تولیدات دامی
دوره ۱۷ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه‌های ۳۸۹-۳۸۱

کاربرد STO به‌عنوان لایهٔ غذادهنده در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس

رسول کریمی[۱]، ملک شاکری[۲*]، مهدی ژندی[۲]، حسین مروج[۳]، هانیه بنی‌کمال[۱]، عبداله محمدی سنگ‌چشمه[۴]، مهدی خدایی‌مطلق[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲. استادیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۳. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۴. استادیار گروه دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت
۵. استادیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۳/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۴/۰۸

چکیده

در این تحقیق، اثر لایهٔ غذادهندهٔ STO بر کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) خروس نابالغ در محیط آزمایشگاهی ارزیابی شد. سلول‌های بیضه، از تعداد ۳۰ قطعه خروس نابالغ نژاد ردآیلندرد (۸-۴ هفته) جدا و در ظرف‌های کشت چهارخانه‌ای به‌طور جداگانه و در حضور فاکتورهای رشد bFGF و LIF در دو تیمار، سه تکرار، و پنج مشاهده در هر تکرار کشت داده شدند. کلنی‌های SSCs در روز پنجم ظاهر و در روزهای هفتم و دهم ارزیابی شدند. تعداد کلنی‌های ایجادشده، مساحت کلنی، و تعداد سلول در هر کلنی روی لایهٔ غذادهنده در مقایسه با کلنی‌های کشت‌شده بدون لایهٔ غذادهنده بیشتر بود ($P\leq ۰/۰۵$). نتایج ارزیابی در روز ۱۰ کشت نشان‌دهندهٔ کاهش تعداد کلنی، مساحت کلنی، و تعداد سلول/کلنی در هر دو تیمار به نسبت روز هفت کشت است. ژن C-KIT در سلول‌های تشکیل‌دهندهٔ کلنی‌ها بیان نشد که می‌تواند دال بر عدم تمایز و داشتن توان خودنوزایی سلول‌های موجود در کلنی‌ها باشد. براساس نتایج تحقیق حاضر، استفاده از لایهٔ غذادهندهٔ STO در کشت و تکثیر SSCs خروس نابالغ مناسب است و توان این سلول‌ها را در تکثیر و خودنوزایی در مقایسه با کشت در تیمار بدون استفاده از لایهٔ غذادهنده به‌طور بهتری حفظ می‌کند.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی طیور، کشت کوتاه‌مدت، کلنی سلولی، لایهٔ غذادهندهٔ سلولی.

* نویسنده مسئول Email: mshaker@ut.ac.ir

مقدمه

تحولات علمی در سال‌های اخیر، نگاه جدیدی را در تولیدمثل حیوانات مزرعه‌ای با استفاده از حیوانات تراریخته به‌وجود آورده است. یکی از این تحولات، علم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و پیوند سلول‌های زاینده است. نتایج به‌دست آمده از استفادهٔ آن در جوندگان فرصت مناسبی را ایجاد کرده است تا به کاربرد آن نیز در علوم دامی به‌منظور ایجاد حیوانات تراریخته توجه شود [۶]. برای مثال، می‌توان مواردی مانند تولید پروتئین‌هایی که جنبهٔ دارویی دارند، در شیر بزهای تراریخته با ارزش اقتصادی را نام برد [۸]. نظر به اینکه صنعت مرغداری از پردرآمدترین صنعت‌های حوزهٔ دام و طیور است و توان بالای دستکاری ژنتیکی، شمار زیاد نتاج، و فاصلهٔ کوتاه نسل در طیور در مقایسه با پستانداران، باعث شده است تا استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در ایجاد طیور تراریخته و تولید پروتئین‌های دارویی و صنعتی منافع اقتصادی زیادی را به دنبال داشته باشد. افزون بر آن با استفاده از این علم، امکان ایجاد حیوانات مقاوم به بیماری‌های گوناگون را نیز به همراه می‌آورد [۱۹، ۱۴، و ۸].

جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه در میان سایر سلول‌های زاینده بسیار کم است (۰/۰۳درصد) و نشانگرهای اختصاصی در آنها کاملاً شناسایی نشده است. بنابراین بهبود و تکامل تکنیک جداسازی و تکثیر برای دسترسی به جمعیت زیادتری از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اهمیت زیادی دارد [۱].

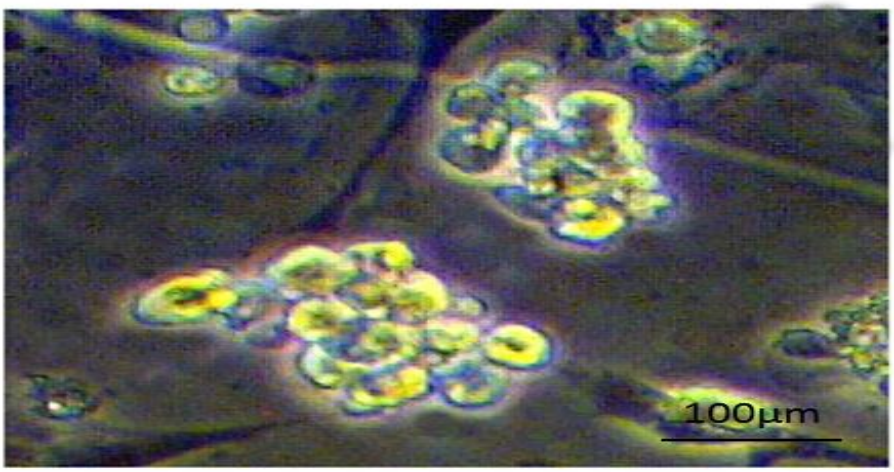
یکی از عوامل مهم در بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی در محیط کشت، استفاده از لایهٔ غذادهنده است. به‌نظر می‌رسد که اثر سودمند سلول‌های لایهٔ غذادهنده در طی مدت کشت به‌دلیل همکاری بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های غذادهنده باشد. این امر احتمالاً به‌دلیل حضور فاکتورهای رشد و سایتوکین‌هایی است که سلول‌های لایهٔ غذادهنده در محیط ترشح می‌کنند. تحقیقات در طی سال‌های اخیر، اثر لایهٔ غذادهنده بر بقای سلول‌های SSCs را در محیط برون‌تنی تأیید می‌کند[۴،۱]. عملکرد هر سلول تحت‌تأثیر عوامل و محیط داخل‌سلولی و محیط و عوامل خارج‌سلولی است [۱۳]. به همین دلیل، در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آزمایشگاه، اغلب آنها روی لایهٔ غذادهنده‌ای که تمایزشان مهار شده است، کشت می‌شوند. متداول‌ترین لایهٔ غذادهنده برای SSCs در پستانداران، دودمان سلول فیبروبلاست STO است [۱۰]. اطلاعاتی درخصوص امکان استفاده این سلول‌ها در کشت SSCs طیور وجود ندارد.

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر همکشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس نابالغ ردآیلندرد با لایه‌های غذادهنده بر تکثیر و بقای آنان و بیان مارکرهای اختصاصی بود.

