

Original Article

The Effects of Testicular Microenvironment on Proliferation of Spermatogonial Stem Cells in Azoospermia Patients

Tooba Mirzapour^{1*}, Abolfazl Bayrami¹

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 5619913131, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Email: Dr.tooba72@gmail.com

Received: 01/Jun/2016, Accepted: 29/Oct/2016

Abstract

Objective: This study aims to investigate the testes cultures of patients with previous histories of maturation arrest in spermatogenesis and find the appropriate methods to overcome this problem.

Methods: We divided spermatogonial stem cells (SSCs) isolated from testes biopsies into 3 groups: 1) culture of SSCs without feeder layer; 2) co-culture of SSCs with patient-derived Sertoli cells; and 3) co-culture of SSCs on Sertoli cell feeder layer derived from healthy donors. We calculated the numbers and diameters of stem cell-derived colonies and the percentage of cell viability in the different groups. The presence of SSCs at different culture times was determined by immunocytochemistry, alkaline phosphatase, and xenotransplantation of SSCs into an azoospermic mouse model.

Results: The microenvironment of the feeder layer derived from the patient's own Sertoli cells produced numerous (36.1 ± 4) large colonies ($213.2 \pm 17 \mu\text{m}$) after 3 weeks of culture. However, the ratio of germ cell-specific expressions of *Stra8* (2.3) and *Vasa* (2.2) was more than the pluripotency gene, *Nanog* (0.45) in SSCs cultured on the Sertoli cell layer of a healthy person. After xenotransplantation of human SSCs into the testis of an azoospermic mouse model, we observed that the cells grow on basement membrane of seminiferous tubules, which confirmed their nature.

Conclusion: SSCs could be co-cultured with Sertoli cells derived from healthy donors in order to overcome the arrest of spermatogenesis observed in the co-culture of SSCs with patient-derived Sertoli cells. The results of the present study indicated that spermatogenesis could possibly be resumed in cancer patients previously treated by chemotherapy and/or radiotherapy.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Sertoli cells, testis microenvironment

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No. 1, Pages: 59-77

تأثیر ریز محیط بیضه بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی افراد آزواسپرما

طوبا میرزاپور^{۱*}، ابوالفضل بایرامی^۱

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، اردبیل، کدپستی: ۵۶۱۹۹۱۳۱۳۱، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

Email: Dr.tooba72@gmail.com

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۸/۰۸

دریافت مقاله: ۹۵/۰۳/۱۲

چکیده

هدف: هدف این تحقیق در قدم اول بررسی بافت بیضه بیماران است که طی یک سال گذشته دچار توقف فرآیند اسپرم‌زایی شده‌اند و در قدم دوم پیدا کردن روش‌های مناسب برای برطرف کردن موانع توقف اسپرم‌زایی است. مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از استخراج از بیضه بیماران در سه گروه قرار گرفتند: (۱) کشت به تنهایی و بدون لایه حمایت‌کننده، (۲) کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی سلول‌های سرتولی خود بیمار و (۳) کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر سلول‌های سرتولی شخص سالم. در مرحله بعد تعداد و قطر کلونی‌های مشتق از سلول‌های بنیادی و نیز درصد بقای سلول‌ها اندازه‌گیری شد. وجود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مراحل مختلف کشت با استفاده از روش‌های ایمنوسیتوشیمی، آلكالین فسفاتاز و زئوترانسپلنت به بیضه موش مدل آزواسپرما اثبات شد. نتایج: در ریز محیط حاصل از سلول‌های سرتولی شخص بیمار پس از گذشت ۳ هفته از کشت، کلونی‌هایی با تعداد و قطر بیشتر مشاهده شد (۲۱۳±۱۷ میکرومتر و ۳۶/۱±۴ عدد)؛ اما نسبت بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های جرم (شامل: Stra8 و Vasa) بر خلاف ژن پرتوانی (Nanog) در گروه هم‌کشتی با سرتولی شخص سالم بیشتر بود (۲/۳ و ۲/۲ در مقابل ۰/۴۵). پس از پیوند زئوگرافت سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی به موش مدل آزواسپرما، این سلول‌ها روی قاعده لوله‌های منی‌ساز موش مستقر شدند که این مسئله ماهیت آن‌ها را تأیید کرد. نتیجه‌گیری: برای غلبه بر توقف اسپرم‌زایی مشاهده شده در گروه هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی سلول‌های سرتولی خود بیمار، می‌توان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را روی لایه سلول‌های سرتولی شخص سالم کشت داد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در کمک به شروع مجدد اسپرم‌زایی در بیماران سرطانی که قبلاً در معرض شیمی‌درمانی یا اشعه درمانی بوده‌اند مؤثر باشد.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های سرتولی، ریز محیط بیضه

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات: ۵۹-۷۷

مقدمه

آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تقسیم و تمایز می‌یابند و در نهایت اسپرم تولید می‌شود. این فرآیند پیچیده در اپیتلیوم

اسپرم‌زایی (Spermatogenesis) فرآیند پیچیده‌ای است که از تعداد زیادی مراحل پی در پی و منظم تشکیل شده و طی

رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

لوله‌های منی‌ساز بیضه پستانداران از زمان بلوغ شروع شده و تا آخر عمر ادامه می‌یابد. مدت زمان لازم برای تکمیل این دوره در انواع گونه‌ها متفاوت است [۱].

طی فرآیند اسپرم‌زایی تقابلات مختلف سلولی و ارتباط سلول‌ها با ریز محیط اطراف صورت می‌گیرد. ریز محیطی که سلول‌های بنیادی در آن قرار می‌گیرند، چه در داخل بدن و چه در داخل آزمایشگاه، کنام یا Niche خوانده می‌شود. سلول‌های موجود در کنام با ایجاد یک سد دفاعی، سلول‌های بنیادی را از عوامل کاهنده ذخیره سلولی، محرک‌های تمایزی و محرک‌های (Apoptosis مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده) دور نگه داشته و از تولید بیش از حد سلول‌های بنیادی که منجر به سرطان خواهد شد ممانعت می‌کند، بنابراین حفظ تعادل بین مرحله خاموشی و مرحله فعالیت سلول بنیادی از مشخصه‌های اصلی کنام است. علاوه بر نقشی که ریز محیط از لحاظ ساختار مهندسی سه بعدی خود ایفا می‌نماید، کنش و واکنش‌های بین سلول‌های بنیادی و محیط اطراف نیز دارای اهمیت است. این تقابلات شامل ارتباط سلول‌های بنیادی با همدیگر، با سلول‌های تمایز یافته مجاور یا با مولکول‌های اتصال‌ی موجود در ریز محیط است. علاوه بر این؛ حضور عوامل رشد اختصاصی و سیتوکین‌های مختلف و نیز خصوصیات فیزیکی-شیمیایی محیط نیز رفتار سلول‌های بنیادی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲].

سلول سرتولی یکی از سلول‌های مهمی است که بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تأثیر می‌گذارد. سلول‌های سرتولی از طریق اتصالات دسموزوم و کمپلکس‌های منفذدار با سلول‌های زایا در ارتباط هستند [۳]. از طرفی سلول‌های اسپرماتوگونی در تماس با غشای پایه لوله‌های منی‌ساز قرار دارند و احتمالاً به عوامل پاراکرین ترشح شده توسط سلول‌های لیدیگ (Leydig cells) یا سلول‌های میوئید (Myoid cells) موجود در فضای بینابینی و نیز سلول‌های سرتولی پاسخ می‌دهند. با دانستن این نکات طراحی محیط کشت و ایجاد تغییر در آن‌ها می‌تواند به بهبود روند کشت و غنی نمودن سلول‌های بنیادی

رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

شینه‌هارا (Shinohara) یک سیستم کشت طولانی مدت با ترکیبی از فاکتور رشد عامل نروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال (Glial cell-derived neurotrophic factor: GDNF) طراحی کرد. این سیستم باعث ادامه حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و حفظ تمایز آن‌ها به مدت ۶ ماه شد [۵].

انجم‌روز و همکاران به بررسی رشد سلول‌های اسپرماتوگونی در حضور عامل رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor: EGF)، تستوسترون و FSH (Follicle-stimulating hormone) پرداختند. نتایج نشان داد هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی در حضور EGF بیشترین تأثیر را در تولید کلونی‌های سلول‌های جرم دارد [۶].

