

Original Article



Comparison of the Effect of Laminin and Matrigel on the Colonization of Frozen-thawed Spermatogonial Stem Cells in Vitro

Sara Mirgheisari¹ , Peyman Rahimi Fili^{1*} , Ali Asghar Moghadam¹

1. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kermanshah, Iran

Article history:

Received: 09 July 2024

Revised: 06 November 2024

Accepted: 06 November 2024

*Corresponding author: Peyman Rahimi Fili, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kermanshah, Iran

Email: peymanrahimi@razi.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Spermatogonial stem cells (SSCs) are the only adult stem cells that serve as the origin of spermatogenesis, possessing both proliferation and self-renewal capabilities, as well as the ability to transmit genetic information to the next generation. These cells play a significant role in reproductive medicine, the treatment of various types of infertility, and cancers. The proliferation of this cell line in vitro is a prerequisite for all related studies. The aim of this study was to investigate the in-vitro effects of the extracellular matrix of laminin and matrigel on the colonization of frozen-thawed sheep spermatogonia stem cells.

Materials and Methods: Spermatogonial stem cells were isolated from the testes of lambs and purified using a differentiation removal method. After freezing and thawing, the cells were cultured for 10 days in three experimental groups: the control group (simple cell culture in basal medium: DMEM containing 1% antibiotics and 5% fetal bovine serum), treatment 1 (cultured on laminin), and treatment 2 (cultured on matrigel). The number and area of colonies were measured on days 4, 7, and 10 in each group. Specific markers for spermatogonial cells (PLZF, ITGA6, PGP9.5, VASA) were also assessed using immunocytochemistry.

Results: The number of colonies in the laminin group (118.92 ± 6.2) was significantly higher than that in the control (78.08 ± 3.8) and matrigel groups (95.00 ± 4.3) ($P \leq 0.05$). The colony area was significantly higher in the laminin ($1.37 \pm 0.30 \text{ mm}^2$) and matrigel groups ($1.97 \pm 0.38 \text{ mm}^2$) than in the control group ($0.59 \pm 0.08 \text{ mm}^2$) ($P \leq 0.05$).

Conclusion: The extracellular matrix of laminin can provide a suitable microenvironment for cryopreserved Ovine SSCs in an in vitro culture system.

Keywords: Cryopreservation, Immunocytochemistry, Laminin, Matrigel, Spermatogonia stem cells

Please cite this article as follows: Mirgheisari S, Rahimi Fili P, Moghadam AA. Comparison of the Effect of Laminin and Matrigel on the Colonization of Frozen-thawed Spermatogonial Stem Cells in Vitro Urol. 2024; 8(1):45-54. DOI: 10.32592/jru.8.1.45



تأثیر لامینین و ماتریژل بر کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی منجمد- ذوب‌شده اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه

سارا میرقیصری^۱ , پیمان رحیمی فیلی^{۱*} , علی اصغر مقدم^۱

۱. گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، کرمانشاه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌عنوان سرمنشأ فرایند اسپرماتوژنز تنها سلول‌های بنیادی بالغین هستند که علاوه بر تکثیر و خودنوزایی، قدرت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد را دارند. این سلول‌ها جایگاه مهمی در طب تولیدمثل، درمان انواع ناباروری و سرطان‌ها دارند. تکثیر این رده سلولی در محیط آزمایشگاه پیش‌نیاز تمامی مطالعات مربوط به آن است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ماتریکس خارج سلولی لامینین و ماتریژل بر القای کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد- ذوب‌شده در محیط آزمایشگاه است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) از بیضه بره جدا و به روش حذف تمایزی خالص‌سازی شدند. سپس بعد از انجماد و یخ‌گشایی در ۳ گروه آزمایشی شامل گروه شاهد (کشت ساده سلول‌ها در محیط پایه: DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد سرم گوساله جنین (FBS)، تیمار ۱ (کشت بر روی لامینین) و تیمار ۲ (کشت بر روی ماتریژل) به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند. تعداد و مساحت کلونی‌ها در روزهای چهارم، هفتم و دهم در هر گروه محاسبه شد. نشانگرهای اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی (plzf, ITGA6, PGP9.5, VASA) نیز با آزمون ایمنوسیتوشیمی ارزیابی شدند.

یافته‌ها: تعداد کلونی‌های تشکیل‌شده در گروه لامینین ($118/92 \pm 6/2$) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد ($78/08 \pm 3/8$) و ماتریژل ($95/00 \pm 4/3$) است ($P \leq 0/05$). همچنین، مساحت کلونی در گروه لامینین (mm^2) $1/37 \pm 0/30$ و ماتریژل ($1/97 \pm 0/38 mm^2$) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد ($0/59 \pm 0/08 mm^2$) است ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: استفاده از ماتریکس برون سلولی لامینین در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در مقایسه با ماتریژل و کشت ساده به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش قدرت کلونی‌زایی سلول‌های منجمد اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، لامینین، ماتریژل، انجماد، ایمنوسیتوشیمی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۴/۱۹

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۰۸/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۸/۱۶

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

* نویسنده مسئول: پیمان رحیمی فیلی، گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، کرمانشاه، ایران

ایمیل: peymanrahimi@razi.ac.ir

استناد: میرقیصری، سارا؛ رحیمی فیلی، پیمان؛ مقدم، علی اصغر. تأثیر لامینین و ماتریژل بر کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی منجمد- ذوب‌شده اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه. تحقیقات در ارولوژی، بهار و تابستان ۱۴۰۳: ۸ (۱): ۴۵-۵۴

مقدمه

سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های زایی پیش‌ساز اسپرم تضمین‌کننده تداوم فرایند پیچیده اسپرماتوژنز پس از سن بلوغ است [۱]. درعین حال،

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، پایه و اساس اسپرماتوژنز را تشکیل می‌دهند. خاصیت منحصربه‌فرد خودنوزایی و تمایز این

این سلول‌ها تنها گروهی از سلول‌های بنیادی بالغ هستند که می‌توانند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل کنند. تحقیقات هرچه بیشتر در زمینه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) به کشف تمامی مکانیسم‌های دخیل در اسپرماتوژنز و در نتیجه آن راهکارهای درمانی ناباروری‌های مردان کمک می‌کند. با این حال، مسیرهای سیگنال و ژن‌های دخیل در اسپرماتوژنز انسان تا حد زیادی ناشناخته مانده است [۲].

امروزه، کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، انجماد و پیوند آن‌ها راه جدیدی است که به کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل دخیل در طب تولیدمثل را بهتر بررسی کرد. همچنین با استفاده از این سلول‌ها امید به درمان افرادی که در کودکی بر اثر شیمی‌درمانی و پرتودرمانی ناباور شده‌اند، افزایش یافته است [۳، ۴].

