فصلنامه کاتب، علمی – پژوهشی
سال ۴، شماره ۷، زمستان ۱۳۹۶

دریافت مقاله:۱۳۹۶/۰۶/۰۸
پذیرش مقاله:۱۳۹۶/۰۸/۲۰
صص ۱۹-۸

بررسی تاثیر امواج اولتراسوند با شدت پایین روی تکثیر حجرات بنیادی

مهدی محقق[۱*]، منصوره موحدین[۲]، منیژه مختاری دیزچی[۲]، زهره مظاهری[۲]، علی احمد یوسفی[۱]، روح الله رویین[۱]، ذبیح الله اقبال[۱]

۱- عضو هیئت علمی دانشکده طب معالجوی، دانشگاه کاتب، کابل افغانستان، (نویسنده مسئول)
۲- عضو هیئت علمی دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در ابتدای روند اسپرم‌سازی هستند. روش‌های نوین مانند استفاده از امواج اولتراسوند مخصوصاً امواج اولتراسوند با شدت پایین می‌تواند بر روی افزایش تعداد حجرات اثربخش باشد. در این مطالعه، تأثیرات امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت پایین بر روی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی موشی را بررسی کرده‌ایم. حجرات بنیادی اسپرماتوگونی از موش نوزاد در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS سرم جدا شد. در مرحله اول این مطالعه، دما به وسیله تابش امواج اولتراسوند با شدت پایین بر روی ظرف کشت حاوی محیط کشت کنترل شد و در فاز بعدی، حجرات بنیادی اسپرماتوگونی تحت تابش امواج اولتراسوند با شدت پایین با شدت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ mW/cm^2 به مدت ۵ روز قرار گرفتند و میزان تکثیر و کلونی‌زایی در روز هفتم بررسی شده است. اثر تحریکی امواج اولتراسوند با شدت پایین پالسی بر روی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی، میزان تکثیر و کلونی‌زایی را در گروه‌های آزمون در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. میانگین میزان تکثیر در گروه‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ mW/cm^2 و کنترل به ترتیب ۰/۰۳ ± ۱/۹۶، ۰/۰۳ ± ۲/۲۶، ۰/۰۳ ± ۱/۷۳ و ۰/۰۳ ± ۱/۶۶ بود. میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و mW/cm^2 و کنترل به ترتیب ۱/۲±۴۵، ۲/۴±۵۳، ۱/۲±۲۸ و ۰/۸±۲۰ بود. میانگین قطر کلونی‌ها در گروه‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ mW/cm^2 و کنترل به ترتیب ۶/۸ ± ۲۳۵/۳، ۱۲/۳ ± ۲۰۴/۶، ۵/۶ ± ۲۰۳/۶ و ۹/۱ ± ۲۱۴/۳ میکرومتر بود. نتایج نشان داد که در میزان تکثیر و تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری وجود داشت ($P<0.05$)؛ در حالی که بین قطر کلونی‌ها در گروه‌های آزمون و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. این نتایج پیشنهاد می‌کند که امواج اولتراسوند با شدت پایین می‌تواند روش مؤثر و کم‌هزینه‌ای برای بهبود تکثیر و کلونی‌زایی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در طی کشت in vitro باشد.

واژه‌های کلیدی: *تکثیر، کلونی‌زایی، حجرات بنیادی، امواج اولتراسوند*

* mohaghegh_mahdi@Kateb.edu.af

مقدمه

فرایند اسپرم‌زایی با تمایز حجرات بنیادی اسپرماتوگونی آغاز و با تقسیم مایتوز اسپرماتوگونی‌ها، تقسیم میوز اسپرماتوسیت‌ها و تغییرات مورفولوژیکی در اسپرماتیدها دنبال و نهایتاً منجر به تولید اسپرماتوزا می‌شود. حجرات بنیادی اسپرماتوگونی قرار گرفته بر روی غشای پایه سمی نفروس توبول‌ها مسئول پیشبرد این روند اسپرم‌زایی است(۱).

