● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۶، ص ۸۲۸-۷۹۷، ۱۳۹۵

مقالهٔ مروری

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز: زیست‌شناسی، جداسازی، کشت، تعیین هویت و چشم‌اندازهای کاربردی

سجاد سی‌سخت‌نژاد [۱*]، احمد رضا بهرامی [۲]، مریم مقدم متین [۲]، فاطمه بهنام رسولی [۳]، مجید مومنی مقدم [۴]، سهراب بوذرپور [۵]

خلاصه

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز که همچنین سلول‌های بنیادی ژرمی نامیده می‌شوند، پایه و اساس فرایند اسپرمزایی در بافت بیضه می‌باشند. آنها همچنین سلول‌های با ارزشی جهت کاربردهای گوناگون در زمینه زیست‌شناسی تکاملی، زیست‌فناوری و پزشکی هستند. شناخت و درک جدیدترین یافته‌های مرتبط با اساس سلولی و مولکولی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و همچنین روش‌های دسترسی به این سلول‌ها برای کاربردهای آنها در زمینه پزشکی برای درمان برخی مشکلات ناباروری و نیز در زمینه زیست‌فناوری برای تولید حیوانات تراریخت مهم و ضروری می‌باشد. مقاله مروری حاضر به‌منظور توضیح اساس سلولی و مولکولی تکامل، خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز پستانداران و پرندگان در کنام طبیعی آنها و نیز تحت شرایط آزمایشگاهی ارائه شده است. به‌علاوه، این مطالعه شاخص‌های مولکولی اختصاصی، جهت تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را نشان می‌دهد. ما همچنین روش‌هایی را جهت جداسازی، کشت و غنی‌سازی این سلول‌ها معرفی کرده‌ایم. در انتها، اهمیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در حیطه‌های مختلف و چشم‌اندازهای کاربردی آنها و نیز تمایز سایر سلول‌های بنیادی جهت دستیابی به سلول‌های شبه اسپرماتوگونیا و اسپرماتید تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی اسپرم‌ساز، خودنوزایی، تمایز، شاخص مولکولی، باروری

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران ۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران ۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران ۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران ۵- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد، گنبد کاووس، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir

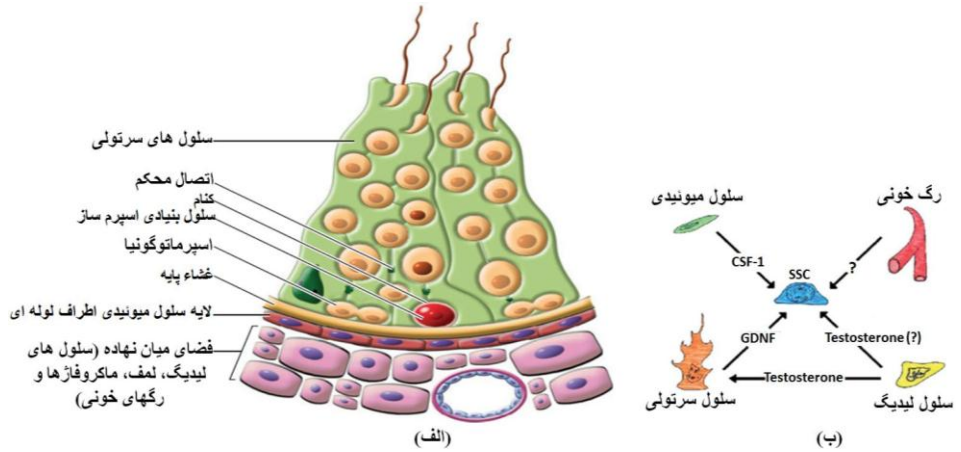
دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱/۲۱ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۴/۹/۱۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۴/۹/۲۵

مقدمه

وجود و تولید مداوم و بسیار زیاد سلول‌های هاپلوئید اسپرماتوزوآ لازمه بارور بودن مردان می‌باشد. به‌منظور حفظ تولید این سلول‌ها طی حیات فرد، اسپرماتوزوآی جدید به‌طور پیوسته به‌وسیله فرآیندی بنام اسپرم‌زایی تولید می‌شوند. در ابتدای این فرآیند مخزنی از سلول‌های بنیادی تک‌توان به‌نام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز (Spermatogonial stem cell: SSC) قرار دارد. در واقع اسپرم‌زایی فرآیندی پیچیده است که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تمایز یافته و اسپرماتوزوآ را تشکیل می‌دهند (۱). Huckins و همکارش در سال ۱۹۷۱ طی مطالعه‌ای که بر روی رت انجام دادند برای اولین بار وجود سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را گزارش کردند (۲).