بنابراین جداسازی و کشت این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه از آن جهت دارای اهمیت است که به کمک آن می‌توان سلول‌های اسپرماتوگونی را پس از خالص‌سازی و غنی‌سازی برای استفاده‌های بعدی به کار برد. به عنوان مثال، برای درمان مردان مبتلا به نوعی ناباروری به نام آزو اسپرمی غیرانسدادی (NOA) که ناشی از اختلال درونی ریزمحیط (کنام) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عدم تمایز آن‌هاست، بایستی ابتدا تعداد کافی از این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه در دسترس باشد [۵].

یکی از مهم‌ترین مشکلات بر سر راه محققان در این زمینه تحقیقاتی، کم‌تعداد بودن آن‌ها در میان کل جمعیت سلول‌های زایای بیضه (۰/۰۲ تا ۰/۰۳ درصد) و نبود نشانگر اختصاصی سلولی برای شناسایی آن‌هاست؛ چراکه شناسایی این سلول‌ها براساس ریخت‌شناسی محض امکان‌پذیر نیست [۶].

تا به امروز، راه‌های مختلفی برای کشت و خالص‌سازی بیشتر این جمعیت نادر سلولی در آزمایشگاه و شرایط برون‌تنی به کار گرفته شده است؛ از جمله انتخاب فاکتورهای رشد و به‌کارگیری بسترهای کشت متفاوت و ماتریکس‌های برون‌سلولی مختلف. از آنجایی که ارتباط بین SSCs و جایگاه قرارگیری آن‌ها در لوله‌های اسپرم‌ساز موجب تنظیم فعالیت بیولوژیکی سلول‌های مذکور می‌شود، برهم‌کنش سلول‌های اسپرماتوگونی، سلول‌های سوماتیک و ماتریکس خارج‌سلولی در لوله‌های منی‌ساز برای تداوم اسپرماتوژنز ضروری است [۷].

تحقیقات ثابت کرده‌اند که ماتریکس برون‌سلولی بهترین محیط برای کشت آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان است [۸، ۹].

ماتریکس خارج‌سلولی متشکل از مولکول‌های ساختاری و عملکردی است که توسط سلول‌های حاضر در محیط ترشح می‌شوند که این سلول‌ها نشانه‌های سیگنالینگ بیوشیمیایی و بیومکانیکی را برای تأثیرگذاری بر رفتار سلول‌های اطراف به صورت دینامیک فراهم می‌کنند [۱۰].

لامینین گلیکوپروتئین بزرگی است که از سلول‌های سرتولی

ترشح می‌شود و با اتصال به اجزای مختلف موجود در غشای پایه باعث ایجاد یکپارچگی این غشا می‌گردد. این گلیکوپروتئین دارای فعالیت‌های متعددی از جمله اتصال سلولی، تقسیمات و رشد سلول‌ها می‌شود. از آنجایی که در شرایط درون‌تنی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مجاورت با غشای پایه قرار دارند و با واسطه پروتئین‌های سطحی خود (مانند $\alpha 6$ -integrin) به پروتئین‌های این غشا متصل می‌شوند، گمان می‌رود که بین پروتئین‌های لامینین و کلاژن که پروتئین‌های اصلی تشکیل‌دهنده غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز هستند، با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برهم‌کنش وجود داشته باشد. در واقع برهم‌کنش سلول‌های اسپرماتوگونی، سلول‌های سوماتیک و ماتریکس خارج‌سلولی در لوله‌های منی‌ساز برای تداوم اسپرماتوژنز ضروری است [۱۱].

کاناتسو-شینوهارا (Kanatsu-Shinohara) گزارش کرده است که لامینین همراه با محیط حاوی GDNF و فتوئین سبب تداوم فعالیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود [۱۲].

به علاوه، دیده شده است که لامینین به عنوان یکی از اجزای ماتریکس برون‌سلولی در افزایش تکثیر SSCs در محیط آزمایشگاهی مؤثر است. در مطالعه‌ای بر روی بیضه میمون دیده شده است که خالص‌سازی براساس ماتریکس خارج‌سلولی لامینین و ماتریژل سبب خالص‌سازی سلول‌های تمایز نیافته تا ۲/۷ برابر خواهد شد [۱۳].

حتی دیده شده خلوص سلول‌های اسپرماتوگونی براساس ترکیب پرکول، لامینین و ماتریژل به بالای ۹۰ درصد نیز رسیده است [۱۴].

یکی دیگر از مولکول‌های تشکیل‌دهنده ماتریکس برون‌سلولی کلاژن است که با نسبت فراوان در بافت‌های مختلف وجود دارد. با توجه به اینکه ژلاتین به لحاظ ترکیبات بسیار شبیه به کلاژن و همچنین کار با ژلاتین بسیار راحت‌تر از کلاژن است، این ماتریکس در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مورد توجه خاص قرار گرفته است. پیش‌تر تأثیر ماتریکس‌های برون‌سلولی (ECM)، به خصوص لامینین و ماتریژل، در کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برخی گونه‌ها بررسی شده است [۱۵، ۱۶]. کاربرد این دام در مهندسی بافت، طراحی دام‌های تراریخته، درمان‌های به واسطه آنتی‌بادی‌های منوکلنال و داروهای نو ترکیب از یک سمت و جایگاه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مطالعات مرتبط با مهندسی ژنتیک (حفظ ذخایر ژنتیکی) و به طور خاص طراحی مدل‌های حیوانی بیماری‌ها به عنوان مثال ناباروری از سوی دیگر، اهمیت آن را در حوزه علوم پزشکی، به خصوص بیولوژی و فناوری تولیدمثل، بیش از پیش بر همگان عیان خواهد کرد [۱۷]. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوسفند در محیط آزمایشگاه و بررسی تأثیر ماتریکس‌های برون‌سلولی لامینین و ماتریژل بر القای کلونیزاسیون سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد-ذوب است.

روش کار

بیضه بره‌های کشتاری نابالغ ۲-۳ ماهه از کشتارگاه صنعتی واقع در ۳۰ کیلومتری شهر کرمانشاه تهیه و به سرعت در محیط انتقالی (PBS حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین) و در مجاورت یخ و ظرف مدت کمتر از ۱ ساعت به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده دامپزشکی انتقال داده شد. ماهیت این آزمایش تجربی و تعداد تکرار آن ۵ مرتبه بود. تمامی موازین اخلاقی کار با حیوانات و حقوق حیوانات در این پایان‌نامه رعایت شده است. استخراج سلول‌ها با استفاده از روش ترابی و همکاران با اندکی تغییر به شرح زیر انجام شد [۱۸].