شناخت فرایند اسپرم‌سازی در محیط لابراتوار از اهمیت بالایی برخوردار است و درک این فرایند می‌تواند کمک شایانی به درمان افراد عقیم کند. یکی از راه‌های درک این فرایند جداسازی، کشت، ذخیره و تکثیر حجرات اسپرماتوگونی در محیط لابراتوار است(۲).

عوامل زیادی وجود دارند که فرایند اسپرم‌سازی را تحت‌الشعاع قرار می‌دهند. از جمله این عوامل می‌توان به فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و کنش و واکنش بین حجرات سرتولی و حجرات جرمینال اشاره کرد. مطالعات نشان می‌دهد که در ۴۰٪ از موارد عقامت، مشکلاتی نظیر فقدان اسپرم، کاهش تعداد اسپرم و یا کاهش تحرک اسپرم به چشم می‌خورد. این کاهش تعداد اسپرم در بعضی موارد به دلیل کاهش در تعداد حجرات اجدادی اسپرم یا همان حجرات بنیادی اسپرماتوگونی است(۳).

غنی‌سازی، تکثیر و تمایز حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت، امری مهم بوده و کلونی‌زایی حجرات اسپرماتوگونی، منبع باارزشی از حجرات جرمینال را فراهم می‌آورد که برای مطالعات بعدی نظیر انجماد، پیوند حجرات جرمینال برای درمان عقامت، تمایز حجرات بنیادی اسپرماتوگونی و ... در محیط لابراتوار، بسیار ارزشمند است(۴).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که روش‌های نوینی از جمله استفاده از امواج صوتی، مخصوصاً امواج اولتراسوند با شدت پایین می‌تواند در تکثیر و افزایش تعداد حجرات اثربخش باشند. در حال حاضر، تأثیر مثبت امواج اولتراسوند بر روی انواع حجرات بنیادی منجر به افزایش رشد، تکثیر، تمایز و ... شده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این امواج باعث افزایش تکثیر حجرات بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بند ناف انسانی(۵)، حجرات بنیادی هماتوپوئیتیک(۶) و حجرات بنیادی مشتق‌شده از چربی(۷) شده است. همچنین این امواج باعث افزایش تکثیر حجرات کندروسیت(۸ و ۹) و فیبروبلاست(۱۰) شده است. وقتی امواج اولتراسوند در بافت‌های بیولوژیکال منتشر می‌شوند، باعث ایجاد فشار میکرومکانیکی از طریق برهم کنش‌های مولکولی شده و سرانجام باعث وقایع بیوشیمیایی در سطح حجرات می‌شوند(۱۱).

فصلنامه کاتب، علمی و پژوهشی
سال ۴، شماره ۷، زمستان ۱۳۹۶

تاکنون تأثیر امواج اولتراسوند با شدت پایین روی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در هیچ مطالعه‌ای بررسی نشده است. با توجه به نقش مهم حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در باروری مردان و اهمیت تکثیر و کلونی‌زایی این حجرات برای درمان عقامت با علل مردانه، در این پژوهش سعی بر آن است که تأثیر امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت پایین را بر روی تکثیر و کلونی‌زایی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت حجرات اسپرماتوگونی

