵*ml* محلول تریپسین ۰/۵٪ در فسفات بافر (PBS)[3] به اضافه ۰/۰٤٪ EDTA به فلاسک اضافه گردید. پس از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک و تعلیق آنها، ۱۰*ml* محیط کشت به آنها اضافه شد تا از فعالیت بیشتر تریپسین و تخریب سلول‌ها جلوگیری شود. محلول حاوی سلول‌های Vero به لوله آزمایش استریل منتقل و با شتاب ٤٠٠ *g* به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و در پتری‌دیش با قطر ۳۰*mm* ، قطرات ۵۰ *µl* از محلول حاوی سلول قرارداده شد و روی آن با یک لایه نازک روغن پارافین پوشانده شد و پتری دیش به داخل انکوباتور حاوی 5% CO2 با دمای ۳۷*°C* منتقل گردید(۱۷).

گروه‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل گروه‌های شاهد، آزمون ۱ و آزمون ۲ بود. در گروه شاهد سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده و سپس ۱۰*µl* از محلول سوسپانسیون سلولی به داخل قطرات حاوی محیط کشت ۱۰٪FBS+DMEM منتقل گردید. هر ٢٤ ساعت تعویض محیط کشت، شمارش سلولی در واحد میلی لیترو میزان درصد زنده ماندن سلولهای اسپرماتید انجام شد.

در گروه آزمون ۱ ، مقدار۱۰*µl* سوسپانسیون سلولی پس از رقیق شدن به نسبت ۱ به ۱۰، داخل قطرات به حجم۵۰*µl* حاوی تک لایه سلول‌های Vero منتقل گردید. هر ٢٤ ساعت تعویض محیط کشت، شمارش سلولی در واحد میلی لیتر و میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها انجام شد.

در گروه آزمون ۲ مقدار ۱۰*µl* از سوسپانسیون سلولی رقیق شده به قطرات به حجم ۵۰*µl* حاوی تک لایه سلول Vero که قبلاً به آن ۵۰ *IU/l* rFSH (Gonal-h Sereno,Holand) و۱ *µmol/l* تستوسترون (شرکت ابوریحان، ایران) اضافه شده بود، منتقل گردید. نظیر گروه‌های قبلی هر ٢٤ ساعت تعویض محیط کشت، شمارش سلولی در واحد میلی لیتر و تعیین میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها انجام شد. از آنجائی‌که نیمه عمر rFSH بیش از ٢٤ ساعت نیست هر ٢٤ ساعت یکبار هر دو هورمون به محیط کشت اضافه گردید.

مقایسه میانگین تعداد سلول‌های مورد نظر در واحد حجم (میلی لیتر) ± انحراف معیار و همچنین میانگین میزان درصد زنده ماندن ± انحراف معیار انواع سلول‌های اسپرماتید توسط آزمون آماری

1-Elongated
2- Trypan Blue
3- Phosphate Buffer Salin

Downloaded from http://www.jri.ir

Repeated Measure ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفته ومعنی‌داری در حد P<0.05 تعیین شد.

نتایج

جدول شماره ۱ نمایانگر تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد، اسپرماتید در حال طویل شدن و اسپرماتید طویل شده در طی ۹۶ ساعت کشت در گروه‌های شاهد و آزمون ۱و۲ می‌باشد. در گروه شاهد میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد قبل از کشت ۸۱±۶/۳ ×۱۰^۴/ml بود که در طی ۹۶ ساعت کشت کاهش شدیدی در تعداد سلول‌ها مشاهده شد تا در روز آخر به میزان ۱۱±۴/۵×۱۰^۴/ml رسید. در گروه آزمون ۱ میانگین تعداد سلول‌ها قبل از کشت ۸۶±۴/۹×۱۰^۴/ml بود که پس از کشت کاهش تدریجی در تعداد سلول‌ها مشاهده شد تا این که بعد از ۴۸ ساعت به میانگین ۶۵± ۴/۵ ×۱۰^۴/ml رسید. پس از آن سیر نزولی افزایش یافت تا این‌که به میانگین ۲۸ ±۷/۳×۱۰^۴/ml رسید. در گروه آزمون ۲ تعداد سلول‌ها از میانگین ۹۰±۸/۵×۱۰^۴/ml در طول دوره کشت کاهش تدریجی داشت و در پایان چهار روز کشت به میزان ۴۸±۴/۹× ۱۰^۴/ml رسید. مقایسه آماری تفاوت معنی‌دار مابین سه گروه نشان داد(P <۰/۰۱).