مارتین (Martin) و همکاران اسپرماتوگونی A را از موش جداسازی کردند و در محیط غنی از پتاسیم و بدون سرم کشت دادند. آن‌ها متوجه شدند قابلیت حیات سلول‌ها به تدریج طی یک هفته کاهش می‌یابد. این کاهش به دلیل نبودن عوامل رشد مورد نیاز و نیز وجود نداشتن لایه تغذیه کننده بود [۷].

لیم (lim) و همکاران گزارش کردند که سلول‌های بنیادی حاصل از بیماران آزواسپرمی (Azoospermia) انسدادی و غیر انسدادی قادرند برای مدت شش ماه در محیط کشت در حضور سلول‌های سرتولی تکثیر و حفظ شوند [۸].

کروچی و همکاران سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش‌های بالغ را در حضور GDNF کشت دادند و به اثر مثبت حضور عوامل رشد و لایه تغذیه کننده در کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پی بردند [۹].

میرزاپور و همکاران سلول‌های اسپرماتوگونی را از بیضه افراد بالغ جداسازی نموده و به تنهایی و نیز در حضور سلول‌های سرتولی کشت دادند؛ نتایج نشان داد هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی منجر به تکثیر بیشتر سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود [۱۰]. بنابراین با توجه به نتایج مطالعات گذشته افزودن عوامل رشد، استفاده از محیط‌های کشت خاص

سلول سرتولی یکی از سلول‌های مهمی است که بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تأثیر می‌گذارد. سلول‌های سرتولی از طریق اتصالات دسموزوم و کمپلکس‌های منفذدار با سلول‌های زایا در ارتباط هستند [۳]. از طرفی سلول‌های اسپرماتوگونی در تماس با غشای پایه لوله‌های منی‌ساز قرار دارند و احتمالاً به عوامل پاراکرین ترشح شده توسط سلول‌های لیدیگ (Leydig cells) یا سلول‌های میوئید (Myoid cells) موجود در فضای بینابینی و نیز سلول‌های سرتولی پاسخ می‌دهند. با دانستن این نکات طراحی محیط کشت و ایجاد تغییر در آن‌ها می‌تواند به بهبود روند کشت و غنی نمودن سلول‌های بنیادی

و رضایت به انجام بیوپسی مجدد داشتند، انجام گرفت. در مطالعه حاضر سلول‌های بیضه افراد بالغ با میانگین سنی ۳۲-۵۷ سال بر اساس روش ژیونگ (Jeong) و همکاران (۲۰۰۳) استخراج و کشت داده شدند [۱۱]. به‌طور خلاصه پس از کسب رضایت نامه کتبی از بیماران و رعایت موازین اخلاقی در نمونه‌گیری، از هر بیمار بیوپسی بیضه به اندازه تقریبی ۵/۰×۵/۰ سانتی‌متر مربع گرفته شد و در محیط کشت DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) (Sigma Aldrich، آمریکا) با گلوکز بالا که حاوی پیروات و ال-گلوتامین (GIBCO، آمریکا)، ۱۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum)، ۳/۷ گرم/لیتر بیکربنات سدیم (Sigma Aldrich، آمریکا)، ۰/۱ میلی‌مول بتا مرکاپتو اتانول (Sigma Aldrich، آمریکا)، ۱ درصد اسید آمینه‌های غیر ضروری (Sigma Aldrich، آمریکا)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین (GIBCO، آمریکا) بود قرار داده شد و طی حداکثر یک ساعت (ترجیحاً داخل یونولیت حاوی یخ) به آزمایشگاه منتقل شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در شرایط استریل و زیر هود آزمایشگاهی با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو و سپس به محیط حاوی آنزیم‌های کلاژناز IV، هیالورونیداز، تریپسین (Sigma، آمریکا) هر کدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و DNase (Sigma، آمریکا) به میزان ۰/۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر منتقل شد. سپس نمونه بیضه به کمک پنس و قیچی خرد و از هم گسسته شد و در محیط حاوی آنزیم‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه انکوبه شد. پس از خروج از انکوباتور، نمونه‌ها پیتاژ شد و تعلیق حاصل با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ شد. پلت ایجاد شده در زیر حاوی لوله‌های منی‌ساز بود که برداشته شد و به یک ظرف استریل منتقل شد و مجدداً ترکیب آنزیمی بالا روی آن ریخته شد. به فواصل هر ۵ دقیقه یک بار ظرف از انکوباتور خارج شده و پیتاژ شد. پس از ۲۰ دقیقه تعلیق سلولی حاصل در یک فالكون ریخته و در سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ شد.

و نیز هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی می‌تواند باعث افزایش درصد زنده ماندن سلول‌ها شود. زیرا این شرایط به شرایط داخل بدن موجود زنده که در آن این عوامل خاص توسط سلول‌های سرتولی یا خود سلول‌های زایا تولید می‌شوند شباهت زیادی دارد.

گاهی در بعضی از بیماران مشاهده می‌شود که تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه در حد طبیعی بوده ولی به دلایل مختلف این سلول‌ها دچار توقف تقسیم در یکی از مراحل اسپرم‌زایی شده‌اند و بقیه مراحل اسپرم‌سازی در بیضه این نوع از بیماران دیده نمی‌شود. در این صورت بررسی ریز محیط بیضه و شناخت عوامل ممانعت‌کننده تکثیر ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین در این مطالعه تأثیر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک بیمار بر سلول‌های سرتولی همان بیمار در افزایش تعداد و قطر کلونی‌ها در محیط کشت بررسی شد. همچنین به دلیل اهمیت فراوان سلامت ریز محیط اطراف سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و نقش سلول‌های سرتولی در تنظیم این ریز محیط، هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک بیمار با سلول‌های سرتولی یک شخص سالم دارای اسپرم‌زایی طبیعی نیز بررسی شد. حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مراحل مختلف کشت با استفاده از روش‌های مختلف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی

پژوهش حاضر در جلسه پژوهشی دانشگاه به شماره ۱۲۳۵ در تاریخ ۲۴/۸/۹۳ مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشی قرار گرفت و مجوز انجام پژوهش دریافت کرد. مطالعه به صورت پایلوت در ۲۵ مرد آواسپرم که در پاتولوژی توقف اسپرم‌زایی و عدم تولید اسپرم داشتند انجام شد. انتخاب این افراد به‌طور متوالی و از مراجعین به بخش باروری و ناباروری مراکز درمان ناباروری که در نمونه قبلی بیوپسی توقف اسپرم‌زایی داشته‌اند

رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی افراد بیمار روی سلول‌های سرتولی شخص سالم کشت شدند. در تمام گروه‌ها از محیط کشت DMEM شامل ۱۰ درصد سرم به همراه ۱ نانوگرم/میلی‌لیتر bFGF (basic fibroblast growth factor) (Calbiochem, آمریکا) و ۱۵۰۰ واحد/میلی‌لیتر LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Sigma, آمریکا) بر اساس مطالعات قبلی استفاده شد [۱۰].

هر سه روز یکبار محیط کشت قبلی دور ریخته شد و به جای آن محیط تازه اضافه شد. پس از گذشت ۷ روز از کشت، سلول‌ها در معرض تریپسین/EDTA قرار گرفته و پاساژ در خود شدند؛ به این معنی که پس از جدایی سلول‌ها از کف ظرف، به دلیل به هم خوردن نسبت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی بین ظرف‌های جدید توزیع نمی‌شدند. این عمل موجب می‌شود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یکدیگر را یافته و با قرار گرفتن در کنار هم، کانون تشکیل کلونی‌های کوچک شوند. هر هفته یکبار این کار تکرار شد و کشت برای ۲۱ روز (۳ هفته) ادامه داشت.

ارزیابی کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی

پایان هر هفته کلونی‌های مشتق از سلول‌های اسپرماتوگونی در تمام گروه‌های مورد مطالعه از نظر تعداد و قطر کلونی‌ها ارزیابی شدند. این ارزیابی سه هفته ادامه داشت. اندازه‌گیری قطر کلونی‌ها با میکروسکوپ معکوس (Ziess, آلمان) که به عدسی چشمی مدرج مجهز شده بود انجام شد. مشاهدات حاصل از سه بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار و انجام تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.