به منظور کاهش بار میکروبی احتمالی پس از شست‌وشوی سطح بیضه با الکل ۷۰ درصد و تنتورید ۴۰ گرم، بافت پارانشیم بیضه به داخل لوله فالكون (SLP, South Korea) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM (Bio-Idea, Iran) تجاری و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (Gibco, Paisley, UK) انتقال داده شد و سپس سه مرتبه سانتریفیوژ (Hettach, Germany) (هر بار ۱۵۰۰ دور در دقیقه) انجام گرفت. در این مرحله، پارانشیم بافت بیضه متعاقب شست‌وشو به وسیله قیچی استریل کاملاً خرد شد تا بافت آن حالت شیرابه‌ای پیدا کند. سپس با اضافه کردن آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ و آنزیم تریپسین هر کدام به غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma, Germany) مرحله اول هضم آنزیمی آغاز گردید و پتری‌دیش به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور قرار داده شد. متعاقباً تعلیق به دست‌آمده با دور ۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. با چک کردن تعلیق زیر میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope)، میزان پیشرفت در باز شدن کلاف لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده و مرحله دوم هضم آنزیمی آغاز شد. بدین صورت که آنزیم‌های کلاژناز تیپ ۴، آنزیم هیالورونیداز تیپ ۲ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و دزوکسی‌ریبونوکلئاز با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به تعلیق سلولی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور (۲۰۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. به منظور توقف هضم آنزیمی، FBS با نصف غلظت محلول به تعلیق سلولی اضافه شد و سپس به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و در نهایت به منظور حذف سلول‌های میوئید از تعلیق سلولی (سلول اسپرماتوگونی، سرتولی و میوئید) از فیلتر نایلونی ۴۵ میکرونی (Sartorius, Germany) عبور داده شد. سپس تعلیق سلولی حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفیوژ شد. به منظور خلوص بیشتر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، از روش حذف تمایزی استفاده شد؛ بدین صورت که تعلیق سلولی به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت به فلاسک کشت منتقل شد. پس از طی این مدت، سلول‌های سرتولی به کف چسبیدند و برای عملیات انجماد از سلول‌های شناور که بیشتر حاوی

اسپرماتوگونی بودند، استفاده شد. انجماد براساس روش‌های احمدی و همکاران [۱۷] با کمی تغییرات انجام شد [۱۹].

بدین صورت که سوسپانسیون سلولی از قبل در حجم‌های ۰/۵ میلی‌لیتر الیکوت و آماده شد. سپس محلول مادر انجماد که متشکل از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma-Aldrich, Germany) و ۰/۰۷ مولار سوکروز که با غلظت ۲ برابر مهیا شده بود، به آرامی و طی ۱۰ دقیقه به تعلیق سلولی اضافه شد و به لوله‌های انجماد ۱ میلی‌لیتری (Cryovial, TPP, Switzerland) منتقل گردید. سپس لوله‌ها به صورت خیلی آرام تکان داده شدند تا محیط با سلول‌ها مخلوط شود. سپس لوله انجماد حاوی سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ تا ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در نهایت به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت به تانک ازت مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. برای یخ‌گشایی تعلیق سلولی منجمد، لوله انجماد از تانک خارج و به مدت ۱ دقیقه در بن‌ماری ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آرام‌آرام روی تعلیق سلولی محیط DMEM ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۲۰۰ سانتریفیوژ گردید و پلیت سلولی برای ادامه عملیات کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی درصد حیات سلول‌ها

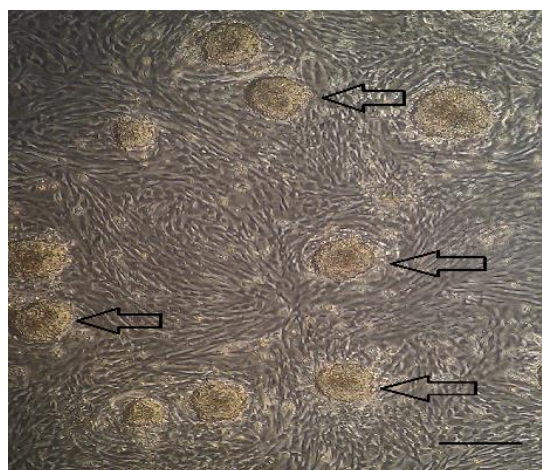
بلافاصله پس از اتمام مراحل جداسازی سلول‌ها، پس از افزودن ماده محافظ انجماد و پس از یخ‌گشایی، درصد حیات سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلوی ۰/۴ درصد (Trypan Blue, UK) و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و لام‌هموسیستمتر محاسبه شد. بدین صورت که تعلیق سلولی و رنگ تریپان‌بلو با نسبت ۱:۱ مخلوط و با شمارش تصادفی ۱۰۰ سلول و نسبت سلول‌های زنده به کل سلول‌ها درصد زنده‌مانی محاسبه شد.

آماده‌سازی ظروف کشت پوشیده با لامینین و ژلاتین

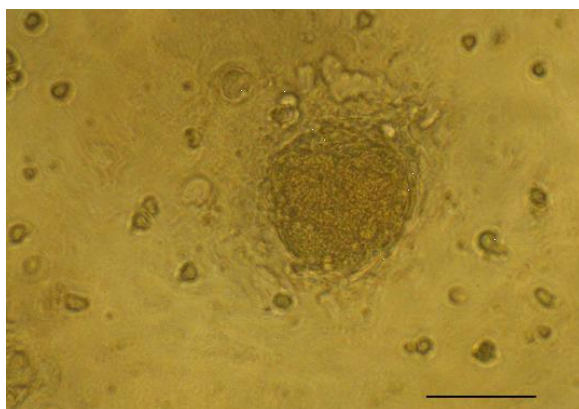
پس از شمارش و ارزیابی درصد حیات، تعداد ۵۰۰۰۰ سلول درون هر چاهک ریخته شد. از پلیت‌های چهارخانه‌ای مخصوص کشت سلول (TPP, Switzerland) استفاده گردید. به ترتیب گوده ۱ به گروه شاهد، گوده ۲ به گروه لامینین و گوده ۳ به گروه ماتریژل اختصاص یافت. گوده‌های مربوط (۲ و ۳) پیش از کشت به ترتیب با لامینین ۱ mg/ml (Sigma-Alcrich, L2۰۲۰, Matrix, Sigma-Alcrich, Germany) و ماتریژل ۰/۲٪ (Matrigel^R Germany) پوشیده و در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس چندبار با محلول بافر فسفات (PBS) شسته و برای

کشت سلول‌ها آماده گردیدند.

محیط کشت پایه شامل DMEM، حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین - استریتومایسین)، ۵ درصد FBS، ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر^۱ GDNF (Sigma-Aldrich, Germany)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر LIF^۲ (Sigma-Aldrich, Germany) و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر EGF^۳ (Sigma-Aldrich, Germany) است. سپس پلیت به انکوباتور (Memmert, Germany) ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد منتقل و به مدت ۱۰ روز کشت داده شد و هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید (با محیط پایه) و با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) مجهز به عدسی مدرج، تعداد کلونی‌ها شمارش و قطر کلونی‌ها اندازه‌گیری شد (شکل‌های ۱ و ۲). سپس با نرم‌افزار Image J (version; National Institutes of Health, Bethesda, MD, US) میلی‌مترمربع محاسبه گردید.