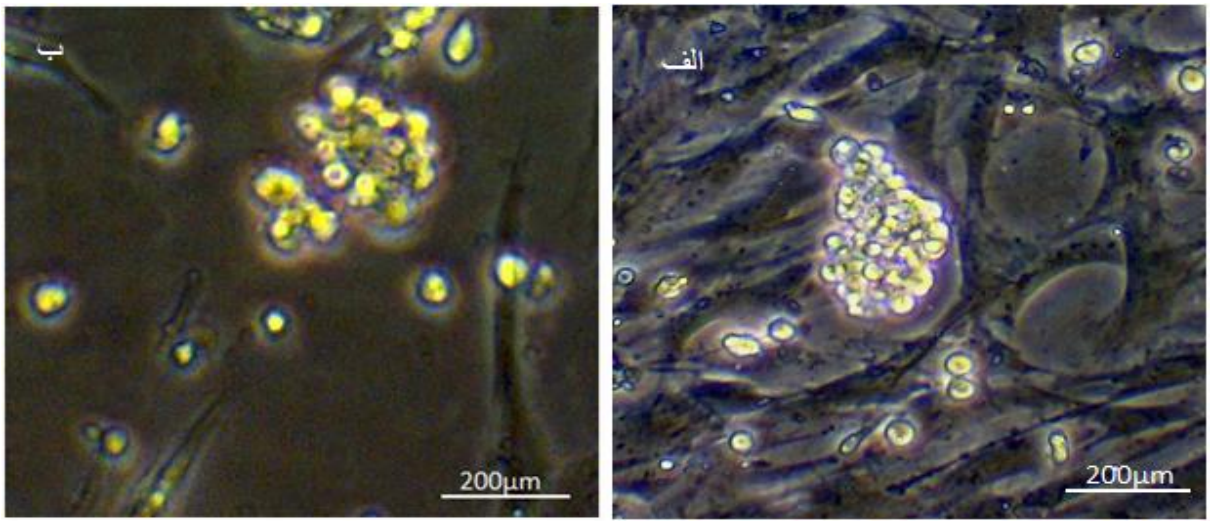
مواد و روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی و محیط‌های کشت استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر از شرکت‌های سیگما و گیب‌کو تهیه شد. بیضه‌ها از تعداد ۳۰ خروس نابالغ (سن ۸-۴ هفته) نژاد ردآیلندرد سالم، جدا شدند. بعد از جداسازی و شستشو با بافرفسفات (PBS)، نمونهٔ بیضه‌ها مخلوط و به قطعات ریز خرد شدند. پس از برداشتن کپسول بیضه‌ها به پتریدیش حاوی محیط "دی ام ای ام" (DMEM) منتقل شدند و با روش دومرحله‌ای هضم آنزیمی شامل آنزیم‌های کلاژناز، دیسپاز، و تریپسین به‌ترتیب با غلظت‌های دو، یک، و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر، سوسپانسیون سلولی حاصل برای حذف قطعات لوله‌ای باقیمانده از فیلتر نایلونی ۷۰ میکرومتر عبور داده شد [۳]. سوسپانسیون حاصل به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند و تعداد 5×10^5

سلول به‌طور مساوی در خانه‌های یک ظرف کشت چهارخانه‌ای توزیع شدند. محیط کشت به‌کاررفته برای سلول‌ها شامل DMEM حاوی یک‌درصد سرم جنین گاو (FBS) بود که با فاکتورهای رشد bFGF (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و LIF (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)[۴] غنی‌سازی شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد دی‌اکسیدکربن برای ۷ تا ۱۰ روز انکوبه شدند و هر ۷۲ ساعت محیط آنها تعویض شد [۱۰]. پنج روز بعد، کلنی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی ظاهر شد (شکل‌های ۱ و ۲). در طول مدت کشت تست‌های مربوط به تعیین هویت و تست‌های کمّی و کیفی در روزهای ۷ و ۱۰ بعد از انکوباسیون انجام شد.



شکل ۱. مورفولوژی کلنی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که به‌صورت خوشهٔ انگور است، سلول‌ها در کلنی به‌طور مجزا از هم قابل رؤیت است.



شکل ۲. مورفولوژی کلنی اسپرماتوگونی کشت شده: الف) روی لایهٔ غذادهندهٔ STO، و ب) بدون لایهٔ غذادهنده

بعد از تکثیر و پرشدن کف ظرف با سلول‌های غذادهندهٔ STO، با استفاده از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مایتومایسین c برای ۱/۵ تا ۳ ساعت، رشد آنها متوقف شد. سپس سلول‌های اسپرماتوگونی روی این سلول‌ها انتقال داده و به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز کشت شدند.