با توجه به جدول شماره ۱ مشخص شد که کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتید در حال طویل شدن گروه شاهد در طول ۹۶ ساعت کشت، شدید بود که در طی ۲۴ ساعت اول روند نزولی تدریجی بود و بعد شدت پیدا کرد. در گروه آزمون ۱ میانگین تعداد سلول‌ها از ۷۲±۷×۱۰^۴/ml در ابتدای کشت با روند صعودی

جدول ۱- مقایسهٔ تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد، اسپرماتید در حال طویل شدن و اسپرماتید طویل شده در طی چهار روز کشت مابین گروه شاهد و گروه‌های آزمون ۱و ۲

گروه / تعداد- زمان کشت		قبل از کشت M±SD	۲۴ ساعت M±SD	۴۸ ساعت M±SD	۷۲ ساعت M±SD	۹۶ ساعت M±SD
اسپرماتید گرد	گروه شاهد	۸۱±۶/۳	۷۰±۸/۲	۴۹±۷	۲۹±۴/۵	۱۱±۴/۵
	گروه آزمون۱[a]	۸۶±۴/۹	۷۶±۴/۹	۶۵±۴/۵	۴۵±۵	۲۸±۷/۳
	گروه آزمون۲[b]	۹۰±۸/۵	۸۵/۵±۵/۷	۷۶/۵±۸/۲	۶۶±۴/۹	۴۸±۴/۹
اسپرماتید در حال طویل شدن	گروه شاهد	۶۷±۷	۵۸±۱۱/۸	۴۳±۱۰/۳	۲۵±۹/۶	۱۱±۸/۸
	گروه آزمون ۱[a]	۷۲±۷	۷۵±۹/۹	۶۸±۱۱/۲	۵۶±۹	۴۴±۷/۳
	گروه آزمون ۲[a]	۶۹±۷/۷	۷۲±۱۳	۷۵±۱۱/۵	۷۰/۵±۱۰/۲	۶۱/۵±۷/۶
اسپرماتید طویل شده	گروه شاهد	۴۶±۷/۳	۳۵±۵/۹	۱۹±۷	۷±۵/۴	۱/۵±۲/۴
	گروه آزمون ۱[a]	۴۶±۸/۲	۴۴±۹/۸	۴۲±۵/۴	۲۹±۴/۵	۱۴±۷/۳
	گروه آزمون ۲[a,b]	۴۹/۵±۵/۷	۵۱±۶	۴۶/۵±۹	۳۹±۷/۷	۲۵/۵±۵/۷

مقادیر بر حسب میانگین تعداد سلول ها در واحد حجم (میلی لیتر)± انحراف معیار می باشد و دارای ضریب ۱۰^۴ است.
a: تفاوت معنی دار با گروه شاهد، b: تفاوت معنی دار با گروه آزمون ۱ (سطح معنی داری در حد P< ۰/۰۵ است).

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۲- مقایسهٔ میزان درصد زنده ماندن سلول های اسپرماتید گرد، اسپرماتید در حال طویل شدن واسپرماتید طویل شده در طی چهار روز کشت مابین گروه شاهد و گروه‌های آزمون ۱و ۲