شکل ۱. کلونی‌های اسپرماتوگونی (پیکان) در روز هفتم کشت بر روی سلول‌های سرتولی قرار گرفته‌اند (میل: ۵۰ میکرومتر).



شکل ۲. در وسط تصویر، کلونی تمشکی‌شکل اسپرماتوگونی در روز دهم کشت در بستر پوشیده با لامینین مشاهده می‌شود (میل: ۱۰۰ میکرومتر).

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به روش ایمنوسیتوشیمی

به منظور تعیین هویت و ارزیابی بنیادینگی و ظرفیت خودنوزایی سلول‌های جدا شده از بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی (PGP9.5^۴, plzf^۵, ITGA6^۶, VASA-DDX4^۷) با آزمایش ایمنوسیتوشیمی بهره گرفته شد. تمامی مراحل آزمایش ایمنوسیتوشیمی نشانگرهای مورد اشاره طبق مطالعات پیشین انجام شد و به صورت خلاصه به شرح زیر است [۲۱، ۲۰].

اسمیر سلولی پیش از آنکه روی لام شیشه‌ای آغشته به پلی‌ال‌ل‌ل‌زین قرار داده شود، با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شد. علاوه بر این، اسلایدها با PBS حاوی ۱ درصد آلبومین سرم گاوی بلوکه شدند. پس از بلوکه کردن، سلول‌ها به مدت یک شب با آنتی‌بادی‌های اولیه شامل IgG پلی‌کلونال خرگوش ضد ۶-ITGA (۱:۵۰)، IgG پلی‌کلونال خرگوش ضد PGP9.5 (۱:۱۰۰)، IgG پلی‌کلونال خرگوش ضد plzf (۱:۱۰۰) و IgG پلی‌کلونال خرگوش ضد VASA (۱:۱۰۰) و سپس با آنتی‌بادی ثانویه FITC کنژوگه IgG (۱:۲۰۰) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس با TBS/BSA شست‌وشو داده شدند و در پایان با افزودن ۳.۳ دی‌آمینوبن‌زیدین رنگ نمایان شد. برای تشخیص هسته سلول‌های مورد نظر، از رنگ آمیزی DAPI (۴ و ۶ دی‌آمینو ۲-فنیل‌این‌دول دی‌هیدروکلراید) (Sigma, Poole, Dorset, United Kingdom) با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Japan) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده‌های جمع‌آوری شده از نظر نرمال بودن ارزیابی شدند. به علت عدم توزیع نرمال داده‌های مربوط به تعداد و مساحت کلونی‌ها، داده‌ها با استفاده از تست جانسون^۸ با نرم‌افزار Minitab 16 نرمال شدند. سپس روی داده‌ها آزمون آنالیز واریانس انجام شد و مقایسه میانگین تعداد و مساحت کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در تیمارهای مختلف و در روزهای مختلف کشت به کمک مدل آماری General Linear Model و با آزمون ANOVA (به همراه آزمون‌های تکمیلی Tukey and Fisher) در سطح ۵ درصد ($P < 0.05$) با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 صورت گرفت.

یافته‌ها

درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از جداسازی ۸۸/۱۴±۲/۶ درصد بود که پس از افزودن محلول انجماد و قبل از

^۵. promyelocytic leukaemia zinc finger

^۶. Integrin alpha-6

^۷. DEAD box polypeptide 4

^۸. Johnson Transformation

^۱. Glial cell line-derived neurotrophic factor

^۲. Leukemia inhibitory factor

^۳. Epidermal growth factor

^۴. Protein gene product 9.5

سرد کردن (تست سمیت محلول انجماد به $81/72 \pm 1/21$ درصد رسید ($P < 0/05$). پس از یخ‌گشایی، این میزان به $66/38 \pm 1/26$ رسید که با درصد حیات سلول‌ها پیش و پس از اضافه کردن محلول انجماد تفاوت معناداری دارد ($P < 0/05$).

نتایج اثرات روزهای مختلف کشت بدون در نظر گرفتن تیمارهای مختلف بر تعداد و مساحت سطح سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای مختلف کشت وجود دارد ($P < 0/05$). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، تعداد کلونی‌ها در روز ۱۰ کشت بیشینه بود و در روز ۴ در کمترین میزان خود قرار داشت ($111/67$ به $82/17$). همچنین، مساحت سطح کلونی‌های اسپرماتوگونی تحت‌تأثیر روزهای مختلف کشت قرار گرفت ($P < 0/05$). بیشترین مساحت سطح در روز دهم با $2/33$ و کمترین مساحت سطح با $0/5$ در روز ۴ کشت مشاهده شد که این امر در سیستم‌های کشتی که تمامی عوامل آن به‌درستی عمل می‌کند، طبیعی و قابل‌انتظار است و نشان‌دهنده سلامت وضعیت سلول‌ها (کلونی‌ها) و بهینه بودن شرایط کشت است.

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تعداد

کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت به ترتیب در سه گروه مورد مطالعه مقایسه شد. تعداد کل کلونی‌های شمارش‌شده بدون در نظر گرفتن روزهای مختلف در گروه لامینین ($118/92 \pm 6/2$) در مقایسه با گروه ماتریژل ($95/00 \pm 4/3$) و شاهد ($78/08 \pm 3/8$) به‌صورت معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$). در روز ۴ پس از کشت تعداد کلونی‌ها در گروه لامینین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). همچنین در روز هفتم و دهم پس از کشت نیز تعداد کلونی‌ها در گروه لامینین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و ماتریژل بود.

همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، مجموع مساحت‌های کلنی‌های اسپرماتوگونی (میلی‌مترمربع) تشکیل‌شده در محیط‌کشت در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از کشت به ترتیب در سه گروه مورد مطالعه (گروه ۱: گروه شاهد، گروه ۲: گروه درمان‌شده با لامینین، گروه ۳: گروه درمان‌شده با ماتریژل) مقایسه شد. مجموع مساحت کل کلونی‌های حاصل بدون در نظر گرفتن روزهای مختلف در گروه ماتریژل ($1/97 \pm 0/38$) و گروه لامینین ($1/37 \pm 0/30$) در مقایسه با گروه شاهد ($0/59 \pm 0/08$) به‌صورت معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$).

جدول ۱. اثرات روزهای مختلف نمونه‌برداری بر تعداد و مساحت سطح سلول‌های اسپرماتوگونی گوسفند

روز	تعداد کلنی	سطح کلنی
۴	$4/7 \pm 82/17^b$	$0/06 \pm 0/05^b$
۷	$6/4 \pm 98/17^{ab}$	$0/25 \pm 1/94^a$
۱۰	$6/8 \pm 111/67^a$	$2/0 \pm 23/35^a$

a-b، حروف غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌داری است.

جدول ۲. تعداد کلنی‌های اسپرماتوگونی شمارش‌شده در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ در سه گروه مورد مطالعه (گروه ۱: گروه شاهد، گروه ۲: لامینین، گروه ۳: ماتریژل - میانگین $\pm$ انحراف از معیار

گروه	روز ۴	روز ۷	روز ۱۰	جمع کل
۱ شاهد	$68/25 \pm 5/9^B$	$78/75 \pm 6/1^B$	$87/25 \pm 5/4^C$	$78/08 \pm 3/8^B$
۲ لامینین	$97/00 \pm 7/4^A$	$123/75 \pm 8/9^A$	$136/00 \pm 7/6^A$	$118/92 \pm 6/2^A$
۳ ماتریژل	$81/25 \pm 3/15^{AB}$	$92/00 \pm 2/8^B$	$117/75 \pm 4/8^B$	$95/00 \pm 4/3^B$

ABC: مقادیر با حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < 0/05$).

جدول ۳. مجموع مساحت کلنی‌های اسپرماتوگونی تشکیل‌شده در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ در سه گروه مورد مطالعه (گروه ۱: گروه شاهد، گروه ۲: گروه درمان‌شده با لامینین، گروه ۳: گروه درمان‌شده با ماتریژل (میانگین $\pm$ انحراف از معیار)

گروه	روز ۴ (mm^2)	روز ۷ (mm^2)	روز ۱۰ (mm^2)	جمع کل (mm^2)
۱	$0/34 \pm 0/06^B$	$0/56 \pm 0/06^B$	$0/88 \pm 0/13^B$	$0/59 \pm 0/08^B$
۲	$0/47 \pm 0/03^{AB}$	$1/13 \pm 0/33^{AB}$	$2/51 \pm 0/39^A$	$1/37 \pm 0/30^A$
۳	$0/69 \pm 0/09^A$	$1/90 \pm 0/50^A$	$3/31 \pm 0/38^A$	$1/97 \pm 0/38^A$

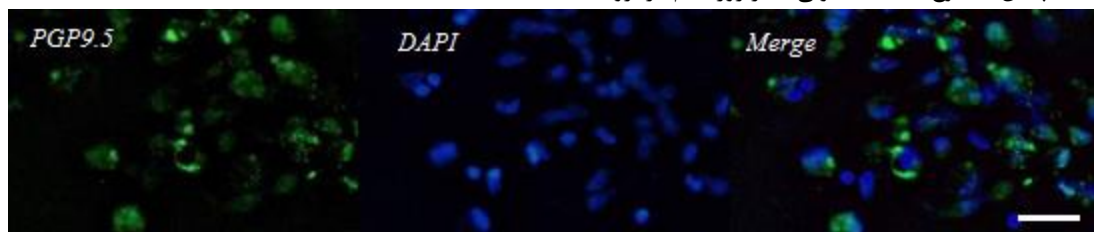
A B: مقادیر با حروف متفاوت در هر ستون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < 0/05$).

در روز ۴ پس از کشت، مجموع مساحت‌های کلنی‌ها در گروه ماتریژل ($0/69 \pm 0/09$) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد

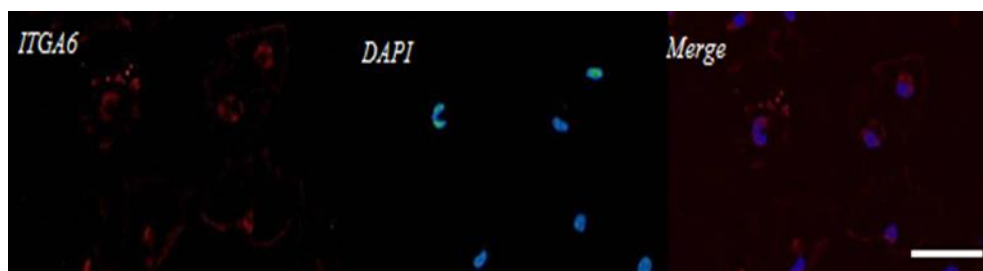
در روز ۴ پس از کشت، مجموع مساحت‌های کلنی‌ها در گروه ماتریژل ($0/69 \pm 0/09$) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد

ماتریژل ($3/31 \pm 0/38$) و لامینین ($2/51 \pm 0/39$) به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد ($0/88 \pm 0/13$) بود ($P < 0/05$).

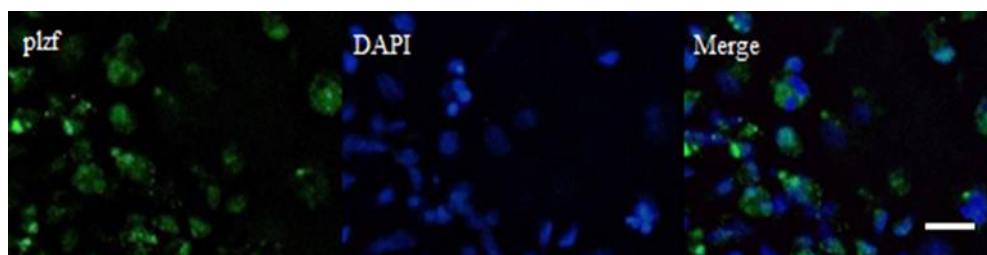
مساحت‌های کلنی‌های حاصل در گروه ماتریژل ($1/90 \pm 0/50$) به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($0/56 \pm 0/06$) ($P < 0/05$). همچنین مجموع مساحت کلونی‌ها در روز دهم در گروه



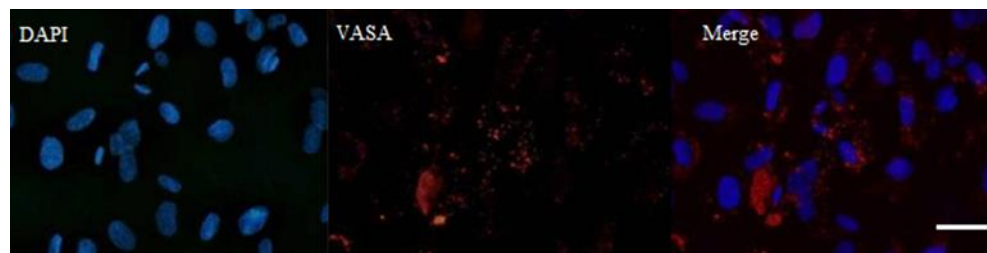
شکل ۳. تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با ایمنوسیتوشیمی علیه نشانگر PGP9.5 رنگ آمیزی هسته با تکنیک DAPI انجام شد (میل: ۳۰ میکرومتر)



شکل ۴. تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با ایمنوسیتوشیمی علیه نشانگر ITGA6 رنگ آمیزی هسته با تکنیک DAPI انجام شد (میل: ۳۰ میکرومتر)



شکل ۵. تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با ایمنوسیتوشیمی علیه نشانگر plzf رنگ آمیزی هسته با تکنیک DAPI انجام شد (میل: ۳۰ میکرومتر)