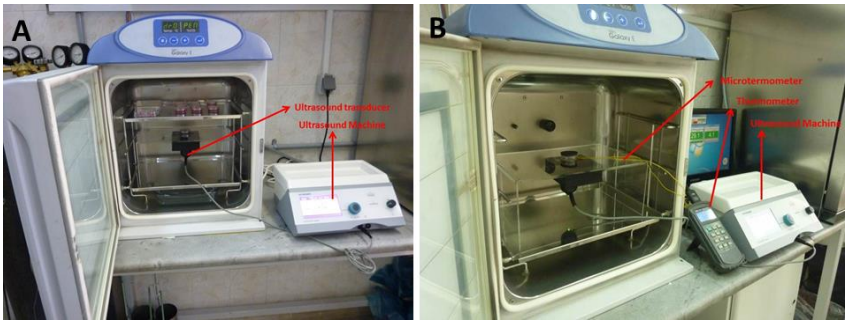
در این مطالعه تجربی، موش‌های نر و ماده نژاد (NMRI) بالغ در حیوان خانه دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب(۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی) نگهداری شدند. تمام روش‌های استفاده‌شده در این مطالعه، طبق موازین مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام و تمام مواد مصرف‌شده در این مطالعه از شرکت سیگما (ساخت کشور آلمان) تهیه شد. جداسازی حجرات با توجه به مطالعات گذشته(۱۲) و مطابق با روش اصلاح‌شده جوانمردی و همکاران(۱۳) برای ایجاد سیستم هم‌کشتی حجرات اسپرماتوگونی با حجرات سرتولی اتولوگ انجام شد. برای هر بار جداسازی حجرات اسپرماتوگونی، بیضه‌های ۵ تا ۱۰ سر موش نوزاد نر ۳ تا ۵ روزه، برداشته شد. ابتدا بیضه‌های خارج‌شده در PBS (Phosphate Buffer Serum) شست‌وشو و سپس به محیط کشت DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) منتقل شد. بعد از شست‌وشوی مجدد، کپسول و بافت‌های اضافی مثل اپیدیدیم از بیضه‌ها جدا شدند و سپس نمونه‌ها در محیط کشت DMEM حاوی آنزیم کلاژناز (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند.

مخلوط حجرات و آنزیم در داخل انکوباتور ۳۲ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن قرار گرفته و هر ۵ دقیقه با استفاده از پیپت با هم مخلوط شدند. بعد از ۱۵ دقیقه حجرات با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. بعد از دور ریختن مایع رویی، حجرات ۲ بار با استفاده از PBS شسته شده و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در این مرحله ۳ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین ۰/۱ درصد به پلاک حجرات در کف لوله فالکون اضافه شده و به مدت ۶۰ ثانیه پیپتاژ شد تا اینکه حجرات کاملاً به صورت مجزا درآمدند. در ادامه سوسپانسیون حجرات به دست آمده که اغلب حاوی حجرات اسپرماتوگونی و سرتولی بود به صورت

هم‌کشتی و با تعداد مساوی در ظرف کشت‌های ۳۵ میلی‌متری حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد سرم FBS کشت داده شدند. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک بار انجام شد.

تابش امواج اولتراسوند با شدت پایین بر حجرات اسپرماتوگونی

روش تابش‌دهی و پارامترهای اولیه (فرکانس ۱ مگاهرتز به مدت ۵ روز) با توجه به مطالعات قبلی (۶ و ۷) انجام شد. به این صورت که دستگاه اولتراسوند (PHYSIOMED, Germany) امواج را از طریق یک ترانس دیوسر با سطح مقطع ۳۵ میلی‌متر به واسطه ژل کوپلینگ (coupling) بین ترانس دیوسر و ظرف کشت از ته ظرف کشت و در داخل انکوباتور با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و CO_2%5 به حجرات تابیده شد (شکل۱–A) در مرحله اول ظرف کشت حاوی محیط کشت و بدون سلول با شدت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ mW/cm^2 تحت تابش امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی قرار داده شد. همزمان دمای محیط کشت به وسیله میکروترمومتر کنترل شد (شکل ۱–B) زمان مناسب برای تابش، زیر حد هایپرترمی یعنی زمان لازم برای افزایش ۱ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. در مرحله بعدی، امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ mW/cm^2 و زمان به دست آمده از فاز اول استفاده شدند.



شکل ۱. روش تابش‌دهی امواج اولتراسوند و به کارگیری میکروترمومتر برای اندازه‌گیری دمای محیط کشت و دمای محیط انکوباتور بر روی حجرات

بررسی میزان تکثیر و کلونی‌زایی حجرات اسپرماتوگونی

تعداد حجرات اسپرماتوگونی در روزهای مختلف به کمک شمارش حجرات مخصوص، شمارش و با هم مقایسه شدند. ارزیابی کلونی‌زایی بر اساس مطالعات قبلی(۱۴) صورت گرفت. کلونی‌های مشتق از

حجرات اسپرماتوگونی در روز هفتم از نظر تعداد و قطر به کمک میکروسکوپ معکوس (Ziess, Germany) مجهز به لنز چشمی مدرج (Ocular grid) انجام شد.