گروه / درصد- زمان کشت		قبل از کشت M±SD	۲۴ ساعت M±SD	۴۸ ساعت M±SD	۷۲ ساعت M±SD	۹۶ ساعت M±SD
اسپرماتید گرد	گروه شاهد	۹۰/۳±۱/۸	۷۷/۲±٤/۳	٥٥/٤±٥/۳	۳٤/۳±۱٤/۹	۱۷/٥±۱۰
	گروه آزمون۱ [a]	۸۸/٦±۲	۷٥/۱±٥/٤	٦۱±٤/۲	٤٤/٤±٦/۳	۲۸/٤±۸/۱
	گروه آزمون۲ [a]	۸۹/٥±۱/۳	۷۸/۳±۲/۱	٦٦/۳±٤/٦	٥۳±٤/٤	۳۷/٤±۷/۸
اسپرماتید در حال طویل شدن	گروه شاهد	۸۹/٦±۱/۸	۷٥/۹±۳/۹	٥۱/٦±۳/۸	۳۲/۸±۱۳/۹	۱٦/۸±۱۱/۸
	گروه آزمون ۱ [a]	۸۹/۳±۱/٦	۷٥/٤±٥/۸	٥۹/٥±٦/۱	٤۲/۸±٤/۷	۲۷/۸±۷/٥
	گروه آزمون ۲ [a]	۸۹/٥±۱/۳	۷۷/۸±۲/۲	٥٦/۸±٤/٦	٥۲/۱±٥/۳	۳٦/٥±۹/۱
اسپرماتید طویل شده	گروه شاهد	۸۹±۱/۳	۷٤/۷±۳/٤	٥۳±۳/٥	۳۱/۸±۱۲/۹	۱٥/۷±۱۱/٥
	گروه آزمون ۱ [a]	۸۹/٦±۱/٥	۷٥/٥±٥/٥	۸٥/۳±٦/۲	٤۰/٥±۲/٤	۲٤/۹±۸/۲
	گروه آزمون ۲ [a]	۸۹/٥±۱/۳	۷۷/۱±۳	٦٤/٥±٤/۹	٤۹/٦±٥/۷	۳٤/۲±۸/۲

مقادیر بر حسب میانگین درصد سلول های زنده در واحد حجم (میلی لیتر)± انحراف معیار می باشد و دارای ضریب $۱۰^{٤}$ است.

a : تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد (سطح معنی داری در حد P< ۰/۰٥ است).

تدریجی در ۲٤ ساعت اول به مقدار $۷٥±۹/۹×۱۰^{٤}/ml$ رسید و بعد از آن تعداد سلول‌ها به تدریج تنزل یافت تا به میانگین $٤٤± ۷/۳×۱۰^{٤}/ml$ رسید. در گروه آزمون ۲ میانگین تعداد سلول‌ها قبل از کشت $٦۹± ۷/۷×۱۰^{٤}/ml$ بود ودر دو روز اول کشت روند صعودی تدریجی مشاهده شد و میانگین تعداد به $۷٥±۱۱/٥×۱۰^{٤}/ml$ رسید وبعد روند نزولی آغاز شد. در مقایسه آماری گروه شاهد با هر دو گروه آزمون تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۰۱) اما بین دو گروه آزمون تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

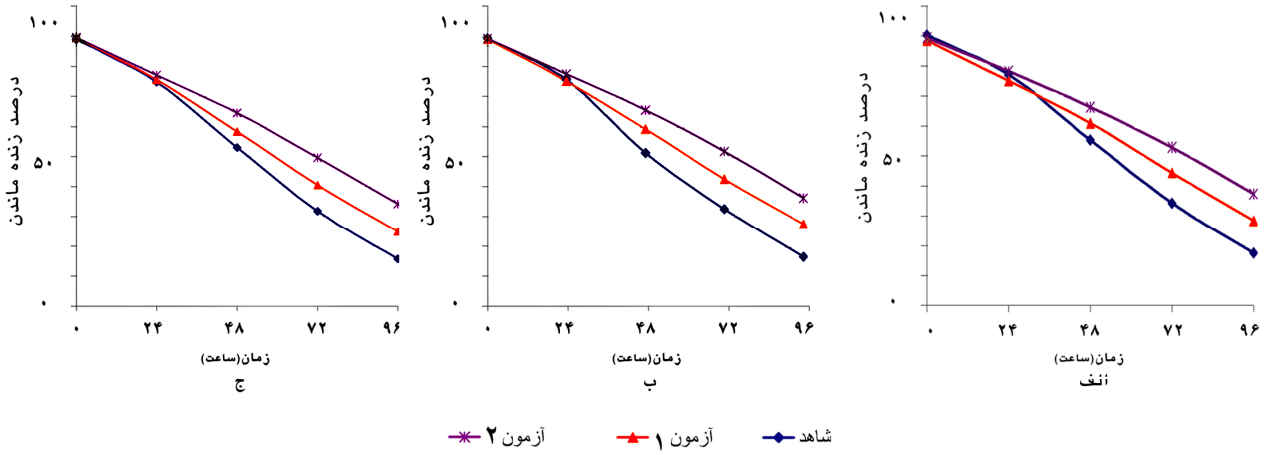
میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید طویل شده گروه شاهد در تمامی مدت کشت دارای روند نزولی بود و از ۲٤ ساعت پس از کشت روند نزولی با شتاب بیشتری ادامه یافت تا در انتهای دوره کشت به$۱/٥±۲/٤×۱۰^{٤}/ml$ رسید و در گروه آزمون ۱ روند نزولی در ٤۸ ساعت اول خیلی کم بود به طوری که از $٤٦ ±۸/۲×۱۰^{٤}/ml$ در ابتدای کشت به $٤۲±٥/٤×۱۰^{٤}/ml$ بعد از ٤۸ ساعت رسید و پس از آن سیر کاهش ادامه یافت تا به تعداد $۱٤±۷/۳×۱۰^{٤}/ml$ رسید.