کلنی‌های مشتق‌شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۷ و ۱۰ پس از کشت در چاهک‌های ظرف کشت ازنظر تعداد و تعداد سلول به‌ازای هر کلنی و مساحت کلنی ارزیابی شدند. شمارش کلنی‌ها با کمک‌گرفتن از ورقهٔ شفاف شطرنجی‌شده که به زیر ظرف کشت چهارخانه‌ای متصل شده بود و با میکروسکوپ معکوس، با بزرگ‌نمایی ۱۰ به دقت انجام گرفت. مساحت کلنی‌ها نیز با کمک میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین و نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سلول به‌ازای هر کلنی، تعداد مشخصی از کلنی‌ها (۳۰ عدد) به‌طور مکانیکی با پیپت پاستور از کف کشت جدا شدند. سپس سلول‌ها با آنزیم تریپسین (۰/۲۵درصد) از هم جدا شدند. سلول‌های منفرد به‌دست‌آمده در هر تیمار با لام نئوبار و با کمک میکروسکوپ معکوس شمارش شدند.

برای بررسی بیان ژن اختصاصی C-KIT که بیانگر تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است، سلول‌های حاصل از کلنی‌های اسپرماتوگونی و همچنین پرایمرهای طراحی‌شدهٔ مربوط به رونوشت‌های خاص C-KIT با اندازهٔ ۱۶۷ bp و GAPDH با اندازهٔ ۱۴۲ bp (جدول ۱) با روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ارزیابی شدند. بلافاصله پس از هضم آنزیمی سلولی، RNA سلول‌های اسپرماتوگونی، با روش دستی و استفاده از محلول بافری RNX استخراج شد. سپس با نسخه‌برداری معکوس، رشتهٔ DNA از روی الگوی RNA ساخته شد و PCR ژن‌ها با دستگاه ترموسیکلر انجام شد. درنهایت محصول PCR روی ژل آگارز منتقل و سپس با دستگاه ترانس لومیناتور فرابنفش، ارزیابی شد. در این تحقیق، از ژن خانه‌دار GAPDH، به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمری ژن‌های استفاده‌شده در آزمایش

Genes	Primer sequences(5’-3’)	Annealing Tempreture (°C)	size(bp)
C-KIT	F: 5 ‘ACAAACTCATCGGTGCCATC3’ R: 5 ‘AGGGTGTGGGTACGGATTTG3’	۶۰	۱۶۷
GAPDH	F: 5’ TCACAGCCACACAGAAGACG3’ R: 5’ AGCTTCCCATTCAGCTCAGG3’	۶۰	۱۴۲

داده‌های حاصل به‌صورت آزمایش فاکتوریل ۲×۲ با دو عامل لایهٔ غذادهنده (با دو سطح حضور و عدم حضور لایهٔ غذادهنده) و زمان (با دو سطح ۷ و ۱۰ روز) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پنج مشاهده در هر تکرار، با نرم‌افزار آماری SAS (نسخهٔ ۹.۱) رویهٔ مدل‌های خطی عمومی برای مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند:

$$Y_{ijk}=\mu+N_i+T_j+(N\times T)_{ij}+e_{ijk} \quad (۱)$$

در این رابطه: Y_{ijk} مقدار صفت موردنظر، μ میانگین کل، N_i اثر iامین تیمار، T_j اثر jامین زمان، $(N\times T)ij$ اثر متقابل زمان با تیمار، و e_{ijk} خطای آزمایشی است.