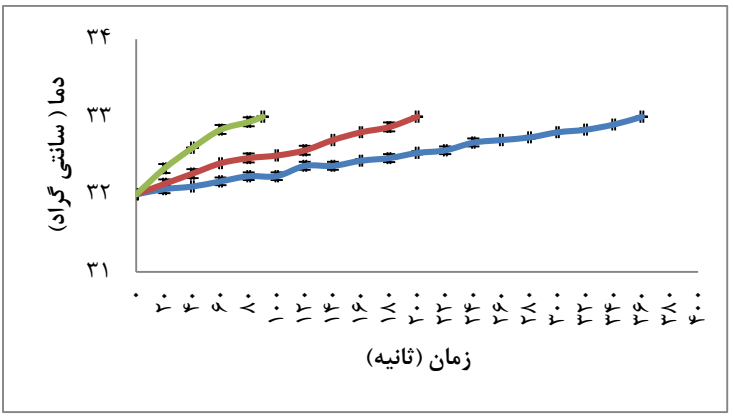
تجزیه و تحلیل آماری

کلیه دیتاهای این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، به کمک آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و T-test و آزمون تکمیلی Tukey، تجزیه و تحلیل شدند. تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. سطح معنی‌داری در مقایسه بین گروه‌ها $P< ۰.۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

کنترل دما

بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های مرحله کنترل دما، مدت زمان لازم برای ایجاد هایپرترمی به وسیله امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ mW/cm^2 به ترتیب حدود ۳۶۰، ۲۰۰ و ۹۰ ثانیه بود. روند افزایش دما طی تابش امواج در (شکل ۲) ارائه شده است.



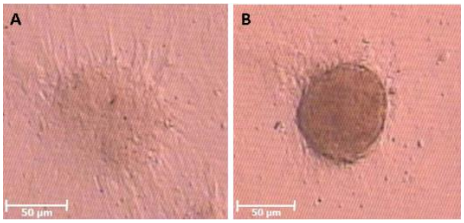
شکل ۲. زمان لازم برای ایجاد ۱ درجه سانتی‌گراد افزایش دما در محیط کشت منحنی سبز ۱۰۰ mW/cm^2، سرخ ۲۰۰ mW/cm^2 و آبی ۳۰۰ mW/cm^2 هستند.