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در طی تکوین جنینی از سلول‌های زاینده جنسی آغازین منشاء گرفته و به‌صورت غیرفعال بر روی غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه قرار می‌گیرند و به‌وسیله سلول‌های سوماتیک سرتولی پیرامونی حمایت می‌شوند. این سلول‌های سوماتیک، فاکتورهای رشد و دیگر عوامل لازم جهت تنظیم رشد، خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را فراهم می‌آورند (شکل ۱) (۳،۴). با فرا رسیدن سن بلوغ، فرآیند اسپرم‌زایی با تقسیم میتوزی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز شروع می‌شود. این تقسیم میتوزی می‌تواند منجر به تولید دو سلول بنیادی اسپرم‌ساز جدید (فرآیند خودنوزایی) و یا منجر به تولید دو سلول دختری شود که در نهایت متعهد به تمایز به سمت اسپرماتوزوآ هستند (شکل ۲). سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌وسیله حفظ تعادل دقیق بین خودنوزایی و تمایز، از یک طرف خود را حفظ کرده و از طرف دیگر نیاز دائمی را برای سلول‌های جنسی فراهم می‌آورند (۱).

علاوه بر اهمیت بسیار بالای سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در داخل بدن جهت باروری جنس نر، همچنین امروزه دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در آزمایشگاه از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. در واقع دسترسی به این سلول‌ها، نه تنها می‌تواند دانش و درک ما را در رابطه با زیست‌شناسی این سلول‌ها و فرآیند اسپرم‌زایی افزایش دهد، بلکه همچنین ظرفیت دستکاری این سلول‌ها را جهت کاربردهای عملی در زمینه‌های زیست‌فناوری و پزشکی، بهبود می‌بخشد. این مقاله مروری به منظور شناخت تکوین و خصوصیات سلولی و مولکولی سلول‌ها بنیادی اسپرم‌ساز، عوامل مؤثر بر خودنوزایی و تمایز آنها در کنام (Niche) طبیعی و همچنین تحت شرایط آزمایشگاهی، روش‌های دسترسی به این سلول‌ها و خالص‌سازی آنها و همچنین شناخت قابلیت‌ها و چشم‌اندازهای کاربردی آنها در حیطه‌های مختلف زیست‌فناوری و پزشکی ارائه شده است.



شکل ۱. *الف) مقطعی از لوله اسپرم‌ساز و اجزاء تشکیل دهنده آن*

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بر روی غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز و تحت حمایت سلول‌های سرتولی، میوئیدی و لیدیگ قرار می‌گیرند. طی روند تمایزی، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تولید انواع سلول‌های اسپرماتوگونیا را می‌کنند که درنهایت این سلول‌ها تبدیل به سلول‌های اسپرمی می‌شوند (۳)؛ ب) کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز. در داخل بافت لوله اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تحت حمایت انواع مختلفی از سلول‌ها قرار می‌گیرند. این سلول‌ها با ترشح و تولید انواع فاکتورهای رشد همانند GDNF، CSF-1 و هورمون تستسترون پتانسیل خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱).

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و تکوین آنها

به‌منظور فهم تنظیم سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، درک آنها طی تکوین این سلول‌ها ضروری می‌باشد. در ذیل به تفکیک، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در دودمان اسپرم‌ساز جوندگان، پریمات‌ها و پرندگان مورد بررسی قرار گرفته است.

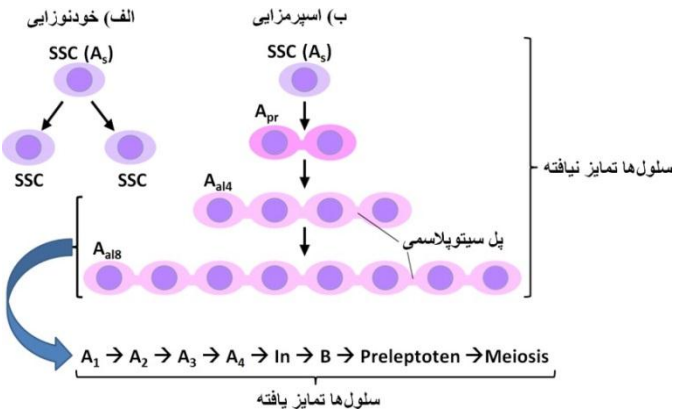
سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و تکوین آنها در جوندگان