بررسی میزان بقا و تزايد سلولی

برای تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها از رنگ تریپان بلو (Trypan blue) استفاده شد. بدین صورت که ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی یکنواخت در داخل یک میکروتیوب کوچک ریخته شد و سپس به آن ۵۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو

محلول رویی که حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی است برداشته و برای ۳ دقیقه در سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس در پلت حاصل پس از شمارش سلولی به کمک لام نئوبار، در خانه‌های یک پلیت ۱۲ خانه تقسیم شد به طوری که هر خانه حدود ۲۰۰ هزار سلول داشته باشد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ به حال خود رها شدند. سپس سلول‌هایی که به کف پلیت چسبیده بودند به عنوان لایه تغذیه کننده سرتولی در نظر گرفته شدند و سلول‌هایی که به شکل معلق روی آن‌ها ظاهر شدند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بودند. این سلول‌ها جدا شده و برای مراحل بعدی کار در یک فالكون جداگانه ریخته شدند.

جداسازی سلول‌های سرتولی

برای فراهم آوردن سلول‌های سرتولی سالم از بیوپسی بیضه افرادی با اسپرم‌زایی طبیعی استفاده شد. این افراد (n=۳) دارای محدوده سنی ۲۵-۳۵ سال بودند و فرم‌های رضایت نامه اخلاقی برای نمونه‌گیری را پر نمودند. سپس با صلاحیت پزشک متخصص اورولوژی برای دریافت نمونه، تحت TESE (Testiculaire sperm-extraction) قرار گرفتند. تعلیق سلولی حاصل از سانتریفوژ دوم این افراد به مدت یک شب در ظروف کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفت. سلول‌های متصل به بستر پلیت به عنوان سلول‌های سرتولی فرد سالم در نظر گرفته شدند [۱۰].

گروه‌های آزمایش

در مطالعه حاضر سلول‌های اسپرماتوگونی افراد بیمار پس از جداسازی به سه گروه تقسیم شد و با غلظت ۲۰×۱۰^۳ سلول در هر متر مربع در خانه‌های یک پلیت ۶ خانه توزیع شدند: در گروه اول سلول‌های اسپرماتوگونی بدون لایه تغذیه کننده کشت شدند. در گروه دوم سلول‌های SSC افراد بیمار روی سلول‌های سرتولی همان بیمار کشت شدند و در گروه سوم

بافت بیضه به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این بررسی‌ها ابتدا RNA کل با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (QIAGEN, آلمان) که حاوی تریزول بود استخراج شد. غلظت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر ۲۵۰ نانوگرم/میلی‌لیتر تعیین شد. ۵ میکروگرم از این RNA با آنزیم DNaseI، تیمار شد و سپس با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس (Reverse Transcription)، dNTPs و آغازگر مطابق با دستورالعمل کیت شرکت Fermentas (ایران) به cDNA (complementary DNA) تبدیل شد. حاصل با روش Real-Time PCR تکثیر و بررسی شد. توالی آغازگرهای پیشرو و معکوس برای ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف در بدین شرح بود:

Nanog

5'-CCT TGG CTG CCG TCT CTG-3' جلویی

5'-GCA AAG CCT CCC AAT CCC-3' برگشتی

Stra8

5'-CTGTGGCA GAACCTCTCGG-3' جلویی

5'-GAACCTCACTTTTGTCCA GGAA-3' برگشتی

Vasa

5'-GATGTTCTTGCATGGTTGGA-3' جلویی

5'-CCATGACTCATCATCTACTGGA-3' برگشتی

Gapdh

5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' جلویی

5'-GGATGCA GGGATGATGTTCT-3' برگشتی

واکنش PCR برای هر کدام از ژن‌ها سه بار و طی ۳۰ چرخه انجام شد. چرخه‌های واکنش شامل: دمای باز شدن رشته‌های DNA ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه دمای مربوط به اتصال ۵۵-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و دمای طویل شدن رشته‌ها ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه بود. *Gapdh* به عنوان ژن کنترل در نظر گرفته شد.

برای بررسی کارایی آغازگرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن (سری‌های رقیق شده DNA) رسم شد. نمودار ذوب

۰/۴ درصد اضافه شد. پس از ۳-۵ دقیقه حدود ۱۰ میکرولیتر از آن به لام نئوبار منتقل شد و سلول‌های زنده و مرده را در چهار خانه شمارشی لوکوسیت‌ها، شمارش و نسبت سلول‌های زنده به کل سلول‌های شمارش شده محاسبه و درصد آن تعیین شد. همچنین برای تعیین تعداد کل سلول‌های زنده در نمونه با اعمال ضریب رقت ۲ (به خاطر رقیق شدن با رنگ تریپان بلو) و ضریب عمق (۱۰)، تعداد سلول‌های زنده در یک میلی‌متر مکعب محاسبه و براساس آن تعداد کل سلول‌های زنده موجود در نمونه حساب شد.

تحلیل ایمنوهیستوشیمی

سلول‌های سرتولی حاوی فیلامنت‌های حد واسط ویمنتین (Vimentin) هستند. در تحلیل ایمنوهیستوشیمی آنتی‌ژن‌های ویمنتین که در سیتوپلاسم سلول سرتولی هستند، مطابق روش میرزاپور و همکاران برای ارزیابی استفاده شدند [۱۰]. برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از آنتی‌بادی‌های اولیه ضد پروتئین هسته‌ای Oct-۴ استفاده شد. این آنتی‌بادی به وسیله آنتی‌بادی ثانویه anti mouse IgM-FITC conjugated شناسایی شد.

بررسی کمی بیان ژن در کلونی‌های اسپرماتوگونی

با استفاده از روش Real-Time PCR

برای تعیین حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی طی کشت، بیان بعضی از ژن‌های اختصاصی (*VASA*، *Nanog*)، *Stra8* در کلونی‌های مشتق از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ۲ تا ۳ هفته پس از کشت بررسی شد. برای طراحی آغازگرهای (Primers) مورد استفاده در Real-Time PCR توالی mRNA ژن‌های مورد نظر از بانک اطلاعاتی NCBI به دست آمد و توالی آگرون‌ها و ایترون‌های آن‌ها مشخص شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار primer3 صورت گرفت. بررسی‌های مولکولی بیان ژن در تمام گروه‌های مورد مطالعه انجام شد. از

ریز محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

و یک تعلیق سلولی حاصل شود. سلول‌های سرتولی با استفاده از DSA لکتین (Datura Stramonium agglutinin-lectin) جدا شدند. سلول‌های اسپرماتوگونی باقی‌مانده با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌متر (Bromodeoxyuridine) BrdU به محیط کشت ۷۲ ساعت قبل از پیوند نشان‌دار شدند. موش‌های گیرنده با استفاده از کتامین (Ketamine) ۱۰ درصد و زایلزین (Xylazine) ۲ درصد (Alfasan، هلند) بیهوش شدند و سپس سلول‌های اسپرماتوگونی به داخل لوله‌های منی‌ساز بیضه چپ موش‌هایی که واکنش‌های ایمنی در آن‌ها کاهش یافته تزریق شدند. بیضه راست به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

توانایی تشکیل کلونی در بیضه موش‌های گیرنده، ۸ هفته پس از پیوند با تعقیب سلول‌های نشان‌دار شده با BrdU مطابق روش میرزاپور و همکاران [۱۳] بررسی شد. سلول‌های اسپرماتوگونی در صورت حضور در محیط کشت، پس از تزریق، روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز مستقر خواهند شد. مسیر این سلول‌ها را می‌توان با BrdU در داخل بیضه تعقیب نمود.

روش‌های تحلیل آماری

تمامی اطلاعات کمی در این پژوهش به شکل میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد و به کمک آزمون آماری ANOVA تجزیه و تحلیل شد. برای سطح معنی‌داری در مقایسه بین گروه‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

جمعیت سلولی به‌دست آمده از لوله‌های منی‌ساز بیضه بیماران، شامل دو نوع سلول مختلف از لحاظ اندازه و شکل بود. نوع اول سلول‌ها کوچک‌تر و دارای ظاهر کروی بودند. این سلول‌ها یک تک‌لایه از سلول‌های سرتولی را ایجاد کردند که فعالیت آلکالین فسفاتازی نداشتند ولی ویمنتین که یک نشانگر مولکولی برای تشخیص سلول‌های سرتولی است در آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱ ب). نوع دوم سلول‌ها که از نوع

(Melting) نیز برای بررسی درستی واکنش‌های PCR انجام شده به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی برای بررسی وجود آلودگی در هر واکنش ارزیابی شد. نمونه کنترل مثبت ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایا، سلول‌های استخراج شده از بافت بیضه در نظر گرفته شد.