در گروه آزمون ۲ در ۲٤ ساعت اول کشت روند صعودی نسبی در تعداد سلول‌های اسپرماتید طویل شده مشاهده شد (جدول شماره ۱) و سپس کاهش تدریجی در تعداد وجود داشت تا این‌که در پایان دوره کشت به $۲٥/٥±٥/۷×۱۰^{٤}/ml$ رسید. مقایسه آماری تفاوت معنی‌داری را بین تمامی گروه‌ها از نظر میانگین تعداد اسپرماتیدهای طویل شده نشان داد(p<۰/۰۰۱).

جدول ۲ میزان درصد زنده ماندن و روند آن در سلول‌های اسپرماتید گرد،اسپرماتید در حال طویل شدن

Downloaded from http://www.jri.ir

نمودار ۱- مقایسه درصد زنده ماندن سلول‌های اسپرماتیدگرد (الف)، اسپرماتید در حال طویل شدن (ب) و اسپرماتید طویل شده (ج) در طی چهار روز کشت ما بین گروه شاهد و گروه‌های آزمون ۱ و ۲



و اسپرماتید طویل شده در طی ۹۶ ساعت کشت ما بین سه گروه را نشان می‌دهد. نتایج حاصله بیانگر کاهش میزان زنده ماندن سلول‌های اسپرماتید در سه گروه بود. منتهی این کاهش در گروه شاهد شدیدتر و در گروه‌های آزمون به دلیل اثرات مفید سیستم‌های هم‌کشتی و هورمون کمتر و منظم‌تر بود (نمودار شماره ۱).

بحث

دستیابی به اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز در محیط کشت، موضوع تحقیق بسیاری از محققین بوده است. به منظور نیل به این هدف استفاده از سیستم هم‌کشتی توصیه شده است. در بخش اول تحقیق از تک لایه سلولی Vero به عنوان سلول پشتیبان استفاده شده و نتایج نشان داد که سلول‌های اسپرماتید گرد می‌توانند روند بلوغی خود را ادامه داده و به سلول‌های اسپرماتید در حال طویل‌شدن تبدیل شوند. نتایج حاصله نیز بیانگر کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد در ۲۴ ساعت اول کشت و افزایش نسبی تعداد سلول‌های اسپرماتید در حال طویل‌شدن در همان مدت زمان ذکر شده است. علت این امر را می‌توان به اثرات سیستم‌های هم‌کشتی نسبت داد که به صورت مکانیسم‌های مثبت و یا منفی عمل کرده و سبب بهبود ویژگی‌های سلولی می‌شوند. در مکانیسم منفی، سلول‌های پشتیبان قادرند عوامل مزاحم را از محیط کشت حذف کنند(۱۷).

در مکانیسم مثبت از سلول‌های پشتیبان فاکتورهای تروفیک نظیر فاکتور رشد انسولین ترشح شده که این عمل سبب تحریک رشد سلول‌های اسپرماتید گرد شده و از تاخیر رشد آنها نیز جلوگیری به عمل می‌آورد.

برخی محققان معتقدند که از سلول‌های پشتیبانی نظیر Vero مادهٔ پلی پپتیدی ترشح می‌شود که به رشد جنین و سلول‌ها کمک می‌کند(۱۸،۱۹).