اسپرم‌زایی یک فرآیند چند مرحله‌ای است که طی آن تولید اسپرماتوزوآ طی چرخه‌ای از مراحل تکثیر و تمایز با تقسیمات سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز شروع می‌شود. در طی تکوین جنینی، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در بیضه پیش از تولد از گونوسیت‌های (پرواسپرماتوگونیا) منشاء گرفته از سلول‌های زاینده جنسی آغازین (Primordial germ cells: PGCs)، به‌وجود می‌آیند. گونوسیت، یک واژه کلی است که بر حسب ترتیب تکوینی خود شامل سه نوع گونوسیت‌های M، T_1 و T_2 می‌باشند. با به‌وجود آمدن و کلونیزه شدن گونوسیت‌های T_2 در غشاء پایه، تولید و تثبیت اولین مخزن اسپرماتوگونیای تمایز نیافته (سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز) رخ می‌دهد و در نتیجه آن، اسپرم‌زایی در طی حیات موجود حفظ می‌شود (۱،۵).

اسپرماتوگونیا، سلول‌های زاینده جنسی دیپلوئیدی هستند که بر روی غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار گرفته‌اند. از زمان شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونیا در پستانداران، این سلول‌ها را بر اساس ریخت‌شناسی هسته به ۳ دسته اسپرماتوگونیای A، حد واسط (Intermediate: In) و B تقسیم کرده‌اند (۳،۶). نوع A به‌عنوان اولین نوع تلقی می‌گردد، زیرا هسته آن فاقد هتروکروماتین بوده و این یکی از ویژگی‌های سلول‌های تمایز نیافته است. هسته اسپرماتوگونیای حدواسط حاوی مقدار بسیار اندک هتروکروماتین و نوع B حاوی مقادیر زیادی

هتروکروماتین می‌باشد که این ویژگی سلول‌های تمایزیافته است (۹-۷).

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های منفردی هستند که در غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار دارند و اسپرماتوگونیای A منفرد (A_{single}: A_s) نامیده می‌شوند (۱۰). این سلول‌ها با انجام تقسیم میتوز، هرکدام به دو سلول منفرد جدید یا یک جفت اسپرماتوگونیای A جفت(A_{paired}: A_{pr}) که تقسیم سیتوپلاسم را به‌طور ناقص انجام داده (به‌وسیله پل بین سلولی به‌همدیگر متصل هستند)، تقسیم می‌شوند (۱۱). اعتقاد بر این است که اسپرماتوگونیای A_{pr} متعهد به تمایز هستند. تقسیم سیتوپلاسم، در سلول‌های بعدی حاصل از تقسیم اسپرماتوگونیای A_{pr} نیز ناقص انجام می‌شود و در نتیجه تعداد بسیار زیادی سلول زاینده جنسی به هم پیوسته ایجاد می‌شود (شکل ۱) (۱۲).



شکل ۲. *سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و تکوین آنها در جوندگان.*

الف) فرایند خودنوزایی، ب) تمایز به‌منظور اسپرمزایی(۱۳).

اسپرماتوگونیای A_{pr} از لحاظ ریخت‌شناسی شبیه به اسپرماتوگونیای A_s می‌باشند و تشکیل پل بین سلولی را می‌توان به‌عنوان اولین نشانه در ورود این سلول‌ها به سمت مسیر تمایز به حساب آورد. اسپرماتوگونیای A_{pr} تقسیمات بیشتری را انجام می‌دهند تا اسپرماتوگونیای ردیف شده (A-aligned: A_{al})، شامل زنجیره‌های ۴، ۸، ۱۶ و به ندرت ۳۲ سلولی، را ایجاد کنند. در بیضه موش، اسپرماتوگونیای A_{pr} و A_{al}، ۱۶-۲ برابر بیشتر از A_s می‌باشند (۱۰). اگر چه اسپرماتوگونیای A_s به‌طور معمول به‌عنوان سلول بنیادی اسپرم‌ساز در نظر گرفته می‌شوند، اما مشخص شده است که A_s، A_{pr} و A_{al} به‌عنوان اسپرماتوگونیای A تمایزنیافته (A_{undiff}) به حساب می‌آیند (۱۳)، چرا که مطالعات پیشنهاد می‌کنند که A_{pr} و A_{al} ممکن است هنوز ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را در برخی از شرایط داشته باشند (۱۵).

در زمان تعیین شده، اسپرماتوگونیای A_{al} بدون انجام میتوز تمایز می‌یابند و تبدیل به اسپرماتوگونیای A_1 می‌شوند. این تمایز شامل تغییرات ساختاری (ریخت‌شناسی) جزئی و تغییر در ویژگی‌های چرخه سلولی اسپرماتوگونیا می‌باشد (۹-۷). تبدیل اسپرماتوگونیای A اولیه به اسپرماتوگونیای A_1 همراه با افزایش بیان نشانگر سطح سلولی c-KIT می‌باشد (۱۶).