ارزیابی میزان تکثیر حجرات اسپرماتوگونی

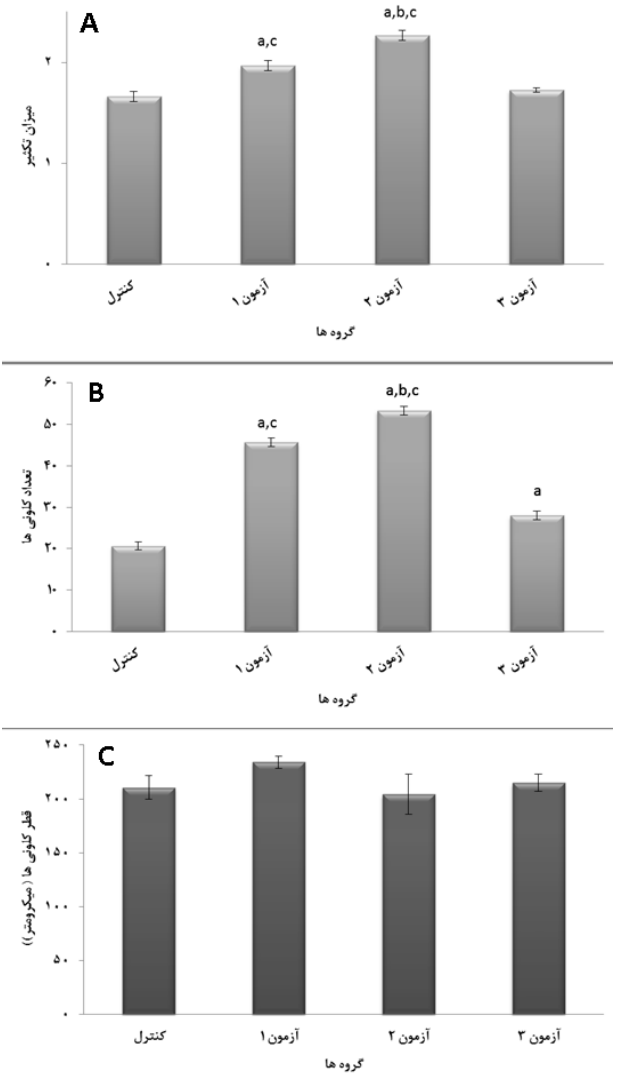
نتایج به دست آمده از بررسی روند تکثیر و کلونی‌زایی حجرات اسپرماتوگونی در محیط کشت نشان داد که امواج اولتراسوند با پارامترهای مذکور، میزان تکثیر و کلونی‌زایی این حجرات را افزایش داده است. نتایج حاصل از بررسی میزان تکثیر حجرات اسپرماتوگونی تحت تأثیر امواج اولتراسوند در (شکل ۴–A) ارائه شده است. بعد از هفت روز کشت، حجرات اسپرماتوگونی در گروه کنترل، (۰/۰۳± ۱/۶۶) برابر شد در حالی که میزان تکثیر حجرات در گروه آزمون ۱، (۰/۰۳± ۱/۹۶) برابر، در گروه آزمون ۲، (۰/۱۰ ± ۲/۲۶) و گروه آزمون ۳، (۰/۰۳± ۱/۷۳) شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان تکثیر در گروه آزمون ۲ نسبت به سه گروه آزمون ۱، ۳ و کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین میزان تکثیر در گروه آزمون ۱ نسبت به دو گروه آزمون ۳ و کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). بین میانگین میزان تکثیر در گروه‌های آزمون ۳ و کنترل اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد.

ارزیابی کمّی کلونی‌زایی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی

نتایج حاصل از بررسی روند کلونی‌زایی حجرات اسپرماتوگونی در محیط کشت نشان داد که این حجرات در ابتدا تجمعات حجرات شکل داده (شکل ۳–A) و در ادامه کلونی (شکل ۳–B) ایجاد کردند. در این میان، امواج اولتراسوند با پارامترهای ذکر شده باعث افزایش تعداد کلونی‌های حاصل از حجرات اسپرماتوگونی شد؛ ولی بر قطر کلونی‌ها تأثیری نداشت. نتایج حاصل از بررسی کلونی‌زایی شامل تعداد و قطر کلونی‌ها در (شکل ۴–B و ۴–C) ارائه شده است. نتایج آنالیز آماری نشان داد تعداد کلونی‌ها در گروه آزمون ۲ (۲/۴±۵۳) نسبت به گروه‌های آزمون ۱ (۱/۲±۴۵)، آزمون ۳ (۱/۲±۲۸) کنترل (۰/۸±۲۰) به طور معنی‌داری افزایش داشت (P<۰/۰۵). همچنین تعداد کلونی‌های گروه آزمون ۱ (۱/۲ ± ۴۵) نسبت به گروه‌های آزمون ۳ (۱/۲ ± ۲۸) و کنترل (۰/۸ ± ۲۰) و تعداد کلونی‌های گروه آزمون ۳ (۱/۲ ± ۲۸) نسبت به کنترل (۰/۸ ± ۲۰) نیز به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵)؛ هرچند بین میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون ۱ و کنترل اختلاف معنی‌داری دیده نشد. نتایج نشان داد که قطر کلونی‌های به دست آمده در گروه‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند.