در پژوهش حاضر، از تک لایه سلول Vero به عنوان سلول پشتیبان جهت هم‌کشتی استفاده شد چرا که این سلول منشا ادراری تناسلی داشته و می‌تواند به سلول‌های ژرمینال کمک کند(۱۷).

تحقیقات صورت گرفته توسط Menck (۲۰) و Maeda (۲۱) نشان داد که از تک لایه‌های سلولی در محیط کشت پلی‌پپتیدهای محرک رشد آزاد شده که در نتیجه بر توقف رشد سلول فائق می‌آید. از طرف دیگر یک سری مواد در محیط کشت وجود دارد که عامل

Downloaded from http://www.jri.ir

بازدارنده رشد سلول‌های اسپرماتید گرد محسوب می‌شود نظیر هایپوزانتین[1] و غلظت زیاد گلوکز که تک لایه سلولی یا سبب از بین رفتن آنها می‌شود و یا می‌تواند گلوکز را به پیروات تبدیل کرده و در نتیجه از اثرات سمی آن بکاهد. تبدیل سلول‌های اسپرماتیدگرد به سلول‌های اسپرماتید در حال طویل‌شدن را می‌توان به اثرات سودمند استفاده از تک لایه سلول Vero نسبت داد و عدم بلوغ بعد از ۲٤ ساعت کشت را می‌توان به دلیل مصرف زیاد مواد مغذی موجود در محیط جهت تکثیر سلول‌های به کار رفته در هم‌کشتی دانست که سبب می‌شود مواد غذایی به اندازه کافی در اختیار سلول‌های سازندهٔ اسپرم قرار نگیرد. محققین دیگر نیز به نتایج مشابهی در استفاده از Vero Cell برای تکمیل میوز اسپرماتوسیت اولیه دست پیدا کردند(۲۲). هرچند که بعضی از محققین(۲۳) در هم کشتی اسپرماتید گرد با سلول‌های Vero نتوانستند بلوغ با درصد بالا بدست آورند.

در بخش دیگری از تحقیق به محیط هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتید گرد با سلول Vero، هورمون‌های r FSH و تستوسترون اضافه گردید. نتایج حاصله نشان داد که سلول‌های اسپرماتید گرد قادرند روند اسپرمیوژنز را ادامه داده و به سلول‌های اسپرماتید در حال طویل شدن و اسپرماتید طویل شده تبدیل شوند. کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد موجود در سوسپانسیون سلولی حاصل از بافت بیضه در محیط هم‌کشتی حاوی مقادیر زیاد rFSH و تستوسترون بعد از ٤۸ ساعت کشت نسبت به زمانی که این سلول‌ها در محیط فاقد هم‌کشتی و هورمون کشت داده شدند (گروه شاهد) مشاهده شد و بر عکس افزایش نسبی تعداد سلول‌های اسپرماتید در حال طویل‌شدن و اسپرماتید طویل‌شده در همین مدت زمانی نشان‌دهنده این مطلب است که سیستم هم‌کشتی که به آن هورمون اضافه شود قادر است در دوره ٤۸ ساعت کشت به تمایز سلول‌های اسپرماتید گرد به طویل کمک کند. برخی محققان به دنبال کشت نمونه‌های بیوپسی بیضه انسانی دریافتند که سلول‌های ژرمینال در مردانی که توقف بلوغ داشته‌اند اگر در معرض غلظت‌های بالایی از FSH و تستوسترون قرار گیرند، می‌توانند اسپرم‌سازی را طی ۲٤و٤۸ ساعت پس از کشت ادامه داده و اسپرماتیدهای گرد نیز برتوقف روند اسپرم‌سازی غلبه نمایند و به اسپرماتیدهای طویل تبدیل شوند(۲٤و۲۵). لازم به ذکر است که برخی از محققین دوزهای بالا تر از مقدار بکار برده شده در این پژوهش را توصیه می‌کنند(۲٤).