نسبت بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: Ct) طبق روش یوان (Yuan) و همکارانش ارزیابی شد [۱۲]. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های $\Delta\Delta Ct$ و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیزه شد. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way analysis of variance: ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون توکی (Tukey) برای بررسی و معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

پیوند بین گونه‌ای (Xenotransplant) سلول‌های

بنیادی اسپرماتوگونی انسانی به بیضه موش

گیرنده مدل آزواسپرما

برای اثبات حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت، ۲-۳ هفته پس از کشت غلظت معینی از این سلول‌ها توسط سوزن‌های ریز مخصوص پیوند به داخل شبکه بیضه (Rete Testis) موش‌هایی گیرنده تزریق شد.

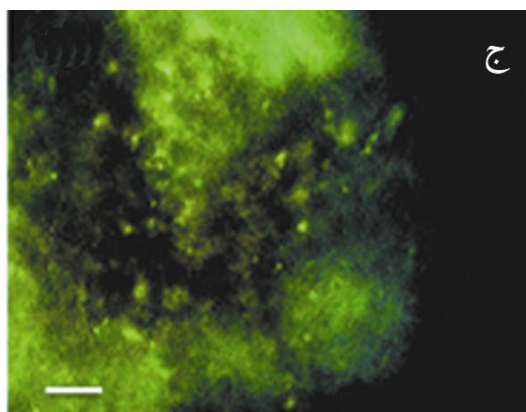
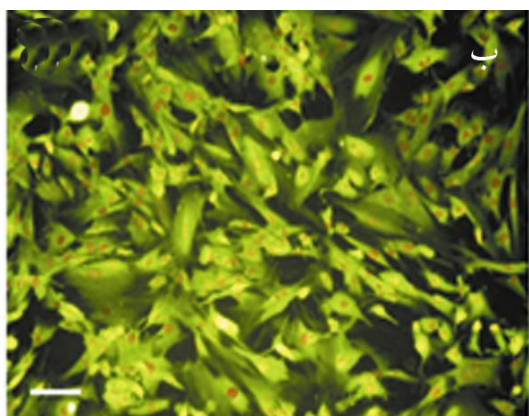
برای این منظور موش‌های نر NMRI (۶-۸ هفته‌ای، $n=8$) از استوک آزمایشگاه خریداری شد. این موش‌ها در معرض غذا و آب در حیوانخانه قرار گرفتند. برای جلوگیری از فعال شدن اسپرم‌زایی ۴ هفته قبل از پیوند، این موش‌ها در معرض بیوسولفان (تزریق داخل صفاقی ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (Sigma، آمریکا) قرار گرفتند.

۲-۳ هفته پس از کشت تعلیق سلولی بیضه، کلونی‌های به‌دست آمده به همراه لایه تغذیه‌کننده در معرض آنزیم تریپسین + EDTA قرار گرفتند تا اتصالات سلولی از بین رفته

طوبیا میرزاپور و ابوالفضل بایرامی

تعداد این کلونی‌ها طی ۳ هفته کشت به میزان زیادی افزایش یافت. این کلونی‌ها فعالیت آلكالین فسفاتازی مثبت داشتند (شکل ۲ الف) در ضمن در لام‌های کنترل که شامل بافت پوششی روده باریک موش نوزاد بود نیز فعالیت آلكالین فسفاتازی مثبت مشاهده شد (شکل ۲ ب).

اول بزرگ‌تر بودند کناره‌های منظم داشته و کروی بودند. این سلول‌ها پس از تکثیر، کلونی‌هایی روی تک لایه سلول‌های سرتولی ایجاد کردند (شکل ۱ الف) به علاوه؛ Oct-4 که یک نشانگر هسته‌ای برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است نیز در کلونی‌ها مشاهده شد (شکل ۱ ج).



شکل ۱ الف) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی ۱۰ روز پس از کشت؛ بزرگنمایی $\times 20$ (ب) واکنش مثبت ایمونوسیتوشیمی برای فیلامنت حد واسط و یمنین در سلول‌های سرتولی (سیتوپلاسم سبز فسفری)؛ بزرگنمایی $\times 10$ (ج) واکنش مثبت ایمونوسیتوشیمی برای پروتئین هسته‌ای Oct-4 در کلونی اسپرماتوگونیایی (هسته‌ها سبز روشن)؛ بزرگنمایی $\times 40$

شد و به کمک یک میکروسکوپ اینورت (Zeiss آلمان) مجهز به خط کش مدرج چشمی قطر کلونی‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه در انتهای روز پنجم سلول‌ها پاساژ در خود شده و به ظرف‌های جدید منتقل نشدند. در پایان هفته‌های اول و دوم و سوم کشت تعداد کلونی‌ها شمارش

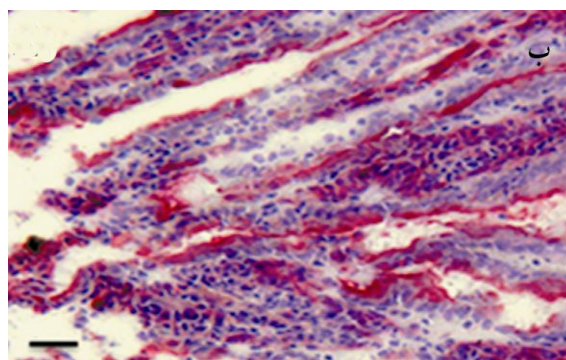
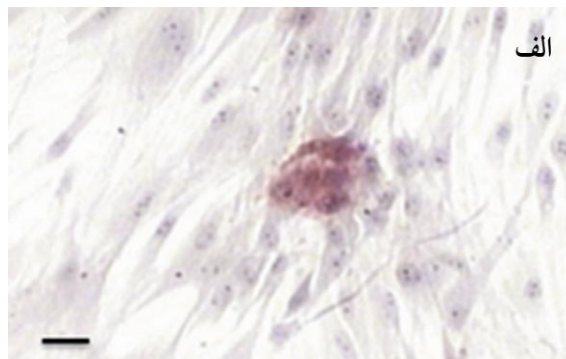
رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

به طوری که در هفته اول کشت بین میانگین تعداد کلونی‌ها در هر یک از گروه‌های کشت ساده ($4/11 \pm 0/7$)، کشت همراه با سلول‌های سرتولی خود بیمار ($23/7 \pm 3/5$) و کشت همراه با سلول‌های سرتولی فرد سالم ($18/75 \pm 1/5$) اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P \leq 0/05$) و کمترین میانگین تعداد کلونی‌ها مربوط به گروه کشت ساده بود.

در هفته دوم نیز مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها در بین هر سه گروه اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P \leq 0/05$) به طوری که بیشترین میانگین تعداد کلونی‌ها در این هفته مربوط به گروه کشت روی سرتولی خود بیمار ($27/94 \pm 4$) و کمترین میانگین تعداد کلونی‌ها مربوط به گروه کشت ساده بود ($10/7 \pm 0/8$).

در هفته سوم میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه کشت روی سرتولی خود بیمار به طور معنی‌دار نسبت به سایر گروه‌های مطالعه بالاتر بود ($36/1 \pm 4$)، ($P \leq 0/05$). در عین حال همچون دو مقطع زمانی دیگر مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها بین هر سه گروه اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد ($P \leq 0/05$).

در گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی خود بیمار، میانگین تعداد کلونی‌ها طی کشت روند رو به افزایشی داشت. این کلونی‌ها از لحاظ اندازه متنوع بودند این موضوع نشانگر آن است که این سلول‌ها یا به شکل همزمان وارد فرآیند کلونیزاسیون نمی‌شوند یا این که ظرفیت آن‌ها از نظر سرعت و تعداد تقسیمات متفاوت است. میانگین تعداد کلونی‌ها در هفته سوم نسبت به هفته اول افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq 0/05$). هر چند که میانگین تعداد کلونی‌ها در هفته دوم نسبت به هفته اول بالاتر بود، ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).



شکل ۲ واکنش مثبت آلکالین فسفاتاز در (الف) کلونی اسپرماتوگونیایی محیط کشت پس از گذشت ۱۰ روز از کشت. بزرگنمایی $\times 20$ (ب) پرزهای جدار روده به عنوان کنترل مثبت؛ بزرگنمایی $\times 20$

همان‌طور که در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کشت شده بدون استفاده از لایه سلول‌های سرتولی (کشت ساده) به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های دیگر بود ($P > 0/05$). مقایسه روند کلونی‌زایی در بین گروه‌های مختلف نشان داد که تعداد کلونی‌ها طی هفته‌های مختلف کشت متفاوت بود.