شکل ۶. تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با ایمنوسیتوشیمی علیه نشانگر VASA رنگ آمیزی هسته با تکنیک DAPI انجام شد (میل: ۳۰ میکرومتر)

نتایج

پستانداران صورت گرفته است [۲۳، ۲۴]. با این حال، استفاده ترکیبی تعدادی از این مارکرها قطعاً اطلاعات مهمی در خصوص چندوچون، وضعیت و ماهیت سلول‌های جدا شده ارائه می‌دهد. در مطالعه حاضر، به منظور تأیید وجود سلول اسپرماتوگونی در عملیات کشت سلولی و ماهیت بنیادینگی آن، از نشانگرهای تقریباً اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی (plzf, ITGA6, PGP9.5, VASA) و تکنیک ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. بیان ژن ITGA6 به عنوان نشانگری تقریباً قابل اطمینان در سلول‌های زایای موش و

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هدف مناسبی برای دست‌کاری‌های ژنتیکی رده سلول‌های زایای جنسی نر و تحقیقات در زمینه طب تولیدمثل محسوب می‌شوند و همچنین در تولید دام‌های تراریخته، داروهای نو ترکیب و درمان ناباروری کاربرد دارند [۲۲]. تاکنون نشانگرهای بیوشیمیایی یا بیوفیزیکی کاملاً اختصاصی برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کشف نشده‌اند، اگرچه تلاش‌های زیادی در زمینه انسان، پریمات‌ها و سایر

انسان به اثبات رسیده است [۲۰]. علاوه بر این، نشان داده شده است که مولکول‌های چسبنده مانند اینتگرین‌ها، بیان شده در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی، نقش مهمی در هدایت سلول بنیادی اسپرماتوگونی به سمت غشای پایه ایفا می‌کنند [۲۵]. همچنین، Plzf به عنوان یک نشانگر اختصاصی اسپرماتوگونی در انسان و برخی از حیوانات پذیرفته شده است [۲]. بیان ژن VASA و PGP9.5 در سلول‌های اسپرماتوگونی موش، انسان و بز به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در تداوم رشد سلول‌های تمایز نیافته اسپرماتوگونی به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه حاضر بسیار شبیه این مطالعات است [۲۶].

دستیابی به روش خالص‌سازی براساس ماتریکس برون سلولی مناسب از بین ماتریکس‌های برون سلولی موجود در بهبود شرایط کشت مهم خواهد بود؛ چراکه کشت و خالص‌سازی SSCs پیش‌نیاز انجام انجماد و نگهداری طولانی مدت آن‌ها در محیط آزمایشگاه و به دنبال آن کاشت و پیوند در شرایط درون تنی است و با توجه به اهمیت و جایگاه گونه دامی گوسفند در علم بیوتکنولوژی و تولید داروهای نو ترکیب خاص، ارزش انجام این کار در این گونه را بیان می‌کند [۱۶]. از این رو، هدف این مطالعه علاوه بر جداسازی و انجماد، بررسی تأثیر ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ماتریژل بر کلونیزاسیون این رده سلولی است.

در مطالعه حاضر دیده شد که محیط کشت پوشیده شده با لامینین در مقایسه با محیط کشت ماتریژل و گروه شاهد سبب افزایش تعداد کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده گردید که مشابه نتایج مطالعات پیشین است [۲۸، ۲۷]. لامینین علاوه بر اثرات مستقیم بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، می‌تواند با داشتن اثرات مثبت بر میزان زنده‌مانی و تمایز سلول‌های سرتولی اثرات غیرمستقیمی بر رشد و تقسیمات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیز داشته باشد. همچنین مشخص شد که سلول‌های سرتولی در محیط کشت لامینین به صورت معنی‌داری میزان بیشتری پروتئین کلی، پروتئین اتصال شونده به آندروژن، ترنسفرین و کلاژن نوع ۱ نسبت به کشت معمولی تولید می‌کنند که ظاهراً محیطی را برای تمایز سلول‌های زاینده در شرایط آزمایشگاهی به وجود می‌آورند. در نتیجه افزایش در تعداد و مساحت کلنی‌ها در مطالعه حاضر با گزارشات بالا همسوست و اثرات مثبت لامینین را تأیید می‌کند [۲۸، ۲۹].

در مطالعه حاضر مشخص شد که در محیط کشت غنی شده با ماتریژل، تعداد کلنی SSCs حاصل صرفاً به صورت عددی نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده، ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها به چشم نمی‌خورد. اما افزایش مساحت در کلنی‌ها در محیط ماتریژل بیانگر افزایش رشد به صورت معنی‌دار است. لی (Lee) نشان داد که کشت سلول‌های زایا به همراه سلول‌های سوماتیک اخذ شده از لوله‌های اسپرم‌ساز رت بر روی محیط دارای ماتریژل، پس از ۲۲ روز، رشد و تمایز بیشتری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان داده‌اند.

همچنین، این تفاوت در مورد گونه انسان نیز به چشم می‌خورد [۲۹]. اثر ماتریژل، به عنوان ماتریکس خارج سلولی، بر عملکرد سلول‌ها نه تنها از سیگنال‌های تولید شده توسط مولکول‌های موجود در این شبکه نشئت می‌گیرد، بلکه می‌تواند با ایجاد بستری مناسب جهت انتقال محرک‌های خارج سلولی، از جمله عوامل رشد و تمایز خارج سلولی باعث افزایش اثرات آن‌ها نیز شود [۲۹].

لی (Lee) و همکاران نشان دادند که سلول‌های کشت شده در محیط دارای ماتریژل به یکدیگر نزدیک بوده و فاصله بین سلولی کمتری دارند. از این رو، بیان شد که این فاصله کم بین سلول‌ها به صورت سه‌بعدی در محیط کشت، شباهت بیشتری به محیط درون تنی ایجاد کرده است. همچنین، فاصله کم بین سلول‌های سرتولی و زایا نیز می‌تواند با ارتباطات بین سلولی باعث اثرات مثبت بر تقسیمات سلول‌های زایا شود. از این رو، ماتریژل با ایجاد بستری در محیط کشت ممکن است باعث نگهداری طولانی مدت تر پاراکرین‌ها و اوتوکرین‌های مترشح از سلول‌های سرتولی شود که برای تقسیمات و تمایزات SSCs لازم است. همچنین، وجود چنین بستری علاوه بر نگهداری محرک‌های خارج سلولی، می‌تواند باعث انتقال بهتر این فاکتورها (فاکتورهای رشد و سیتوکاین) به سلول‌های هدف (سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی) شود [۳۰].