شروع و بقای اسپرم‌سازی از لحاظ هورمونی توسط FSH و تستوسترون تنظیم می‌گردد(۲٦). برخی محققین بر این عقیده‌اند که تستوسترون هورمون اصلی تنظیم کننده اسپرمیوژنز در پستانداران بوده و FSH نقش جزئی دارد(۲۷). در همین رابطه Sun و همکاران بیان کردند که تستوسترون سبب تغییر شکل اسپرماتید گرد به اسپرماتید طویل می‌شود(۲۸). اما تحقیقات صورت گرفته توسط Tesarik و همکاران (۲٤) نشان‌دهنده این مطلب است که FSH سبب تغییرات ویژه‌ای در هسته نظیر تراکم هسته، مهاجرت محیطی و برجستگی هسته در اسپرماتیدهای انسان می‌شود. به عبارت دیگر، رشد دم در اسپرماتید گرد، تسریع تقسیمات میوزی، تراکم هسته و طویل شدن اسپرماتیدگرد وابسته به FSH است.

در این تحقیق از غلظت‌های r FSH (۵۰ *IU/l*) و تستوسترون (۱*μmol/l*) استفاده شد زیرا براساس تحقیقات صورت گرفته توسط Tesarik و Mendoza غلظت بالای این دو هورمون سبب تحریک اسپرم‌سازی در سلول‌های ژرمینال می‌شود (۲۵و۲۹). تاثیرات مثبت FSH و تستوسترون برروی مراحل ابتدایی و انتهایی اسپرم‌سازی با واسطه سلول‌های سرتولی امکان پذیر است(۳۰) و جدایی کامل سلول‌های سرتولی از

1- Hypoxanthine

Downloaded from http://www.jri.ir

سلول‌های ژرمینال و آسیب آنها می‌تواند علت عدم پیشرفت اسپرم‌سازی باشد.

در این تحقیق سوسپانسیون سلولی از طریق جداسازی مکانیکی سلول‌ها با استفاده از سرنگ‌های انسولین به دست آمد. هر چند که در این نوع جداسازی اکثر سلول‌ها به صورت منفرد رها شدند اما با اینحال برخی سلول‌های ژرمینال در توده‌های سلولی ژرمینال- سرتولی غوطه‌ور شدند. در شرایط کشت آزمایشگاهی، سلول‌های سرتولی ممکن است مواد هورمونی تنظیم کننده و تحریک‌کننده رشد را ترشح کنند که سبب حمایت و تمایز سلول‌های ژرمینال در همان قطره کشت می‌شود. پس هر چقدر سلول‌های سرتولی موجود در محیط کشت از حیات و سلامتی بیشتری برخوردار باشند، سبب پیشرفت سلول‌های ژرمینال برای رسیدن به مراحل بعدی رشد می‌شود(١٦). هورمونهای FSH و تستوسترون با تاثیری که روی سلول‌های سرتولی می‌گذارند سبب حمایت از تمایز سلول‌های ژرمینال شده و سبب افزایش حساسیت سلول‌های سرتولی نسبت به انسولین می‌شوند. عمل هورمون‌های FSH و انسولین تنظیم متابولیسم گلوکز و تحریک ترشح سلول سرتولی است که برای شروع اسپرمیوژنز طبیعی و سنتز RNA اسپرماتوسیت ضروری است. بقای سلول‌های ژرمینال و تزاید سلول‌های اسپرماتوگونیا بر عهده FSH است(٣١) در حالیکه تستوسترون برروی اسپرماتوگونیا اثر کرده و سبب تبدیل آن به اسپرماتوسیت می‌شود(٣٢) و به عنوان یک ماده ضد آپوپتوز برروی اسپرماتوسیت‌ها عمل می‌کند(٣٣).

در این پژوهش که استفاده همزمان از سیستم هم‌کشتی و هورمون رشد، بعد از گذشت دو روز پیشرفت بلوغی مشاهده نگردید که ممکن است به دلایل زیر باشد:

١- در اثر تعویض‌های مکرر محیط کشت، جدایی سلول‌های سرتولی از سلول‌های ژرمینال بیشتر شده و در نتیجه تأثیر هورمون‌ها از طریق تماس‌های سلول‌های سرتولی- ژرمینال در توده‌های سلولی کاهش یافته است. پس حیات سلول‌های ژرمینال دچار اختلال شده و پیشرفت بلوغی متوقف شده است.

٢- چون سلول‌های به کاررفته در سیستم‌های هم‌کشتی میزان زیادی از مواد مغذی موجود در محیط را برای تکثیر خود استفاده می‌کنند، این عمل ممکن است سبب کاهش مواد لازم جهت بلوغ شده باشد.