جدول ۱ مقایسه میانگین تعداد کلونی‌ها (میانگین \pm انحراف معیار) در گروه‌های کشت شده

هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	
$4/11 \pm 0/7^{**}$	$10/7 \pm 0/8^{#,**}$	$15/1 \pm 1^{#,**}$	کشت بدون لایه سلول‌های سرتولی (کشت ساده)
$23/7 \pm 3/5^{**,*}$	$27/94 \pm 4^*$	$36/1 \pm 4^{#,**}$	کشت روی سلول‌های سرتولی خود بیمار
$18/75 \pm 1/5^*$	$23/65 \pm 3^{#,**}$	$29/6 \pm 3^{#,**}$	کشت روی سلول‌های سرتولی شخص سالم

* اختلاف معنی‌دار با گروه کشت ساده در همان هفته؛ ** اختلاف معنی‌دار با گروه کشت روی سرتولی شخص سالم در همان هفته؛ # اختلاف معنی‌دار با هفته اول در همان گروه

کلونی‌ها در میان گروه‌های مختلف نشان داد که در پایان هفته اول بیشترین میانگین قطر کلونی‌ها مربوط به گروه کشت روی سرتولی خود بیمار (۱۶۲/۳±۱۲) و کمترین میانگین قطر کلونی‌ها مربوط به گروه کشت ساده بود (۵۶/۲±۷). در میان گروه‌های تحت مطالعه در دو گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد (۱۶۲/۳±۱۲) و هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی فرد سالم (۱۴۷/۳±۱۲) اختلاف آماری معنی‌داری از نظر قطر کلونی‌ها مشاهده نشد. با وجود تفاوت متفاوت کلونی‌ها در گروه‌های مختلف به نظر می‌رسد هر گروهی که تعداد بیشتری کلونی داشته باشد آن گروه باید میانگین قطر بالاتری داشته باشد ولی عملاً اعداد محاسبه قطر این موضوع را تأیید نمی‌کند. در واقع در بعضی گروه‌ها ممکن است تعداد کلونی کمتر باشد ولی کلونی‌ها از لحاظ اندازه درشت‌تر باشند بنابراین میانگین قطر متفاوت خواهد بود.

به‌طور کلی نتایج نشان داد که روند تغییرات مربوط به تعداد کلونی‌ها در گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی خود فرد و گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی فرد سالم به‌صورت تدریجی و با شیب ملایمی بود. در هفته سوم اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه هم‌کشتی مشاهده نشد. در گروه کشت ساده این الگو با تعداد اولیه کمتر آغاز شد و در نهایت افزایش تعداد با شیب ملایم ادامه داشت؛ به‌طوری‌که میانگین تعداد کلونی‌ها در پایان دوره کشت از دو گروه دیگر کمتر بود. در واقع در گروه کشت ساده به‌دلیل عدم حضور بسیاری از عوامل ترشح شده توسط سلول‌های سرتولی تعداد کمی کلونی‌های کوچک (با قطر کمتر) ظاهر شدند.

مقایسه قطر کلونی‌ها در گروه‌های مختلف کشت

بر اساس نتایج جمع‌آوری شده در جدول ۲ مقایسه قطر

جدول ۲ مقایسه میانگین قطر کلونی‌ها (میانگین±انحراف معیار) در گروه‌های کشت شده بر حسب میکرومتر

هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	
۵۶/۲±۷**	۶۲/۴±۸**	۶۹/۱±۱۰#,**	کشت بدون لایه سلول‌های سرتولی (کشت ساده)
۱۶۲/۳±۱۲*	۱۸۱/۲±۱۵#,*	۲۱۳/۲±۱۷#	کشت روی سلول‌های سرتولی خود بیمار
۱۴۷/۳±۱۲*	۱۷۱/۶±۱۵#,*	۲۰۳/۳±۱۸#	کشت روی سلول‌های سرتولی شخص سالم

* اختلاف معنی‌دار با گروه کشت ساده در همان هفته؛ ** اختلاف معنی‌دار با گروه کشت بر روی سرتولی شخص سالم در همان هفته؛ # اختلاف معنی‌دار با هفته اول در همان گروه

از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0/05$). میانگین قطر کلونی‌ها در هفته‌های مختلف در گروه کشت ساده، نشان‌دهنده این موضوع بود که اختلاف آماری معنی‌داری بین هفته‌ها مشاهده نمی‌شود ($P > 0/05$). تقریباً می‌توان ادعا نمود که در گروه کشت ساده پس از پیدایش کلونی‌ها، تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر میانگین قطر کلونی‌ها طی روند کشت مشاهده نشد.

تجزیه و تحلیل‌های مولکولی با qPCR

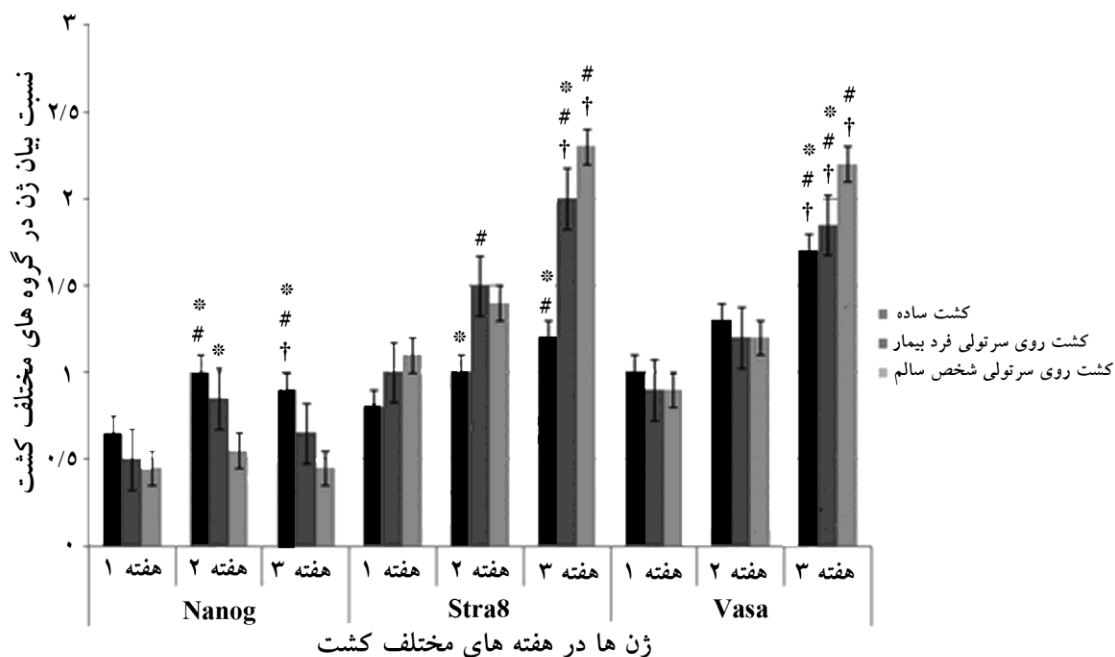
RNA از کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

در هفته دوم روند رشد همچنان ادامه داشت به‌طوری‌که میانگین قطر کلونی‌ها در گروه کشت روی سرتولی خود بیمار (۱۸۱/۲±۱۵) از بقیه گروه‌ها بیشتر بود ($P \leq 0/05$). البته این گروه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی فرد سالم (۱۷۱/۶±۱۵) نداشت ($P > 0/05$). روند تغییرات مربوط به قطر کلونی‌ها در گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی خود فرد و گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی فرد سالم با شیب قابل ملاحظه‌ای طی هفته‌های کشت افزایش یافت. این روند در هر مرحله از زمان نسبت به زمان قبل

رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

۳). برای این منظور در زیر میکروسکوپ در شرایط استریل کلونی‌های درشت‌تر جداسازی و برای استخراج RNA استفاده شد.