در بسیاری از پستانداران غیر پریماتی، ۵ تقسیم میتوزی به‌دنبال تولید اسپرماتوگونیای A_1 رخ می‌دهد که به‌ترتیب منجر به تشکیل اسپرماتوگونیای A_2، A_3، A_4، حدواسط و B می‌شود. اسپرماتوگونیای B خود با انجام تقسیم میتوزی تبدیل به اسپرماتوسیت‌ها می‌شوند (شکل ۲). به‌طورکلی، در اینجا ۱۰ تقسیم میتوزی بین سلول بنیادی اسپرم‌ساز و تشکیل اسپرماتوسیت‌ها رخ می‌دهد (۹). اسپرماتوسیت‌ها درنهایت ۲ تقسیم میوزی را متحمل می‌شوند و بعد از آن که اسپرماتیدهای هاپلوئید تولید شدند، آنها فرآیند ایجاد اسپرم‌های بالغ از لحاظ ریخت‌شناسی را شروع می‌کنند (۱۰).

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و تکوین آنها در پریمات‌ها

برای اولین بار در سال ۱۹۵۹، ۲ نوع مجزا از اسپرماتوگونیای تمایزنیافته که از لحاظ ریخت‌شناسی با هم تفاوت داشتند، در بیضه *Rhesus macaques* شناسایی شد و آنها را سلول‌های A_1 و A_2 نامگذاری کردند؛ ولی نام آنها، بعدها به‌ترتیب به A_{dark} و A_{pale} تغییر یافت. هر دو سلول در لوله‌های اسپرم‌ساز حضور داشتند، اما بر اساس ساختار هسته و شدت رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین متفاوت بودند. پیشنهاد شد که A_{dark} همان سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز هستند که از یک طرف متحمل تقسیمات خودنوزایی جهت حفظ مخزن سلول بنیادی شده و از طرف دیگر به سلول‌های A_{pale} تبدیل می‌شوند که در نهایت اسپرماتوگونیای نوع B تمایزیافته را تولید می‌کنند (۱۷).

۱۰ سال بعد از تعریف اسپرماتوگونیای A_{dark} و A_{pale}، Clermont مدل اولیه خود را (مدل سلول‌های بنیادی A_{dark}–A_{pale}) بر اساس مشاهدات انجام شده در میمون وروت (Vervet: *Cercopithecus aethiops*) تغییر داد. بر اساس این مشاهدات، او بیان کرد که A_{dark} خودنوزایی را به‌طور ثابت و پویا نشان نمی‌دهد. با توجه به این امر، او پیشنهاد کرد که سلول‌های A_{dark} و A_{pale}، به‌ترتیب سلول‌های بنیادی ذخیره‌ای و فعال هستند و در نتیجه مدل سلول‌های بنیادی ذخیره‌ای را ارائه نمود. در این مدل، اسپرم‌زایی به‌وسیله مخزن فعال سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز A_{pale}، در شرایط طبیعی حفظ می‌شود (۱۷).

مدل مشابهی برای اسپرم‌زایی انسان پیشنهاد شده است، جایی که هر دوی اسپرماتوگونیای A_{dark} و A_{pale} وجود دارند و تکثیر فعال A_{pale}، فرآیند اسپرم‌زایی را حفظ می‌کند (۱۸،۱۹). بررسی‌ها نشان داده‌اند که شاخص میتوزی پایین A_{dark}، به‌طور ویژه نماینده فنوتیپ سلول بنیادی واقعی است. این در حالی است که تقسیمات منظم A_{pale}، نشان دهنده آن است که این سلول‌ها پیش‌سازهای خود تجدید شونده‌ای هستند که بخشی از آنها به سمت تولید اسپرماتوگونیای نوع B تمایز حاصل می‌کنند (۲۱،۲۰).

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و تکوین آنها در پرندگان

در جوجه، تخمگذاری ۲۳–۲۰ ساعت بعد از جفت‌گیری انجام می‌شود. مراحل اولیه تکوین جنینی در تخمدان رخ می‌دهد و به‌طور قراردادی به ۱۴ مرحله تقسیم می‌شود، که به‌وسیله اعداد رومی شماره‌گذاری می‌شوند (برطبق مدل Eyal-Giladi & Kochav 1976، مرحله I تا XIV) (۲۲، ۲۳). سلول‌های لقاح‌یافته، تقسیمات سریعی را متحمل می‌شوند و به جنین مرحله X تبدیل می‌شوند که اکنون متشکل از ۵۰–۲۰ هزار سلول بنام سلول‌های بلاستودرمال می‌باشد. از لحاظ ریخت‌شناسی، جنین مرحله X به ناحیه محیطی یا کدر و ناحیه مرکزی یا شفاف تقسیم می‌شود. ناحیه مرکزی به‌وسیله ناحیه محیطی احاطه شده است. کل جنین و برخی

از بافت‌های خارج جنینی از اپی‌بلاست منشاء می‌گیرند، که از زرده به‌وسیله حفره ساب ژرمینال مجزا می‌شود (۲۲).