نتایج

یکی از راه‌های شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شکل ظاهر آن‌ها در سیستم کشت آزمایشگاهی است. در مطالعهٔ حاضر، سلول‌هایی که ظاهر کروی داشتند (سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی)، عمدتاً ایجاد کلنی‌های خوشه‌ای و یا گرد با محیطی نامنظم کردند (شکل ۱). براساس مطالعات انجام‌شده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی سلول‌هایی کروی و با هستهٔ بزرگ و یوکروماتین هستند که قسمت اعظم سلول را اشغال کرده‌اند. همچنین ارگانل‌های سیتوپلاسمی دارند [۲۲، ۱۵]، هنگامی‌که سلول‌های مذکور در محیط کشت آزمایشگاهی تشکیل کلنی می‌دهند، عمدتاً کلنی‌های گرد با حاشیه‌ای نامنظم همانند مورولا و یا به‌صورت خوشه انگوری ایجاد می‌کنند، به‌طوری‌که سلول‌های منفرد اسپرماتوگونی در آن‌ها کاملاً مشخص هستند [۱۱]. منفردبودن سلول‌های موجود در کلنی به‌عنوان وجه تمایز کلنی‌های متشکل از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، از سایر کلنی‌های متشکل از سلول‌های پرتوان مشاهده شده است [۲۱]. بنابراین در مطالعهٔ حاضر ازنظر ریخت‌شناسی و مورفولوژی کلنی‌های ایجادشده مشابه نتایج سایر پژوهش‌های ذکرشده بود و می‌توان آنها را به‌عنوان کلنی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شناخت.

میانگین تعداد سلول به‌ازای کلنی، مساحت کلنی، و تعداد کلنی در جدول ۲ آورده شده است. تعداد کلنی‌ها، مساحت کلنی‌ها، و تعداد سلول به‌ازای کلنی، هنگام استفاده از لایهٔ غذادهنده، افزایش یافت ($P\leq ۰/۰۵$). اثر مدت انکوباسیون بر تعداد کلنی معنی‌دار نبود، ولی میانگین مساحت کلنی و میانگین تعداد سلول به‌ازای هر کلنی در روز دهم بعد از انکوباسیون کمتر از روز هفتم کشت بود ($P\leq ۰/۰۵$).

در اثر متقابل STO × زمان، به‌جز میانگین تعداد سلول به‌ازای هر کلنی، سایر موارد معنی‌دار نگردید ($P\leq ۰/۰۵$) (جدول ۳). هرچند که همهٔ موارد ارزیابی (میانگین تعداد کلنی و میانگین تعداد سلول به‌ازای کلنی و مساحت کلنی) در اثر متقابل تیمار STO و روز دهم در مقایسه با تیمار STO و روز هفتم کشت کاهش یافته بود.

جدول ۲. میانگین (± انحراف معیار) تعداد کلنی، میانگین مساحت کلنی، و تعداد سلول به‌ازای هر کلنی در کشت SSCs

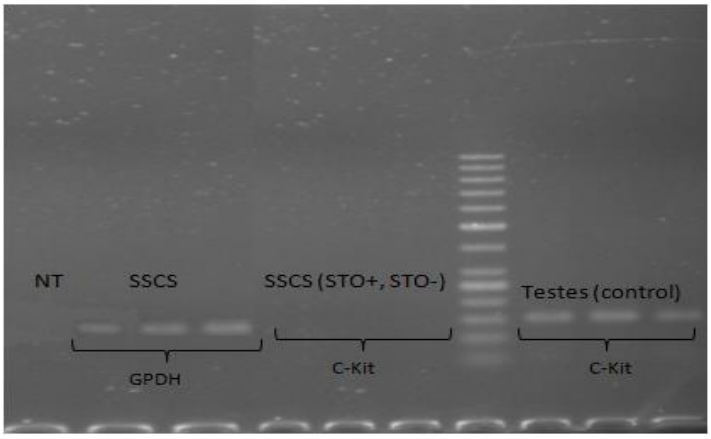
	فاکتور	میانگین تعداد کلنی	میانگین مساحت کلنی (μm^2)	میانگین تعداد سلول به‌ازای هر کلنی
STO	حضور	۱۰/۶۰۷ ± ۰/۵۱۴[a]	۱۶۶/۱۳۹۵ ± ۱/۹۴۲[a]	۱۷ ± ۰/۵۶۵[a]
	عدم	۷/۹۹ ± ۰/۵۳۳[b]	۱۲۹/۴۲۱۳ ± ۱/۹۴۲[b]	۱۱/۳۶۶ ± ۰/۵۶۵[b]
زمان	روز ۷	۹/۳۸۴ ± ۰/۵۲۴[a]	۱۵۹/۴۲۰۷ ± ۱/۹۴۲[a]	۱۷/۷ ± ۰/۵۶۵[a]
	روز ۱۰	۹/۲۱۴ ± ۰/۵۲۳[a]	۱۳۶/۱۴۰۰ ± ۱/۹۴۲[b]	۱۲/۶۶ ± ۰/۵۶۵[b]