استخراج شد و بیان بعضی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی (Nanog, Vasa, Stra8) با استفاده از quantitative PCR و آغازگرهای خاص تحلیل شد (شکل



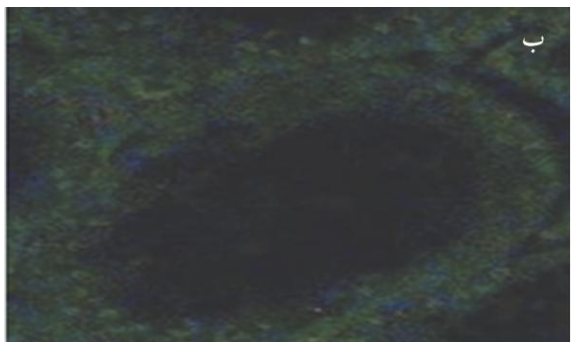
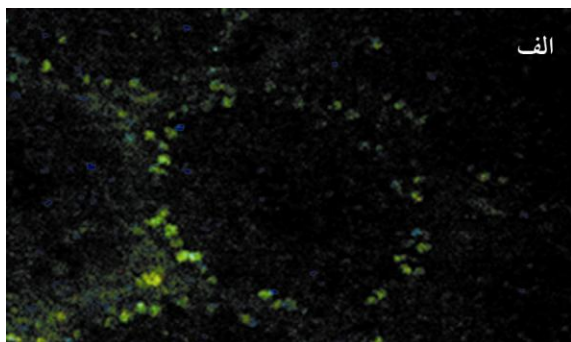
شکل ۳ نسبت بیان ژن‌های Nanog, Stra8, و Vasa در سلول‌های اسپرماتوگونیایی کشت شده در گروه‌های مختلف؛ * اختلاف معنی‌دار با گروه کشت روی سرتولی شخص سالم در هر مقطع زمانی؛ # اختلاف معنی‌دار با هفته اول درون هر گروه؛ † اختلاف معنی‌دار با هفته دوم درون هر گروه

گروه کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P \leq 0/05$). مقایسه میزان نسبی بیان ژن Stra8 در سیستم‌های مختلف کشت نشان داد که در هفته دوم میزان بیان ژن Stra8 در گروه کشت ساده به‌طور معنی‌دار پایین‌تر از سایر گروه‌ها بود ($P \leq 0/05$). از طرفی میزان نسبی بیان ژن Stra8 در گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی خود بیمار از گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی شخص سالم بیشتر بود، ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). طی هفته سوم کشت میزان نسبی بیان این ژن در گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی شخص سالم از گروه کشت همراه با سلول‌های سرتولی فرد بیمار بیشتر شد و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$).

مقایسه میزان نسبی بیان ژن Nanog در سیستم‌های مختلف کشت نشان داد که در هفته دوم کشت بیان نسبی این ژن در گروه کشت ساده، به‌طور معنی‌دار نسبت به بقیه گروه‌ها بالاتر بود ($P \leq 0/05$). البته میزان بیان این ژن در مقایسه با گروه کشت روی سلول‌های سرتولی خود بیمار تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$).

طی هفته سوم نیز میزان نسبی بیان این ژن در گروه کشت ساده بیشترین و در گروه کشت روی سرتولی شخص سالم کمترین میزان را دارا بود و اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد ($P \leq 0/05$). بررسی گروه‌ها در مقاطع زمانی مختلف نشان داد که در هفته سوم، بیان نسبی ژن Nanog در مقایسه با هفته دوم همان

منی ساز ظاهر شدند. این سلول‌ها تکثیر شده و به گسترش جانبی‌شان در طول لوله‌های منی‌ساز ادامه دادند (شکل ۴ الف). در بیضه سمت مقابل که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود نیز به موازات سمت پیوند روند اسپرم‌زایی درون‌زاد از سر گرفته شده بود که می‌تواند به‌عنوان معیاری برای ارزیابی پیوند لحاظ شود.



شکل ۴ بررسی پیوند سلول‌های اسپرماتوگونیای انسانی به داخل بیضه موش‌های بیوسولفان زده پس از گذشت ۸ هفته از پیوند. (الف) سلول‌های اسپرماتوگونیایی انسانی در قاعده لوله‌های منی‌ساز بیضه سمت چپ موش جای‌گیری کرده‌اند. بزرگنمایی $\times 20$ (ب) بیضه سمت راست به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده و هیچ نوع سلولی به داخل آن پیوند نشده است. بزرگنمایی $\times 20$

بحث

مطالعات نشان می‌دهد که ۱۰ الی ۱۵ درصد زوجین از مشکل ناباروری رنج می‌برند. دلیل ۳۵ الی ۴۰ درصد این ناباروری‌ها با مردان مرتبط است. نقص در روند تکوین اسپرم‌ها در بیضه از جمله شایع‌ترین مشکلات این افراد است

بررسی‌های بیان ژن vasa در بین گروه‌های مختلف نشان داد که مقدار بیان نسبی ژن vasa در هفته دوم کشت در همه گروه‌ها تقریباً مشابه و بدون تفاوت آماری معنی‌دار بود ($P > 0.05$).

طی هفته سوم کشت مقدار بیان نسبی این ژن در گروه‌های کشتی مختلف متفاوت از یکدیگر بود؛ به‌طوری‌که در این مقطع زمانی مقدار نسبی بیان ژن vasa در گروه کشت روی سرتولی شخص سالم از بقیه گروه‌ها بیشتر بود و از این نظر اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$).

ارزیابی‌های درون‌گروهی مربوط به هر یک از گروه‌ها در مقاطع زمانی مختلف نشان داد که در هفته سوم میزان نسبی بیان ژن Vasa در هر گروه در مقایسه با هفته دوم همان گروه افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$) (شکل ۳).

بررسی بیضه موش گیرنده پس از پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی

برای این منظور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی قبل از پیوند در معرض محیط کشت حاوی BrdU قرار گرفتند. نتایج نشان داد بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها با این روش نشان‌دار شده بودند. بعد از پیوند سلول‌هایی که BrdU هسته‌ای متصل به FITC (Fluorescein isothiocyanate) را در داخل لوله‌های منی‌ساز نشان می‌دادند به‌عنوان سلول‌های پیوند شده در نظر گرفته شدند. بررسی‌های شکل‌شناسی لوله‌های منی‌ساز بیضه موش گیرنده به کمک میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که بیشتر سلول‌های جرم در لومن لوله‌ها قابل مشاهده هستند. فضای بین سلولی بین زواید سلول سرتولی و سلول‌های جرم مشابه همان حالتی بود که انتظار می‌رفت در حالت طبیعی بین این سلول‌ها در بیضه موش دیده شود. پس از گذشت ۴ هفته از پیوند، سلول‌های حامل BrdU در قاعده لوله‌های منی‌ساز جاگیری کرده بودند. پس از گذشت ۸ هفته سلول‌های پیوند شده به شکل منفرد روی غشا پایه لوله‌های

ریز محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

گذشته در مقایسه با لایه‌های تغذیه کننده دیگر مثل سلول‌های فیروبلست جنین موش (Mouse embryonic fibroblast: MEF) یا سلول‌های STO (SIM louse embryo-derived) (thioguanine andouabain resistant)، سلول‌های سرتولی محیط مناسب‌تری را برای فعل و انفعالات مربوط به تبادل پیام و تنظیم سرنوشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی فراهم می‌کند [۲۲، ۲۳]. این سلول‌ها مشکلات MEF مثل محدودیت دفعات پاساژ سلولی (فقط ۴ تا ۶ پاساژ) را ندارند [۲۴]. در ضمن استفاده از سلول‌های تغذیه کننده‌ای که از بافت بیضه خود بیمار به دست می‌آید کاربرد بالینی آن را در آینده بالا می‌برد و مانع استفاده از محصولات حیوانی می‌شود. به خاطر این که این محصولات می‌توانند به آلودگی ویروسی و تولید سلول‌هایی با پتانسیل تومورزایی ختم شوند [۲۵]. علاوه بر این‌ها؛ بر اساس تئوری دیسک حافظه سلول (Cell Memory Disk: CDM) سلول سرتولی بهترین سلولی است که می‌توان برای هم‌کشتی انتخاب کرد زیرا به دلیل موقعیت مکانی خود نسبت به سلول‌های اسپرماتوگونی، حافظه نگهداری و حمایت از این سلول‌ها را در خود دارند [۲۶-۲۸].

در این مطالعه برای تأیید بیشتر ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی علاوه بر ریخت‌شناسی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و نشانگرهای اختصاصی در این سلول‌ها بررسی شد. واکنش ایمنونوسیتوشیمی وجود پروتئین مربوط به داربست سلولی ویمتین را در سلول‌های سرتولی اثبات کرد. ویمتین پروتئینی است که از روز ۱۴ جنینی به بعد در سلول‌های سرتولی و در اطراف هسته آن‌ها بیان می‌شود [۲۹]. بنابراین نتایج تأیید سلول‌های سرتولی بر اساس وجود پروتئین ویمتین در این مطالعه با یافته‌های ریچبرگ (Richburg) و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت دارد [۳۰].

بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های لایه تغذیه کننده نشان داد که این سلول‌ها فاقد فعالیت این آنزیم هستند. این نتایج با نتایج اسکارپینو (Scarpino) و همکاران [۲۹] که ثابت کرده بودند سلول‌های سرتولی فعالیت آلکالین

که به صورت توقف در اسپرم‌زایی نمود پیدا می‌کند [۱۴]. از طرفی؛ با افزایش تعداد مبتلایان به سرطان و نیز افزایش بقا به دنبال درمان سرطان، باروری مردان محدود شده است، چرا که درمان‌های ضد سرطان به میزان زیادی اسپرم‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تا به امروز انجماد مایع منی، تنها گزینه موجود برای حفظ باروری در این افراد محسوب می‌شود [۱۵]. این روش برای بیماران در سنین قبل از بلوغ به دلیل این که هنوز روند اسپرم‌زایی در این افراد آغاز نشده است، قابل انجام نیست. بنابراین لازم است تکنولوژی‌های نوینی برای حفظ باروری این افراد فراهم شود، به عنوان مثال سلول‌های اسپرماتوگونی از این افراد استخراج شده تحت شرایط آزمایشگاه مورد تکثیر و غنی‌سازی قرار می‌گیرد و سپس با پیوند اتوگرافت به بافت بیضه برگردانده می‌شود. برای افزایش کاربردی این راه‌کارها شناسایی ریز محیط سلول‌های جرم و طراحی سیستم‌های کشت مناسب که بتواند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در شرایط کشت کنترل کند ضروری به نظر می‌رسد [۱۶-۱۸].

در مطالعه حاضر میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی کشت شده بدون حضور سلول‌های سرتولی به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی بود. این یافته‌ها با مطالعه کروجی و همکاران [۱۹] که نتایج مشابهی را در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش‌های بالغ روی سلول‌های سرتولی به دست آوردند هم‌خوانی دارد. در مطالعات دیگر نیز نتایج مشابهی در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از گونه‌های دیگر به دست آمده است [۲۰].

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی درون لوله‌های منی‌ساز بر بستری از اجزای غشای قاعده‌ای و اجزای ماتریکس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix) قرار گرفتند. این ریز محیط خاص علاوه بر فراهم نمودن ساختار خاص سه بعدی به کمک سلول‌های سرتولی، تکامل رده‌های مختلف سلول‌های موجود و سرنوشت آن‌ها را نیز تنظیم می‌کند [۲۱]. بر طبق مطالعات

فسفاتازی ندارند مطابقت دارد.

برای تأیید بیشتر ماهیت سلول‌های اسپرماتوگونی، علاوه بر ریخت‌شناسی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و نشانگر اختصاصی Oct-4 در کلونی‌های حاصل در همه گروه‌های کشت بررسی شد. نتایج نشان داد که سلول‌های کلونی Oct-4 را بیان کرده و دارای فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز هستند. این یافته هم‌راستا با مطالعات قبلی است [۳۱-۳۳].

در مطالعه حاضر برای اثبات حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در کلونی سلول‌های جرم، بیان بعضی از ژن‌های مرتبط با تکثیر این سلول‌ها با استفاده از Real time-PCR بررسی شد. مشاهدات نشان داد که سلول‌های جرم جدا شده از بیماران به میزان زیادی برای نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مثل Stra8 و Vasa مثبت بودند. از طرفی ژن پرتوانی Nanog نیز در گروه هم‌کشتی با سلول سرتولی به مرور زمان طی کشت کاهش یافت. در واقع در سیستم‌های کشت مزبور سلول‌ها حالت پرتوانی را پشت سر گذاشتند، دچار خود تجدیدی شدند و تمایز یافتند. بر اساس مطالعات قبلی Nanog و Oct-4 به‌عنوان عوامل رونویسی مرکزی باعث حفظ ظرفیت پرتوانی و خود تکثیری سلول‌های بنیادی جنینی می‌شوند [۳۴، ۳۵].

در این پژوهش بیان بالای ژن Vasa در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مشاهده شد. این یافته با گزارش‌های کونراد (Conrad) و همکاران [۳۶] که ذکر کردند سلول‌های بنیادی مشابه زایای بالغ انسانی همانند سلول‌های بنیادی جنینی (human embryonic stem cell: hESCs) هستند و به میزان زیادی برای نشانگرهای سلول‌های بنیادی مثل Vasa و Oct4 مثبت هستند تطابق دارد. در مطالعه دیگری سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A ژن Vasa را بیان کردند؛ در حالی که سلول‌های سرتولی که داخل لوله‌های منی‌ساز عمل ضمیمه‌ای دارند این ژن را بیان نکردند [۳۷]. بررسی‌های دیم (Dym) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان داد که در انسان vasa در سلول‌های اسپرماتوگونی و پیش‌سازهای (Progenitor) آن‌ها

بیان می‌شود [۱].

بر پایه مطالعات قبلی بیان ژن Stra8 به میزان زیادی در سلول‌های اسپرماتوگونی مشاهده می‌شود. طی دوران جنینی در موش بیان ژن Stra8 به تکامل غدد جنسی نر محدود می‌شود؛ در حالی که در موش بالغ Stra8 در سلول‌های جرم در مرحله پیش از میوز بیان می‌شود [۳۸]. وانگ (Wang) و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که بیان ژن Stra8 به سلول‌های جرم محدود است و در سلول‌های سوماتیک بیان نمی‌شود. براساس بررسی الگوی بیان و مقایسه توالی اسیدهای آمینه بین موش و انسان مشخص شد که Stra8 انسانی ممکن است در اسپرم‌زایی نقش داشته باشد [۳۹]. در مطالعه حاضر نیز بیان Stra8 در کلونی‌های سلول جرم به‌وسیله Real time-PCR تأیید شد.

تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه کمتر از ۰/۰۳ درصد کل سلول‌های زایا است [۴۰]، بنابراین در نمونه کوچکی که از بیضه یک فرد بالغ نابارور تهیه می‌شود تعداد این سلول‌ها به مراتب کمتر خواهد بود. بنابراین پس از کشت، تعداد کلونی‌های کمتری در مقایسه با نابالغ مشاهده خواهد شد. از این رو پیدا کردن راهی برای غنی‌سازی این سلول‌ها در آزمایشگاه اهمیت زیادی دارد [۴۱].

از آنجایی که در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیماران دچار توقف تقسیم شده بودند فرض بر این شد که ریز محیط این سلول‌ها دچار نقص است و استخراج سلول‌ها از محیط بیضه و کشت آن‌ها روی لایه‌ای از سلول‌های سرتولی افراد سالم می‌تواند نقص ریز محیط را برطرف کند. برای این منظور سلول‌ها روی سرتولی شخص سالم کشت داده شدند و با گروهی که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از استخراج یا به تنهایی یا در حضور سلول‌های سرتولی خود بیمارکشت شده بودند مقایسه شد. نتایج نشان داد ریز محیط هر بیضه برای سلول‌های آن اختصاصی است. این یافته با تئوری دیسک حافظه سلول (CMD) که توسط انجم‌روز برای اولین بار در سال ۲۰۱۳ ارائه شد هم‌خوانی دارد [۲۸]. بر این اساس می‌توان چنین استنباط

ریز محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

به صورت زنجیره‌های پراکنده در داخل لوله‌های منی‌ساز مشاهده شده و هنوز به خوبی جاگیری نشده بودند [۴۱]. بنابراین عملکرد این سلول‌ها پس از گذشت ۸ هفته از پیوند بررسی شد. در مطالعه حاضر در این زمان سلول‌های پیوند شده به صورت منفرد یا جفت در قاعده لوله‌های منی‌ساز نشست و جاگیری کردند. مطالعات قبلی نتایج مشابهی در پیوند بین گونه‌ای سلول‌های بیضه‌ای موش یا رت گزارش کرده‌است [۶، ۴۲]. در واقع پس از پیوند بین گونه‌ای سلول‌های انسانی تکثیر شده در شرایط آزمایشگاه به بیضه موش گیرنده، این سلول‌ها مستقیماً به طرف غشای پایه لوله‌های منی‌ساز حرکت می‌کنند و در آنجا مستقر می‌شوند. این مطلب نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی تکثیر شده در محیط کشت، ظرفیت خود برای تمایز یافتن به سایر سلول‌های خط سلولی جرم را از دست نمی‌دهند. این مطلب با مطالعه Nagano و همکاران [۴۳] که بیان داشتند سلول‌هایی که پس از پیوند، به شکل منفرد یا جفت در قاعده لوله‌های منی‌ساز مستقر می‌شوند دارای کارایی خوبی در کلونیزاسیون بیضه موش‌های گیرنده هستند و به سایر سلول‌های جرم متمایز می‌شوند مطابقت دارد.