شکل ۳. تجمعات حجرات ایجاد شده به دنبال تقسیمات حجرات اسپرماتوگونی



شکل ۴. مقایسه میزان تکثیر (A) و کلونی‌زایی (B and C) بین گروه‌های آزمون و کنترل

A: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل B .(P<0.05) تفاوت معنی‌دار با گروه آزمون ۱ C .(P<0.05) تفاوت معنی‌دار با گروه آزمون ۳ (P<0.05)

گروه آزمون ۱: کشت حجرات بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت 100 mW/cm^2

گروه آزمون ۲: کشت حجرات بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت 200 mW/cm^2

گروه آزمون ۲: کشت حجرات بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت 300 mW/cm^2

گروه کنترل: کشت حجرات بنیادی اسپرماتوگونی بدون تابش امواج اولتراسوند

بحث

در این مطالعه برای غنی‌سازی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در محیط لابراتوار از روش تابش امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت پایین استفاده شده است. با توجه به این‌که میزان خلوص حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز موش نوزاد (سن کمتر از ۶ روز) در بالاترین سطح است، در این مطالعه از حجرات موش ۳ تا ۵ روزه استفاده شده است.

برای کنترل افزایش دما و پیش‌گیری از ایجاد هایپرترمی و به دنبال آن تأثیرات منفی آن روی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی، دمای محیط کشت تحت تأثیر امواج اولتراسوند کنترل شد. Peng و همکارانش در سال ۲۰۱۲ طی تابش امواج اولتراسوند با شدت پایین را بر روی حجرات بنیادی هماتوپوئیتیک، تغییرات دمایی را گزارش نکردند و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را به صورت عمومی در نظر گرفته و تابش امواج اولتراسوند را انجام دادند (۶). همراهی و همکارانش در سال ۱۳۸۷ نیز تأثیر امواج اولتراسوند با شدت پایین را روی حجرات مزانشیمی مطالعه کردند. آن‌ها عنوان کردند که افزایش دما تا یک درجه سانتی‌گراد مجاز بوده و از آن فراتر نرفته بوده است(۱۵).

در این مطالعه، تأثیر امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت پایین با شدت‌های مختلف بر روی میزان تکثیر و کلونی‌زایی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در محیط لابراتوار بررسی و این نتیجه حاصل شد که امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتزی با شدت پایین، باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان تکثیر و کلونی‌زایی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی بعد از هفت روز کشت می‌شوند. امواج اولتراسوند فشاری ایجاد می‌کنند که به وسیله واکنش با ماتریکس خارج حجرات و برهم زدن تمامیت غشای حجرات، اینتگرین‌ها را فعال می‌کنند و تغییری محتوایی را در ساختار آن‌ها در پاسخ به لرزش در ماتریکس خارج حجرات القا می‌کنند(۱۶). اینتگرین‌ها، پروتئین‌های عرض غشایی هترودیمریک‌اند که بین ماتریکس خارج حجرات و اجزای اسکلت داخل حجرات و فیلامنت‌های اکتین، ارتباط برقرار می‌کنند. نقش اینتگرین‌ها القای تغییرات محتوایی است به صورتی که آن‌ها را فعال کرده و محل اتصال لیگاند آن‌ها را ظاهر می‌کنند. این موضوع به نوبه خود اینتگرین‌ها را قادر می‌کند که به اجزای اسکلت حجرات و دیگر مولکول‌های ارتباطی متصل شده و مسیرهای ارتباطی داخل حجرات متعددی را فعال کنند(۱۷). این مسیرها معمولاً در پاسخ به فشارهای مکانیکی فعال می‌شوند؛ بنابراین اینتگرین‌ها به عنوان گیرنده مکانیکی حساس در سطح سلول فعالیت می‌کنند(۱۸).

Iwashina و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که امواج اولتراسوند با شدت پایین بر روی حجرات دیسک بین مهره‌ای خرگوش باعث افزایش تولید پروتئوگلیکان و تکثیر حجرات می‌شود (۱۹). Jong و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که امواج اولتراسوند با شدت پایین باعث بهبود تکثیر حجرات بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف انسانی می‌شوند (۵). Peng و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که امواج اولتراسوند با شدت پایین روی حجرات بنیادی هماتوپوئتیک، منجر به افزایش تکثیر و حفظ قدرت زیست این حجرات، افزایش تشکیل کلونی‌های اریتروئید می‌شود؛ در حالی که تأثیری روی درصد حجرات +CD34 و +CD14 نداشت. آن‌ها معتقد بودند که تأثیرات مطلوب امواج اولتراسوند با شدت پایین پالسی بر روی تکثیر، حفظ قدرت زیست و تمایز حجرات بنیادی پیش ساز هماتوپوئیتیک برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی آن، نیازمند تحقیقات بیشتر است(۶).