a-b: **تفاوت ارقام** در هر ستون مربوط به هر کدام از عامل‌ها، با حروف غیرمشابه معنی‌دار است ($P\leq ۰/۰۵$).

جدول۳. اثر متقابل STO و زمان بر میانگین (± خطای استاندارد) تعداد کلنی، مساحت کلنی، و میانگین تعداد سلول به‌ازای هر کلنی حاصل از کشت SSCs

تیمار	میانگین تعداد کلنی	میانگین مساحت کلنی (μm^2)	میانگین تعداد سلول به‌ازای هر کلنی
STO^+ × روز ۷	۱۱/۲۱۴۲ ± ۰/۷۴۰۳	۱۷۵/۸۶۲۴ ± ۲/۷۴۷۲	۱۷/۰۶۶ ± ۰/۷۹۹۴ [a]
STO- × روز ۷	۸/۷۶۹ ± ۰/۷۶۸۲	۱۴۲/۹۷۹ ± ۲/۷۴۷۲	۱۶/۹۳ ± ۰/۷۹۹۴ [a]
STO+ × روز ۱۰	۱۰ ± ۰/۷۱۵۲	۱۵۶/۴۱۶۵ ± ۲/۷۴۷۲	۱۴/۳۳ ± ۰/۷۹۹۴[a]
STO- × روز ۱۰	۷/۲۱۴۲ ± ۰/۷۴۰۳	۱۱۵/۸۶۳ ± ۲/۷۴۷۲	۸/۴ ± ۰/۷۹۹۴[b]

a-b: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (**P≤۰/۰۵**).



شکل ۳. نتایج حاکی از عدم بیان ژنc-KIT ، +STO=گروه با حضور لایهٔ غذادهنده، -STO=گروه بدون حضور لایهٔ غذادهنده، TC=گروه کنترل مثبت (بافت بیضه)، NT = گروه کنترل منفی، GAPDH=ژن مرجع

نتایج حاصل از RT-PCR درهر دو تیمار نشان داد که سلول‌های تشکیل‌دهندهٔ کلنی‌ها، ژن C-KIT را به‌طور نسبی به مقدار کم یا اصلاً بیان نکرده‌اند (شکل ۳). باتوجه به بیان ژن C-KIT که از آن به‌عنوان ژن تمایزی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یاد کرده‌اند [۲، ۱۹، و ۲۱]، درصد نسبتاً بالای بیان آن می‌تواند این ابهام را ایجاد کند که تعداد شایان توجهی از سلول‌ها، از حالت خودنوزایی تغییر کردند و به‌سمت تمایز پیش رفته‌اند. در مقابل، نشان داده شده است که ژن C-KIT می‌تواند در تکثیر و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی چه در پستانداران و چه در طیور نقش مؤثر داشته باشد [۱۴، ۹ و ۸]. با اینکه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خصوصیات مشترکی با سایر سلول‌های بنیادی دارند اما دارای ویژگی خاص خود نیز هستند. با وجود این تاکنون مولکول اختصاصی و منحصر به فردی برای آن شناسایی نشده است [۲۵]. بر همین اساس، محققان ذکر کردند که به‌نظر می‌آید بیان ژن C-KIT در سطح mRNA در سلول‌های تمایزیافتهٔ اسپرماتوگونی افزایش می‌یابد [۲۳، ۲۲، و ۲]. نتایج این تحقیق می‌تواند تأییدی بر این باشد که سلول‌های تشکیل‌دهندهٔ کلنی‌ها خاصیت خودنوزایی خود را حفظ کرده‌اند و به سمت تمایز پیش نرفته‌اند.