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در افرادی که به دلایل مختلف فرآیند اسپرماتوزن در آن‌ها متوقف شده روی سلول‌های سرتولی شخص سالم می‌تواند باعث بهبود ریز محیط سلول‌های جرم شده و بسیاری از عواملی را که برای تکثیر و تمایز این سلول‌ها مورد نیاز است تولید کند. این مطلب می‌تواند کاربردهای بالینی داشته باشد. به‌عنوان مثال می‌تواند برای از سرگیری اسپرم‌زایی در بیماران سرطانی که قبلاً در معرض شیمی‌درمانی یا اشعه درمانی بوده‌اند و بسیاری از سلول‌ها در آن‌ها دچار آسیب شده مؤثر باشد. به‌عبارت دیگر؛ تا وقتی ذخیره سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دچار نقص و نابودی نشده می‌توان آن‌ها را استخراج کرد و روی سلول‌های بیضه‌ای افراد سالم در محیط کشت تکثیر نمود و به آینده روش‌های کمک باروری امیدوار بود.

کرد که سلول‌های اسپرماتوگونی از هر بیضه‌ای که جدا شده باشند اطلاعات مربوط به کشت و واکنش‌های قبلی با ریز محیط اطراف خود را در CMD خود دارند و بنابراین بر اساس آن ریز محیط تنظیم شده و رفتار می‌کنند. سلول‌های اسپرماتوگونی که در حضور سلول‌های سرتولی خود بیمار کشت شدند کلونی‌های بیشتر با قطر زیاد تولید کردند اما این کلونی‌ها از لحاظ تعداد و قطر اختلاف معنی‌داری با گروهی که در آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حضور سلول‌های سرتولی شخص سالم کشت شده بودند نداشتند. در گروه هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی شخص سالم احتمالاً به دلیل تفاوت ریز محیط بیضه و شوکی که سلول‌ها را در ابتدا درگیر آن می‌کند رشد خوبی نسبت به گروه هم‌کشتی با سلول‌های خود بیمار مشاهده نمی‌شود. شاید با افزایش زمان کشت، تعداد و قطر کلونی‌ها در این گروه نسبت به گروه‌های قبل به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یابد.

بررسی بیان ژن‌های خاص سلول‌های اسپرماتوگونی نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در گروه کشت شده با سلول‌های سرتولی شخص سالم به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه کشت شده با سلول‌های سرتولی خود بیمار است. احتمالاً ریز محیطی که توسط سلول‌های سرتولی خود بیمار فراهم می‌شود قادر است تکثیر سلول‌های کلونی را افزایش دهد، به همین دلیل تعداد و قطر کلونی‌ها در این گروه بیشتر شد. در داخل این کلونی‌ها سلول‌ها در مراحل مختلف تمایز بودند و از سلول‌های با تمایز کم (بیان بالای ژن Nanog) تا سلول‌های تمایز یافته‌تر که ژن‌های خاص سلول‌های اسپرماتوگونی (Vasa و Stra8) در آن‌ها به نسبت بیشتری بیان می‌شود حضور داشتند. احتمالاً در گروه کشت شده با سلول‌های سرتولی خود بیمار ریز محیط دارای مشکلاتی است که نمی‌تواند عوامل لازم برای ورود سلول‌ها به فازهای بعدی تمایز و در نهایت تولید اسپرم را فراهم کند.

در مطالعه حاضر سلول‌های اسپرماتوگونی پس از کشت، به بیضه موش مدل آژواسپرمی پیوند شدند. از آنجایی که بر طبق مطالعات قبلی پس از گذشت ۴ هفته از پیوند، سلول‌ها

اردبیلی است از زحمات کارکنان این مرکز و کمک در تهیه نمونه‌های بیوبسی بافت بیضه و نیز در اختیار قرار دادن دستگاه‌ها برای انجام کار تشکر و قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از طرح پژوهشی دانشگاه محقق

منابع

- [1] Dym M, He Z, Jiang J, Pant D, Kokkinaki M. Spermatogonial stem cells: unlimited potential. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21(1): 15-21.
- [2] McLean DJ Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res* 2005; 322(1): 21-31.
- [3] Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414(6859): 98-104.
- [4] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11298-302.
- [5] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β_1 - and α_6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10): 5504-9.
- [6] Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ. In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(6): 709-20.
- [7] Martin GL, Castle EP, Martin AD, Desai PJ, Lallas CD, Ferrigni RG, Andrews PE. Outcomes of laparoscopic radical nephrectomy in the setting of vena caval and renal vein thrombus: seven-year experience. *J Endourol* 2008; 22(8): 1681-5.
- [8] Lim JJ, Sung SY, Kim HJ, Song SH, Hong JY, Yoon TK, Kim JK, Kim KS, Lee DR. Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. *Cell Prolif* 2010; 43(4): 405-17.
- [9] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45(5-6): 281-9.
- [10] Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, Rafieian SH. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1: 41-55.
- [11] Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl* 2003; 24(5): 661-9.
- [12] Sadri-Ardekani HI, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, Hovingh S, de Reijke TM, de la Rosette JJ, van der Veen F, de Rooij DG, Repping S, van Pelt AM. Propagation of human spermatogonial stem

رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

- cells in vitro. JAMA 2009; 302(19): 2127-34.
- [13] Mirzapour T, Movahedin M, Koruji M, Nowroozi MR. Xenotransplantation assessment: morphometric study of human spermatogonial stem cells in recipient mouse testes. *Andrologia* 2015; 47(6): 626-33.
- [14] Bleyer WA. The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin* 1990; 40(6): 355-67.
- [15] Goossens E, Geens M, De Block G, Tournaye H. Spermatogonial survival in long-term human prepubertal xenografts. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 2019-22.
- [16] Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells for fertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(2): 274-80.
- [17] Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* 2002; 113(1): 29-39.
- [18] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(47): 16489-94.
- [19] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Pour-Beiranvand S, Jabbari Arfaee A. Autologous transplantation of adult mice spermatogonial stem cells into gamma irradiated testes. *Cell Journal (Yakhteh)* 2012; 14(2): 82-9.
- [20] van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl* 2001; 22(4): 696-704.
- [21] Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 825-74.
- [22] Hofmann MC, Van Der Wee KS, Dargart JL, Dirami G, Dettin L, Dym M. Establishment and characterization of neonatal mouse sertoli cell lines. *J Androl* 2003; 24(1): 120-30.
- [23] Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 2003; 68(1): 272-81.
- [24] Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 2004; 22(1): 51-64.
- [25] Stacey GN, Cobo F, Nieto A, Talavera P, Healy L, Concha A. The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J Biotechnol* 2006; 125(4): 583-8.
- [26] Anjamrooz SH. CMD kinetics and regenerative medicine. *Am J Transl Res* 2016; 8(3): 1615-24.
- [27] Anjamrooz SH. Cell memory-based therapy. *J Cell Mol Med* 2015; 19(11): 2682-9.
- [28] Anjamrooz SH. The cellular memory disc of reprogrammed cells. *Stem Cell Rev* 2013; 9(2): 190-209.
- [29] Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Froyosa B, Soder O, Boitani C. A rapid method of

- Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Molecular Cell Endocrinology* 1998; 146(1-2): 121-7.
- [30] Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 137(1): 42-50.
- [31] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004; 71(3): 722-31.
- [32] Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L. OCT4: A sensitive and specific biomarkers for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8544-7.
- [33] Shi YQ, Wang QZ, Liao SY, Zhang Y, Liu YX, Han CS. In vitro propagation of spermatogonial stem cells from KM mice. *Front Biosci* 2006; 11: 2614-22.
- [34] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6): 947-56.
- [35] Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38(4): 431-40.
- [36] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7220): 344-9.
- [37] Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(17): 9585-90.
- [38] Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dollé P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* 1996; 135(2): 469-77.
- [39] Miyamoto T, Sengoku K, Takuma N, Hasuike S, Hayashi H, Yamauchi T, Yamashita T, Ishikawa M. Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(11): 531-5.
- [40] Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296(5576): 2174-6.
- [41] Brinster RL, Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(4): 401-9.
- [42] Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381(6581): 418-21.
- [43] Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient

رین محیط اختصاصی بیضه و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

testes. Biol Reprod 1999; 60(6): 1429-36.

[44] Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC.

An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. Nat Genet 2001; 27(4): 422-6.