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که امواج اولتراسوند ۱ مگاهرتز با شدت پایین به عنوان روشی بدون عوارض جانبی و کم‌هزینه برای بهبود غنی‌سازی حجرات بنیادی اسپرماتوگونی در In Vitro است

منابع

1. Rooij D, Grootegoed A. Spermatogonial stem cell. Current Opinion in Cell Biology 1998; 10: 694-701.
2. McLaren A. Genetics and human reproduction. Trends Genet 1998; 14(10): 427-31.
3. Terada T, Hatakeyama S. Morphological evidence for two types of idiopathic 'Sertoli-cell-only' syndrome. Int J Androl 2008; 14: 117 – 126.
4. Mohammadi S M. Comparing of colony formation of spermatogonial stem cells of adult mice after co-culture with sertoli and fibroblast cell. Master's thesis. Supervisor: Dr Movahedin M. Tarbiat Modares University 1388. Persian)
5. Jong H Y, Eun Y R, Sue Sh, Nam H J, Eun Y S, Dong S L, Kyou S H, Joung S K, Byoung J K, Hye W J, Kang S Y. Introducing pulsed low-Intensity ultrasound to culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Biothechnol Left 2009; 31: 329-335.
6. Peng Xu, Hilal G U, Woon T A, Xiaoyan Y, Min H, Leah M C, Locksley M, Anna J W, Xing J, Swanson E, Chen J. Low-intensity pulsed ultrasound-mediated stimulation of hematopoietic stem/progenitor cell viability, proliferation and differentiation in vitro. Biotechnol Left 2012; 34(10): 1965-73.
7. Jiang T, Xu T, Guo F, Chen A, Xiao Zh, Zhang D. Osteogenic Effect of Low Intensity Pulsed Ultrasound on Rat Adipose-derived Stem Cells in vitro. J Huazhong Univ Sci Technol 2012; 32(1): 75-81.
8. Zhang, Z.J. et al. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. Ultrasound Med Biol, 2003. 29 (11): p. 1645-51.
9. Korstjens, C.M. et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro. Med Biol Eng Comput, 2008. 46 (12): p. 1263-70.
10. Zhou, S. et al. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. J Biol Chem, 2004. 279(52): p. 54463-9.
11. Merino G, Kalia Y N, Delgado-Charro M B, Potts R O, Guy R H. Frequency and thermal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. J Contol Release 2003; 88: 85-94.

12. Scarpino S, Morena M, Petersen C, Froysa B, Soder O, Boitani C. A rapid method of sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. Mol Cell Endocrinal 1998; 146: 121-7.
13. Javanmardi S, Asadi M H, Movahedin M. Isolation, expantion and purification on mouse spermatogonial stem cells in an autologous sertoli cell co-culture system. Modares J Med Sci Path 2013; 15(4): 21 -33.
14. Hasthorpe S. clonogenic culture of normal spermatogonia: in vitro regulation of postnatal germ cell proliferation. Biol Repord 2003; 68(4): 389-97.
15. Hamrahi D, Shiran M B, Baghban M R,Goorayi H, Roohi L. The effect of low intensity ultrasound on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from rat bone marrow in vitro. Leiser Pezeshki 1387; 5 (2): 6 11. (Persian)
16. Thorne JL, Campbell MJ, Turner BM. Transcription factors, chromatin and cancer. Int J Bioch & Cell Biol 2009; 41(1): 164-175.
17. Henikoff S. Histone modifications: Combinatorial complexity or cumulative simplicity. PNAS 2005; 102(15): 5308-5309.
18. Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B, Rychly J. Mechanical Stressing of Integrin Receptors Induces Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Cytoskeletally Anchored Protein. J Biol Chem 1998; 273: 5081–85.
19. Iwashina T, Mochida J, Miazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D. Low-Intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in Rabbit intervertebral disk cells cultured in alginate. Biomaterials 2006: 354- 361.