٣-به دلیل استفاده از سوسپانسیون سلولی ممکن است سلول‌های سوماتیک غیر سرتولی سبب تغییر در مدیاتورهای مترشحه از سرتولی شده و در نتیجه سبب کمرنگ شدن تأثیر هورمون‌های r FSH و تستوسترون شود.

نتایج حاصله بیانگر این مطلب است که استفاده از سیستم هم‌کشتی به همراه هورمون به دلیل اثرات مفید مکانیسم‌های مثبت و منفی هم‌کشتی و اثرات سودمند استفاده از هورمون‌های r FSH و تستوسترون سبب افزایش پیشرفت بلوغی اسپرماتیدهای گرد شده در نتیجه سبب تسهیل تبدیل آنها به اسپرماتیدهای در حال طویل‌شدن و اسپرماتید طویل‌شده می‌شود. در این قسمت از پژوهش نیز میزان درصد زنده ماندن انواع سلول‌های اسپرماتید مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس آن میزان درصد زنده ماندن سلول‌ها در طول ٤٨ ساعت اول کشت در گروه‌های آزمون به طور تدریجی کاهش یافت. طبق جدول ٢ میزان از دست رفتن سلول‌ها در ٤٨ ساعت اول کشت در محیط حاوی هورمون و هم‌کشتی سیر تدریجی‌تری نسبت به محیط بدون هورمون داشت که علت را می‌توان حفظ حیات این سلول‌ها در محیط کشت توسط هورمون‌های r FSH و تستوسترون (از طریق سلول‌های سرتولی) و اثرات مثبت هم‌کشتی دانست. البته همانطور که برخی از محققین(٣٤) اشاره کرده‌اند احتمالا تغییر در شرایط کشت از جمله دمای ٣٠ ^{o}C می‌تواند باعث حفظ حیات

Downloaded from http://www.jri.ir

سلول‌ها در مدت زمان طولانی‌تر شده و در نتیجه به بلوغ سلول‌های ژرم نابالغ کمک کند. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر پیشرفت روند بلوغ سلول‌های اسپرماتید در سیستم‌های هم‌کشتی و هم‌کشتی- هورمون بود. اما بنظر می‌رسد که با توجه به ویژگی‌های مثبت استفاده از هم‌کشتی شاید بهتر باشد از هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی برای پیشرفت اسپرمیوژنز در محیط کشت استفاده کرد و در عین حال افزودن هورمون به سیستم هم‌کشتی می‌تواند به بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد کمک بیشتری بکند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که کلیه هزینه‌های تحقیق را در قالب پایان نامه دانشجویی تقبل نموده است ابراز می‌نمایند.

References

1-Barrat C.L.R., Grudzinsky J.G., Yovich, J.L. Spermatogenesis in gametes: the spermatozoon. Cambridge University Press: Cambridge.1995; 245-251.
2- Nomen M.N., Mousa M.M., Karasky A.O. Testicular biopsy in azoospermia and severe oligozoospermia. Arch Androl.1984;12: 109-122.
3- Hosoi Y., Miyake M., Utsumu K., Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. (Abstr.331). Proc11th Int. Cong Anim Reprod Artif. Insemin. ,1988.
4- Goto K., Kinoshita, A., Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. Vet Rec.1990;127:517-520.
5- Ahmadi A., Ng Sc., Liow, S.L. Intracytoplasmic sperm injection of mouse oocytes with 5mM Ca^{2+} at different intervals. Hum Reprod.1995;10:431-435.
6- Palermo G., Joris H., Devoroey, P., Van Steirtghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection single spermatozoon into an oocyte. Lancet.1992;340:17-18.
7- Balaban B., Urman B., Isiklar A. Progression to the blastocyst stage of embryos derived testicular round spermatids. Hum Reprod. 2000; 15:1377-1382.
8- Kimura Y., Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop in to normal offspring. Development.1995;121:2397-2405.
9- Tesarik J. Sperm or spermatid conception? Fertil Steril.1997;68:214-216.
10- Bongso A., Fong C.Y., Ng, S.C., Ratnam, S. The search for improved in-vitro systems should not be ignored: Embryo co-culture may be one of them. Hum Reprod.1993;80:1155-1162.
11- Kervancioglu M.E., Djahanbakhch O., Aitken R.J. Epithelial cell co-culture and the induction of sperm capacitation. Fertil Steril.1994;61:1103-1108.
12- Mansour R.T., Aboulghar M.A., Serour G.I. The life span of sperm motility and pattern in co-culture. Fertil Steril.1995;63:660-662.
13- Cremades N., Bernabeu R., Barros A., Sousa M. In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on vero cells. Hum Reorid. 1999; 14:1287-1293.
14- Cremades N., Sousa M., Bernabeu R., Barros, A. Developmental potential of elongating & elongated spermatids after in-vitro maturation of isolated round spermatids. Hum Reprod.2001; 16:1938-1944.
15- Tesarik J., Greco E. Differentiation of spermatogenic cells during in-vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod. 1998; 13:2772-2781.
16- Tesarik J., Greco E. Differentiation of spermatogenic cells during in-vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod. 1998;13:2772-2781.
17- Nematollahi N., Rezazadeh Valojerdi M. Effect of vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos. J Assist Reprod Gen.1999;16:380-384.