توکلی‌فر (Tavakolifar) و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند که مجموع مساحت‌های کلنی‌ها در گروه ماتریژل به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه لامینین بود. از آنجایی که در محیط ماتریژل دار، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تمایل بیشتری به اتصال به یکدیگر نسبت به اتصال با لامینین دارند، غنی‌سازی محیط کشت سلول با ماتریژل به صورت نسبی محیطی مشابه محیط درون تنی ایجاد می‌کند که باعث شروع فرایند تمایز در این سلول‌ها می‌شود [۲۹]. در حالی که در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو در محیط غنی شده با ماتریژل پس از گذشت ۱۲ روز به صورت معنی‌داری سبب افزایش تعداد کلنی می‌شود [۱۶]. البته در مطالعه ذکر شده مشخص شد که تعداد کلنی‌های به دست آمده در محیط همراه با ماتریژل، دارای سلول‌های تمایز یافته بیشتری نسبت به گروه شاهد بوده است. این افزایش تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط غنی با ماتریژل امکان دستیابی به سلول‌های اسپرماتوزوا را نیز فراهم می‌کند. به عبارت دیگر، کشت SSCs در محیط کشت معمولی (فاقد ماتریژل) باعث خودنوسازی این سلول‌ها و کشت در محیط دارای ماتریژل باعث تمایز بیشتر آن‌ها می‌شود که علت آن را به افزایش در بیان ژن KITLG در محیط دارای ماتریژل نسبت داده‌اند [۱۶]. البته درجه تمایز یافتگی سلول‌ها در مطالعه ما بررسی نشده و نیاز به مطالعات بیشتر و تکمیلی در این مورد در گونه گوسفند وجود دارد. در مطالعه‌ای بر روی موش گزارش شده است که بستر DTM (ماتریکس بیضه عاری از سلول) در مقایسه با لامینین و ماتریژل بیشتر تمایل دارد سلول‌های اسپرماتوگونی را به سمت اسپرماتید گرد

در گروه کشت شده بر روی لامینین، استفاده از آن به عنوان بستر، چه برای خالص سازی و چه برای کشت، توصیه می شود. مشخص کردن بهترین ماتریکس خارج سلولی جهت کشت کوتاه مدت و بلند مدت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی نیازمند انجام آزمون های تکمیلی مولکولی بیشتری است.

تشکر و قدردانی

از تمامی افرادی که ما را در این مقاله یاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

تضاد منافع

در پژوهش حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی را گزارش نکرده اند.

ملاحظات اخلاقی

تمامی موازین اخلاقی کار با حیوانات و حقوق حیوانات در این پژوهش مورد توجه بوده و با کد اخلاق IR.RAZI.REC. ۱۴۰۰.۰۶۰ مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی قرار گرفته است.

سهم نویسندگان

میرقیصری نویسنده اول؛ رحیمی فیلی نویسنده دوم؛ مقدم نویسنده سوم

حمایت مالی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری عمومی دام پزشکی و با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه رازی انجام شده است.

تمایز دهد؛ چراکه ماتریکس های خارج سلولی لامینین و ماتریژل فاقد اجزای آلی کمپلکس ماتریکس خارج سلولی بیضه اند [۳۱].

از این رو، فقدان این اجزای آلی به صورت ناخواسته سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را بیشتر به سمت تکثیر و تولید سوق می دهد تا تمایز که این امر در مطالعه ما اثرات و نتایج مثبتی دارد. اگرچه منشأ این امر به طور کامل شناسایی نشده است و بایستی در مطالعات آتی به صورت ویژه مورد توجه قرار گیرد. محیط های بر پایه ماتریکس کلاژن می توانند تا حدود زیادی ساختار ریز محیط لوله های منی ساز را برای سلول های اسپرماتوگونی شبیه سازی کنند. با این حال، تعداد سلول های سوماتیک (سرتولی) حاضر در کشت و حضور فاکتورهای رشد مختلف مترشحه از جمله FGF، GDNF، LIF و... نقش بسیار مهمی در پیشبرد روند به سمت تولید یا تمایز سلول های اسپرماتوگونی ایفا می کنند [۳۲].

نتیجه گیری

لامینین و ماتریژل هریک می توانند با اثرات مثبت بر رشد و تقسیمات سلول های بنیادی اسپرماتوگونی باعث بهبود کشت در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی شوند. به نظر می رسد که با بهبود محیط کشت با لامینین می توان به تعداد و اندازه کلنی های اسپرماتوگونی حاصل در شرایط آزمایشگاهی افزود. همچنین اضافه کردن ماتریژل، به عنوان ماتریکس خارج سلولی، می تواند فقط باعث افزایش در مساحت کلنی ها شود. از این رو، با توجه به افزایش هم زمان تعداد و مساحت کلونی های حاصل از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی

REFERENCES

- Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev.* 2012;**92**(2):577-95. DOI: [10.1152/physrev.00025.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011)
- Wu S, Cheng Z, Peng Y, Cao Y and He Z. GPx3 knockdown inhibits the proliferation and DNA synthesis and enhances the early apoptosis of human spermatogonial stem cells via mediating CXCL10 and cyclin B1. *Front Cell Dev Biol.* 2023;**11**:1213684. PMID: [37484915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37484915/) DOI: [10.3389/fcell.2023.1213684](https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1213684)
- Morimoto, Hiroko et al. Restoration of fertility in nonablated recipient mice after spermatogonial stem cell transplantation. *Stem Cell Reports.* 2024;**19** (4): 443–55. PMID: [38458191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38458191/) DOI: [10.1016/j.stemcr.2024.02.003](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2024.02.003)
- Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod.* 2003;**69**(4):1260-4. PMID: [12801978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12801978/) DOI: [10.1095/biolreprod.103.018788](https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018788)
- Tharakan T, Luo R, Jayasena CN, Minhas S. Non-obstructive azoospermia: current and future perspectives. *Fac Rev.* 2021;**10**:7. PMID: [33659925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33659925/) DOI: [10.12703/rl/10-7](https://doi.org/10.12703/rl/10-7)
- 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11105904/)
- Wang YK, Wang YH, Wang CZ, Sung JM, Chiu WT, Lin SH, Chang YH, Tang MJ. Rigidity of collagen fibrils controls collagen gel-induced down-regulation of focal adhesion complex proteins mediated by $\alpha 2 \beta 1$ integrin. *J Biol Chem.* 2003;**278**(24):21886-92. Link
- Salem M, Khadivi F, Javanbakht P, Mojaverrostami S, Abbasi M, Feizollahi N, et.al. Advances of three-dimensional (3D) culture systems for in vitro spermatogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2023;**14**(1):262. PMID: [37735437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37735437/) DOI: [10.1186/s13287-023-03466-6](https://doi.org/10.1186/s13287-023-03466-6)
- Murdock MH, David S, Swinehart IT, Reing JE, Tran K, Gassei K, Orwig KE, Badyak SF. Human Testis Extracellular Matrix Enhances Human Spermatogonial Stem Cell Survival *In Vitro.* *Tissue Eng Part A.* 2019;**25**(7-8):663-76. PMID: [30311859](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30311859/) DOI: [10.1089/ten.TEA.2018.0147](https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2018.0147)
- Agmon G, Christman KL. Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2016;**20**(4):193-201. PMID: [27524932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27524932/) DOI: [10.1016/j.cossms.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.02.001)
- Binsila KB, Selvaraju S, Ghosh SK, Parthipan S, Archana SS, Arangasamy A, Prasad JK, Bhatta R, Ravindra JP. Isolation and enrichment of putative spermatogonial stem cells from ram (Ovis aries) testis. *Anim Reprod Sci.* 2018;**196**:9-18. PMID: [29861343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29861343/) DOI: [10.1016/j.anireprosci.2018.04.070](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.070)
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol Reprod.* 2011;**84**(1):97-105. PMID: [20844279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20844279/) DOI: [10.1095/biolreprod.110.086462](https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086462)
- Kim YH, Kang HG, Kim BJ, Jung SE, Karmakar PC, Kim SM, Hwang S, Ryu BY. Enrichment and *In Vitro* culture of spermatogonial stem cells from pre-pubertal monkey testes. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;**14**(5):557-66. PMID: [30603509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30603509/) DOI: [10.1007/s13770-017-0058-x](https://doi.org/10.1007/s13770-017-0058-x)
- Ahmad S, Xiao Y, Han L, Hua H, Riaz H, Liang A, Yang LG. Isolation, identification and enrichment of type a spermatogonia from the testis of Chinese cross-bred buffaloes (swamp × river). *Reprod Domest*