سلول‌های زاینده جنسی آغازین، پیش‌ساز سلول‌های تخمک و اسپرم می‌باشند که ارتباط ژنتیکی بین نسل‌ها را برقرار می‌کنند (۲۴). همچنانکه در جدول ۱ نشان داده شده است، در مرحله ۴ تکوین جنینی در پرندگان (تقریبا ۱۹-۱۸ ساعت بعد از انکوبه شدن)، سلول‌های زاینده جنسی آغازین از اپی‌بلاست منشاء گرفته و به هیپوبلاست ناحیه شفاف (هلال زاینده Germinal crescent) مهاجرت می‌کنند. بین مراحل تکوینی ۱۰ و ۱۲، سلول‌های زاینده جنسی آغازین از هلال زاینده به جریان خون وارد می‌شوند و از طریق سیستم جریان خون مهاجرت می‌کنند تا زمانی که آنها در برجستگی‌های تناسلی (پیش‌سازهای گنادهای بالغ) مقیم شوند (۲۷-۲۵). این روند، با پستانداران قابل مقایسه می‌باشد چرا که در آنها نیز سلول‌های زاینده جنسی آغازین از طریق بافت‌های جنینی جهت رسیدن به مقصدشان، مهاجرت می‌کنند (۲۷). مطالعات حاکی از آنند که فاکتور c-KIT/STEEL و همچنین SDF-1/CXCR4 نقش مهمی را در این هدایت بازی می‌کنند، اگر چه مکانیسم دقیق مولکولی آن از جمله یافتن نقش ویژه ژن‌هایی از قبیل *Dnd* Deadend نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (۲۲،۲۸،۲۹). در برجستگی‌های تناسلی، همانگونه که قبلاً عنوان شد، سلول‌های زاینده جنسی آغازین تبدیل به سلول‌هایی به‌نام گونوسیت می‌شوند و در نهایت این گونوسیت‌ها هستندکه تبدیل به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شوند (۱،۱۶).

جدول ۱. *الگوی مهاجرت سلول‌های زاینده جنسی آغازین در پرندگان و پستانداران (۲۷).*

ارگانیسم	مرحله تکاملی	منشاء و الگوی مهاجرت
پرندگان (جوجه)	مرحله X جنینی	ناحیه مرکز بخش شفاف
	مرحله ۴ جنینی	هلال زاینده
	مراحل ۱۰ تا ۱۷ جنینی	وارد شدن و حرکت در جریان خون
	مراحل ۲۶-۲۰ جنینی	مهاجرت و مقیم شدن در گناد جنینی
	بیرون آمدن از تخم	تکثیر و تمایز در اندام جنسی
پستانداران (موش)	روز ۶/۵-۶ جنینی	منشاء گرفتن از اپی‌بلاست
	روز ۷/۵-۷ جنینی	اولین ظهور آنها در پشت ناحیه دستگاه گوارش اولیه
	روز ۹/۵	خارج شدن از پشت ناحیه دستگاه گوارش اولیه و مهاجرت به برجستگی پیشآبی-تناسلی
	روز ۱۱/۵	مهاجرت به برجستگی تناسلی
	تولد	تکثیر و تمایز در اندام جنسی

ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

مطالعاتی که ریخت‌شناسی اسپرماتوگونیا را توضیح داده‌اند، بسیار اندک می‌باشند و بسیاری از این مطالعات نیز ریخت‌شناسی اسپرماتوگونیا را به شکل کم و بیش سطحی و نه دقیق توضیح می‌دهند. هر چند که با استفاده از میکروسکوپ نوری با قدرت تفکیک بالا و استفاده از بافت احاطه شده به‌وسیله پلاستیک و تثبیت شده به‌طور ویژه، توانستند تفاوت‌های ظریفی را مشاهده کنند. در مقایسه با

اسپرماتوگونیای تمایزیافته، اسپرماتوگونیای A_s تا A_{al} فاقد هتروکرماتین در کناره‌های هسته می‌باشند، اما دارای لکه‌های نامنظم رنگی در سرتاسر هسته می‌باشند (۹-۷). با این حال، حتی با ریخت‌شناسی بسیار خوب و چشم مسلح، شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در برش‌های بافتی بسیار مشکل می‌باشد. مطالعات انجام شده در رابطه با ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، به‌طور عمده در پستانداران انجام گرفته است و تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در رابطه با پرندگان گزارش نشده است.