Downloaded from http://www.jri.ir

18- Paria B.C., Dey S.K. Preimplantation embryo development in vitro cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci.1990;87:4756-4760.
19- Chen H.F. Peptides extracted from vero cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium. J Assist Reprod Gen . 1994;11:165-171.
20- Menck M.C., Guyader- Joly C., Peyton N., Le Boyrhis, D., Lobo, R.B., Renard, J.P., Heyman, Y. Benefical effects of vero cells for developing IVF bovine eggs in two different co-culture systems. Reprod Nutr Dev.1997;37:141-150.
21- Maeda J., Kotsaji F., Negaimi A., Kamitami N., Tominagat T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media for bovine granulose cells and vero cells cultured in exogenous protein and aminoacid free chemically defined human tubal fluid medium. Biol Reprold. 1996;54:930-936
22- Tanaka A., Nagayoshi M., Awata S., Mawatari Y., Tanaka I., And Kusunoki H. Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. Fertil Steril.2003;79:795-801.
23- Jamal H.S., Amarin Z.O. Round spermatid separation and in vitro maturation. Saudi Med J.2000;21: 960-963.
24- Tesarik J., Guido M., Mendoza C. Humn spermatogenesis in vitro: Respecive effect of follicle-stimulatig hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis,and sertoli cell apoptpsis. J Clin Endocrinol Metab.1998;83:4467-4473.
25- Tesarik J., Nagy P., Abdelmassih R., Greco E., Mendoza C. Pharmacological concentrations of follicle-stimulating hormone and testosterone improve the efficacy of in vitro germ cell differentiation in men with maturation arrest. Fertil Steril.2002;77:245-251.
26- Tsutsumi O. and Takami, O.A. Physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. Science.1986;233:975-977.
27- Chen y., Dicou E., Diakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression in rat round spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of sertoli cell viability. Mol Cell Endocrinol.1997;127:129-136.
28- Sun, T., Wreford, N.G., Roberston, D.M. and De Krester, D.M. Quantitive cytological studies of spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats: identification of androgen – dependent stages. Endocrinol.1990;127:1215-1223.
29- Tesarik, J. and Mendoza, C. In vitro differentiation of germ cells from frozen testicular biopsy specimens. Hum Reprod.2000;15: 1713-1716.
30- Meachem S.J., Wreford N.G. Androgen action rates. J Int Andro.1997;20 :70-90.
on the restoration of spermatogenesis in adult
31- Baarends W.M., Grootegoed J.A. Molecular biology of male gametogenesis. In Fauser, B.C., Rutherford, A.J., Strauss, J.F. and Van Steirteghem, A. (Edititors), Molecular biology in reproductive medicine. Parthenon New York, 1999; pp.271-295.
32- O´Donnel L., Mc Lachlan R.T., Wreford N.G. Testosterone withdrawal promotes stage specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. Biol Reprod.1996; 55:895-901.
33- Print C.G., Loveland K.L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bio Essay.2000;22:423-430.
34- Tesarik J., Mendoza C. and Greco E. In-vitro maturation of immature human male germ cells. Mol Cell Endocrinol.2000;166:45-50.

Downloaded from http://www.jri.ir