- Anim.* 2013;**48**(3):373-81. [PMID: 22928737](#) [DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02159.x](#)
15. Khajavi N, Akbari M, Abdolsamadi HR, Abolhassani F, Dehpour AR, Koruji M, Habibi Roudkenar M. Role of Somatic Testicular Cells during Mouse Spermatogenesis in Three-Dimensional Collagen Gel Culture System. *Cell J.* 2014;**16**(1):79-90. [PMID: 24518977](#)
 16. Akbarinejad V, Tajik P, Movahedin M, Youssefi R, Shafiei S, Mazaheri Z. Effect of extracellular matrix on bovine spermatogonial stem cells and gene expression of niche; regulating their development in vitro. *Anim Reprod Sci.* 2015;**157**: 95-102. [PMID: 25912341](#) [DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.04.003](#)
 17. Wang Z, Jin C, Li P, Li Y, Tang J, Yu Z.. Identification of quiescent FOXC2+ spermatogonial stem cells in adult mammals. *Elife.* 2023;**12**:RP85380. [PMID: 37610429](#) [DOI: 10.7554/eLife.85380](#)
 18. Torabi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A. The effect of insulin-like growth factor-1 on the proliferation of goat spermatogonial stem cells (SSCs) in vitro. *Feyz Med Sci J.* 2023; **27** (2) :154-63. [DOI: 10.48307/FMSJ.2023.27.2.154](#)
 19. Ahmadi M, Rahimi-Feyli P, Moghaddam A, Alimohammadi S. Assessment of the cryoprotective effects of fetal bovine serum (FBS) and trehalose on the viability rate of caprine spermatogonial stem cells (SSCs). *Feyz Medical Sciences Journal.* 2021;**25**(1):714-23. [DOI: 10.48307/FMSJ.2021.25.1.714](#)
 20. Reza E, Azizi H, Skutella T. Sox2 Localization During Spermatogenesis and Its Association with other Spermatogenesis Markers Using Protein-Protein Network Analysis. *J Reprod Infertil.* 2023;**24**(3):171-80. [PMID: 37663428](#) [DOI: 10.18502/jri.v24i3.13273](#)
 21. Song Y, Zhang X, Desmarais JA, Nagano M. Postnatal development of mouse spermatogonial stem cells as determined by immunophenotype, regenerative capacity, and long-term culture-initiating ability: a model for practical applications. *Sci Rep.* 2024;**14**(1):2299. [PMID: 38280889](#) [DOI: 10.1038/s41598-024-52824-8](#)
 22. Xi HM, Ren YJ, Ren F, Li Y, Feng TY, Wang Z, Du YQ, Zhang LK, Hu JH. Recent advances in isolation, identification, and culture of mammalian spermatogonial stem cells. *Asian J Androl.* 2022;**24**(1):5-14. [PMID: 34135169](#) [DOI: 10.4103/aja.aja_41_21](#)
 23. Bush SJ, Nikola R, Han S, Suzuki S, Yoshida S, Simons BD, Goriely A. Adult Human, but Not Rodent, Spermatogonial Stem Cells Retain States with a Foetal-like Signature. *Cells.* 2024; **13**(9):742. [PMID: 38727278](#) [DOI: 10.3390/cells13090742](#)
 24. Yang H, Ma J, Wan Z, Wang Q, Wang Z, Zhao J, Wang F, Zhang Y. Characterization of sheep spermatogenesis through single-cell RNA sequencing. *The FASEB Journal.* 2021;**35**(2):e21187. [DOI: 10.1096/fj.202001035RRR](#)
 25. de Rooij DG, Repping S, van Pelt AM. Role for adhesion molecules in the spermatogonial stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2008;**3**(5):467-8. [PMID: 18983958](#) [DOI: 10.1016/j.stem.2008.10.010](#)
 26. Nabulindo NW, Nguhiu-Mwangi J, Kipyegon AN, Ogugo M, Muteti C, Christian T, Oatley MJ, Oatley JM, Kemp S. Culture of Kenyan Goat (*Capra hircus*) Undifferentiated Spermatogonia in Feeder-Free Conditions. *Front Vet Sci.* 2022;**19**:894075. [PMID: 35928111](#) [DOI: 10.3389/fvets.2022.894075](#)
 27. Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ikawa M, Nakamura T, Ogura A, Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod.* 2008;**78**(4):681-7. [PMID: 18199882](#) [DOI: 10.1095/biolreprod.107.066068](#)
 28. Tavakolifar F, Shahverdi S, Pirouz M, Shakeri M, Korouji S M, Baharvand H. The Effect of Laminin and Gelatin Extracellular Matrix on Short-Term Cultivation of Neonate Mouse Spermatogonial Stem Cells. *ASJ.* 2010; **8** (30) :37-48. [Link](#)
 29. Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials.* 2006;**27**(14):2845-53. [PMID: 16430959](#) [DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.028](#)
 30. Lee JH, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park DW, Lee SJ, Min CK. In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertility and sterility.* 2007;**87**(4):824-33. [DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.09.015](#)
 31. Yang Y, Lin Q, Zhou C, Li Q, Li Z, Cao Z, Liang J, Li H, Mei J, Zhang Q, Xiang Q, Xue W and Huang Y. A Testis-Derived Hydrogel as an Efficient Feeder-Free Culture Platform to Promote Mouse Spermatogonial Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Front. Cell Dev Biol.* 2020; **8**:250. [DOI: 10.3389/fcell.2020.00250](#)
 32. Weinbauer GF, Wessels J. 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrologia.* 1999;**31**(5):249-62. [PMID: 10526633](#) [DOI: 10.1046/j.1439-0272.1999.00295.x](#)