تعداد سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

در جنس نر به‌منظور حفظ اسپرم‌زایی در سرتاسر زندگی، سلول‌های زاینده جنسی جدید به‌طور ثابت تولید می‌شوند. سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌وسیله حفظ تعادل دقیق بین خودنوزایی و تمایز، نیاز دائمی به سلول‌های زاینده جنسی را فراهم می‌کنند. مکانیسم‌هایی که به‌وسیله آن این تعادل حفظ می‌شود هنوز تاحد بسیار زیادی ناشناخته است. متأسفانه مطالعه این مکانیسم‌ها، به‌علت کمبود روش‌های خالص‌سازی این سلول‌ها از بیضه، مشکل می‌باشد. همچنین یکی دیگر از موانع موجود در راه مطالعه سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، تعداد اندک این سلول‌ها در بیضه می‌باشد. مشخص شده است که در موش سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، ۰/۰۳ درصدکل سلول‌های زاینده جنسی، ۱/۲۵ درصد همه اسپرماتوگونیا و تقریبا تعداد ۳۵۰۰۰ سلول را در هر بیضه موش تشکیل می‌دهند (۳۰). در بیضه رت، تعداد سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ۱۰ برابر بیشتر می‌باشد و تصور می‌شود که تعداد آنها در هر بیضه رت ۳۵۰۰۰۰ سلول باشد (۱۰، ۳۰). تعداد این سلول‌ها در بیوپسی حاصل از بیضه انسان‌های پیش از بلوغ (۱۰-۲ ساله) ۳ درصد کل سلول‌ها یا ۱۱۷۰۰ اسپرماتوگونیا به ازای هر بیوپسی تخمین زده شده است (۳۲). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موجود در بیضه جوجه‌های بالغ ۱/۹ برابر بیشتر از موش است (۳۰،۳۱).

کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز درون محیط ویژه‌ای به نام کنام قرار گرفته‌اند (شکل ۱ الف) که هموستازی بیضه را به‌وسیله برقراری تعادل بین خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، تنظیم می‌کند (۳۵-۳۳). کنام سلول‌های بنیادی متشکل از سلول‌های سوماتیک پیرامونی، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای محلول موضعی موجود در مجاورت سلول‌های بنیادی است که سرنوشت این سلول‌ها را تعیین و تنظیم می‌کند. پایه ساختاری کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در بیضه پستانداران، غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز است که متشکل از سلول‌های سرتولی و سلول‌های میوئیدی اطراف لوله‌ای می‌باشد (شکل ۱ ب). سلول‌های سرتولی و میوئیدی به همراه یکدیگر ترکیبات غشاء پایه را ترشح می‌کنند که از طریق آنها سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز با استفاده از مولکول‌های چسبنده به غشاء پایه متصل می‌شوند. به‌طورکلی، کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز مسئول پیام‌های اندوکرین و پاراکرین دخیل در تنظیم خودنوزایی و تمایز است (۶،۳،۱).

در درون لوله‌های اسپرم‌ساز، سلول‌های زاینده جنسی به‌وسیله سلول‌های سرتولی حمایت می‌شوند (شکل ۱ ب). واژه سلول‌های سرتولی، در سال ۱۸۶۵ به‌وسیله Enrico Sertoli ارائه گردید (۳۶). سلول‌های سرتولی نوعی سلول اپیتلیالی ستونی قطبی شده هستند که بر روی غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز قرار گرفته‌اند اما انشعابات سیتوپلاسمی آنها به لومن لوله‌های اسپرم‌ساز می‌رسد و بنابراین می‌توانند سلول‌های زاینده جنسی را در طی همه مراحل تکوینی حمایت کنند. این سلول‌های سوماتیک انواع مختلف فاکتورها، از جمله فاکتورهای رشد را تولید و ترشح