حفظ و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌دلیل

سخت‌بودن بقای سلول‌هایی با منشای سلول‌های زاینده در محیط کشت آزمایشگاهی [۱۷، ۱۲]، توان کم تکثیر، و یا عدم تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی [۱۷، ۷]، کاهش تکثیر در طی مدت کشت [۱۸] و عدم زنده‌ماندن در طول زمان کشت بسیار مشکل است [۱۶، ۵]. بنابراین به‌منظور نگهداری (بقا و تکثیر) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوع A و یا اختصاصاً برای اثبات این سلول‌ها ازطریق پیوند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پستانداران به‌مدت کوتاهی (۷ روز) کشت می‌شوند [۲۱، ۲۰، و ۲]. در برخی موارد، طول دورهٔ کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در طیور حدود دو هفته است [۱۰]. در هر حال در هفتهٔ اول کشت، میزان تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به نسبت زمان بعد از آن بیشتر است و با گذشت زمان از این میزان کاسته می‌شود [۲۰]. تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در کشت کوتاه‌مدت در پایان هفتهٔ اول حدود (۲۴-۱۰درصد) کاهش می‌یابد [۴].

به‌کارگیری لایهٔ غذادهندهٔ STO در حضور فاکتورهای رشد، موجب می‌شود تا سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس نابالغ در طی ۷ روز اول کشت به مانند سلول‌های اسپرماتوگونی در پستانداران تکثیر بیشتری یابد (جدول ۲). افزون بر آن، افزایش طول مدت کشت در این آزمایش به ۱۰ روز نشان داد که اثر لایهٔ غذادهنده بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس نابالغ پایدار نیست و به‌طور عمده، تکثیر این سلول‌ها در همان هفتهٔ اول کشت صورت می‌گیرد (جدول ۲).

بهبود تغذیهٔ سلول‌ها و یا احتمالاً جلوگیری از مرگ آن‌ها در طی کشت کوتاه‌مدت به‌دلیل فاکتورهای رشد ترشح شده از سلول‌های لایهٔ غذادهنده می‌تواند موجب بروز تأثیر مثبت بر کلنی‌ها شود. در مقابل، در روز ۱۰ کشت (تأثیر متقابل فاکتور زمان و تیمار STO) با آنکه لایهٔ غذادهنده به‌طور بارز بر ویژگی‌های کمّی کلنی‌های (تعداد، مساحت کلنی، و تعداد سلول به‌ازای کلنی) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس نابالغ تأثیر مثبت گذارده است، نتوانسته است در طول زمان از کاهش این ویژگی‌ها به نسبت روز هفتم به‌طور معنی‌داری ممانعت کند (جدول ۳). بنابراین به‌نظر می‌رسد که مناسب‌ترین مدت کشت کوتاه‌مدت حتی با استفاده از لایهٔ غذادهنده در طیور (خروس) نیز مانند پستانداران، همان ۷ روز است که در سایر مطالعات نیز اعلام شده است [۲۴، ۴، و ۲].

براساس نتایج تحقیق حاضر، لایهٔ غذادهندهٔ **STO** در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس نابالغ، تأثیر مثبت وشایان توجهی بر حفظ، نگهداری، تکثیر، و خودنوزایی آن‌ها در کشت آزمایشگاهی دارد. به علاوه، بهترین طول کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در طیور به مانند پستانداران همان ۷ روز است. درنهایت، می‌توان الگوی به‌کاررفته در پژوهش کنونی را به سایر ماکیان تعمیم داد و برای بهبود و ارتقای کیفیت باروری آن‌ها و همچنین انتقال ژن برتر به نسل‌های آینده در ماکیان و نیز در سایر حیوانات اهلی، از آن استفاده کرد.

منابع

1. Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, Van de Kant HJ and De Rooij DG (2008) Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. Reproduction. 136(5): 543-557.

2. Aponte PM, Van Bragt MP, De Rooij DG and Van Pelt AM (2005) Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. Apmis,. 113(11-12): 727-742.

3. Bichun LI, Wang XY, Zhiqan, Xiao XJ, XU Q, CX Wei FY, Sun HC and Chen GH (2010) Directional differentiation of chicken spermatogonial stem cells *in vitro.* Cytotherapy. 12: 326-331.

4. Creemers LB, Den Ouden K, Van Pelt AM and De Rooij DG (2002) Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction. 124(6): 791-799.

5. Dirami G, Ravindranath N, Pursel V and Dym M (1999) Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biology of reproduction. 61(1): 225-230.

6. Dobrinski I (2005) Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. Animal reproduction science. 89(1): 137-145.

7. Haselbach M, Wegener J, Decker S, Engelbertz C and Galla HJ (2005) Porcine choroid plexus epithelial cells in culture: regulation of barrier properties and transport processes. Microscopy research and technique. 52(1): 137-152.

8. Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y and Dobrinski I (2003) Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. Biology of reproduction. 69(4): 1260-1264.

9. Jeyaraj DA, Grossman G and Petrusz P (2003) Dynamics of testicular germ cell apoptosis in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein. Reproductive Biology and Endocrinology. 1(1): 48.

10. Jung JG, Lee YM, Park TS, Park SH, Lim JM and Han JY (2007) Identification, culture, and characterization of germline stem cell-like cells in chicken testes. Biology of Reproduction. 76(1): 173-182.

11. Kalthoff K and Pomerai Dd (1996) Analysis of biological development. McGraw-Hill New York.

12. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE and Roger PP (2001) Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models. Endocrine Reviews. 22(5): 631-656.

13. Kleinman HK, Philp D and MP Hoffman (2003) Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Current Opinion in Biotechnology. 14(5): 526-532.

14. Liu L, He P, Cai1 K, Zhang Y, Li J, Cao1 F, Ding Z and Zhang N (2010) Lentivirus-Mediated Expression of MxA in Chicken Spermatogonial Stem Cells, Reprod Dom Anim. 45: 131-137.

15. McClusky LM (2003) A scanning electron microscopic study of germ cell maturation in the reproductive tract of the male soupfin shark (Galeorhinus galeus). Acta Zoologica. 84(1): 69-76.

16. McLean DJ, Russell LD and Griswold MD (2002) Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. Biology of Reproduction. 66(5): 1374-1379.

17. Mitaka T (1998) The current status of primary hepatocyte culture. International Journal of Experimental Pathology. 79(6): 393-409.

18. Morena AR, Boitani C, Pesce M, Felici M De and Stefanini M (1996) Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. Andrology. 17(6): 708-717.

19. Mozdziak PE and Petitte JN (2004) Status of transgenic chicken models for developmental biology. Developmental dynamics. 229(3): 414-421.

20. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR and Brinster RL (2003) Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. Biology of Reproduction. 68(6): 2207-2214.

21. Oatley JM, Reeves JJ and McLean DJ (2004) Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture. Biology of Reproduction. 71(3): 942-947.

22. Schrans-Stassen BH, De Rooij DG and Van Pelt AM (1999) Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. Endocrinology. 140(12): 5894-5900.

23. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR and Brinster RL (2000) Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(15): 8346-8351.

24. Trefil P, Murray RB, Haifen Y, Jiří H and Jiří K (2010) Restoration of spermatogenesis after transplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. Theriogenology. 74: 1670-1676.

25. Tres, LL and Kierszenbaum AL (1983) Viability of rat spermatogenic cells *in vitr*o is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. Proceedings of the National Academy of Sciences. 80(11): 3377-3381.