می‌کنند که تنظیم خودنوزایی و تمایز سلول‌های زاینده جنسی را سبب می‌شوند (۱،۳،۶). مطالعات انجام شده حاکی از آنند که در موش، ۱۲ روز پس از تولد و در رت ۱۶-۱۴ روز پس از تولد، تقسیم سلول‌های سرتولی متوقف شده و به‌طور کامل تمایز می‌یابند (۳۷،۳۸). پس از آن، تعداد سلول‌های سرتولی در طول لوله‌های اسپرم‌ساز در همه مراحل چرخه اپیتلیالی در سرتاسر حیات حیوان، ثابت باقی می‌ماند (۳۹). بدلیل اینکه نقش اصلی سلول‌های سرتولی تغذیه سلول‌های زاینده جنسی در طی چرخه اسپرم‌زایی می‌باشد، می‌توان این سلول‌ها را مادر و یا پرستار سلول‌های زاینده جنسی نامید (۴۰). سلول‌های سرتولی همچنین دارای نقش فاگوسیت کننده هستند و قادرند باقیمانده‌های سیتوپلاسمی را در طی فرآیند اسپرم‌زایی مصرف کنند (۴۱). مهاجرت سلول‌های زاینده جنسی از غشاء پایه به سمت لومن لوله‌های اسپرم‌ساز از طریق تغییرات ساختاری ایجاد شده در حاشیه‌های جانبی سلول‌های سرتولی رخ می‌دهد (۴).

همچنان‌که در بالا اشاره شد، سلول‌های سرتولی قادر به تولید و ترشح انواع مختلفی از مواد هورمونی و فاکتورهای رشد هستند که برای حفظ خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در طی چرخه اسپرم‌زایی ضروری می‌باشند. این ترکیبات عبارتند از:

- هورمون آنتی‌مولرین که در طی مراحل اولیه زندگی جنینی ترشح می‌شود (۴۲).
- اینهیبین و اکتیوین‌ها که بعد از بلوغ ترشح می‌شوند و با همدیگر در تنظیم ترشح هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) ایفای نقش می‌کنند (۴۳،۴۴).
- پروتئین متصل‌شونده به اندروژن (یا گلوبولین متصل شونده به تستسترون) که باعث افزایش غلظت تستسترون در لوله‌های اسپرم‌ساز جهت تحریک فرآیند اسپرم‌زایی می‌شود (۴۵).
- استرادیول آروماتاز که در تبدیل تستسترون به ۱۷- بتا استرادیول نقش دارد. این ترکیب جدید در بیضه در هدایت و جهت دهی چرخه اسپرم‌زایی نقش دارد (۴۶).
- فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از رده سلولی گلیال که در القاء خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نقش دارد (۳).
- همچنین این سلول‌ها قادر به بیان انواع مختلفی از فاکتورهای پروتئینی دیگر همانند ترانسفرین (۴)، فاکتورهای رونویسی مانند ETS/ERM (۴۷) و انواع بسیاری از فاکتورهای دیگر دخیل در تکوین سلول‌های زاینده جنسی می‌باشند.

اهمیت سلول‌های سرتولی برای تمایز سلول‌های زاینده جنسی، به‌وسیله پیوند سلول‌های سرتولی طبیعی به بیضه گیرنده عقیم موتانت برای سلول‌های سرتولی و شروع موفقیت‌آمیز فرآیند اسپرم‌زایی و به‌دست آمدن اسپرماتوگونیا، نشان داده شده است (۴۸،۴۹).

در بیضه پستانداران، سلول‌های سرتولی اصلی‌ترین کمک کننده به کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز هستند، البته سایر سلول‌های سوماتیک از قبیل سلول‌های میوئیدی اطراف لوله‌ای و لیدیگ نیز در این پدیده نقش دارند (شکل ۱). اسپرماتوگونیای A_{pr} و A_{al} (زاده‌های دختری تمایزیافته از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز) را در نواحی از لوله‌های اسپرم‌ساز، مجاور خوشه‌های سلول‌های لیدیگ مشاهده کرده‌اند و این پیشنهاد می‌کند که این سلول‌ها ممکن است در کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز نقش داشته باشند (۵۰). مطالعات اولیه حاکی از آنند که سلول‌های لیدیگ و به احتمال زیاد سلول‌های میوئیدی، با تولید (Colony stimulating CSF1 factor-1) بر روی خودنوزایی

سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش اثر می‌گذارند. عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ و به احتمال زیاد ترکیبات تولید شده توسط آنها، به‌ترتیب به‌وسیله هورمون‌های تحریک‌کننده فولیکول (FSH) و هورمون جسم زرد (LH) تنظیم می‌شود که از قسمت جلویی غده هیپوفیزی در پاسخ به تحریک هورمون آزاد کننده گنادوتروپین ترشح می‌شوند. مهار آزادسازی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین چند روز پس از تولد موش، تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را مختل می‌کند؛ در حالی که در موش‌های بالغ زمانی که هورمون آزاد کننده گنادوتروپین مهار می‌شود، تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز افزایش می‌یابد (۵۱). مطالعات مقدماتی دیگر نشان داده‌اند که خنثی‌سازی ایمنولوژیک هورمون آزاد کننده گنادوتروپین در موش، منجر به از دست رفتن فعالیت زیستی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شود (۳). این نتایج پیشنهاد می‌کنند که گنادوتروپین‌ها نقش مهمی را در عملکرد کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بازی می‌کنند و این نقش بسته به مرحله تکوینی جنس نر فرق می‌کند. علی‌رغم مطالعات گسترده در رابطه با شناسایی کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز پستانداران، این مطالعات در رابطه با پرندگان نادر می‌باشد، در این ارتباط Jung و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که کمپلکس سه فاکتور رشد FGF2، LIF و IGF1 اثر قابل توجهی بر خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه، در محیط کشت دارند (۳۱). همچنین طی تحقیقات انجام شده توسط گروه تحقیقاتی ما در سال ۲۰۱۴ مشخص شد که فاکتورهای bFGF، EGF، LIF و GDNF اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه یک روزه دارد. همچنین این مطالعه نشان داد که GDNF مهمترین فاکتور جهت القاء تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه است (۵۲).

مکانیسم‌ها و فاکتورهای دخیل در خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

تولید مداوم سلول‌های زاینده جنسی تمایزیافته برای اسپرم‌زایی و در نتیجه باروری جنس نر ضروری می‌باشد. با توجه به این امر، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز باید ظرفیت خودنوزایی و حفظ حالت تمایزنیافته را داشته باشند. از آنجایی که تقسیم سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به روش متقارن انجام می‌شود، نسبت بین خودنوزایی و تمایز ۱ است. اگر تعادل به سمت خودنوزایی متمایل شود، تعداد اسپرماتوزوآی تولید شده کاهش یافته، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تجمع پیدا کرده و در نهایت این حالت می‌تواند منجر به ایجاد تومور شود. از طرف دیگر، اگر تعادل به سمت تمایز تغییر یابد، جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در نهایت کاهش یافته و منجر به این می‌شود که لوله‌های اسپرم‌ساز تنها حاوی سلول‌های سرتولی شوند (۵۳).

مکانیسم‌هایی که باعث القاء تمایز و یا تنظیم خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شود، تاکنون به‌طور کامل درک نشده‌اند. با این وجود، در سال‌های اخیر برخی فاکتورهای رشد و فاکتورهای رونویسی شناسایی شده‌اند، که در خودنوزایی و یا تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ایفای نقش می‌کنند (جدول ۲)؛ از طرف دیگر این مکانیسم‌ها و فاکتورها در ارتباط با ماکیان به‌طور بسیار زیادی ناشناخته می‌باشند.

جدول ۲. *فاکتورهای مؤثر در خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز*

فاکتورهای دخیل در خودنوزایی	عملکرد	منبع	فاکتورهای دخیل در تمایز	عملکرد	منبع
اعضای خانواده TGFβ (مانند GDNF، BMP4 و اکتیوین‌ها)	از طریق القاء چندین مسیر انتقال پیام، در نهایت باعث القاء خودنوزایی و مهار تمایز در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شوند.	(۵۵، ۵۶)	رتینوئیک اسید	از طریق القاء بیان ژن‌های Stra8 و c-Kit باعث القاء تمایز در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شود.	(۵۲)
فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و گیرنده‌های آنها	علاوه بر اینکه دارای اثر مستقیمی بر روی القاء خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز هستند، همچنین اثر پاراکرینی غیر مستقیم آن بر روی سلول‌های سرتولی مشهود می‌باشد.	(۵۸، ۵۹)	فاکتور سلول بنیادی (KIT/KITL)	مسیر انتقال پیام KIT/KITL نقش گسترده‌ای در مراحل چندگانه تکامل سلول‌های زاینده جنسی دارد.	(۵۷)
فاکتورهای رشد LIF و EGF	باعث القاء فرآیند خودنوزایی و حفظ سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز از طریق القاء مسیرهای انتقال پیام مختلف می‌شوند.	(۶۶، ۶۷)	فاکتورهای رونویسی شامل: SOX3، SOHLH1، SOHLH2 و NEUROG3 و STRA8	القاء بیان ژن‌های دخیل در تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را سبب می‌شوند.	(۶۰–۶۵)
فاکتورهای رونویسی و مهارکننده‌های رونویسی شامل: ETV5 (ERM)، TAF4B، POU5F1 (OCT3/4)، BCL6B و PLZF (ZBTB16)	این ژن‌ها پایین دست مسیرهای انتقال پیام حاصل از فاکتورهای رشد ذکر شده در بالا هستند و باعث القاء بیان ژن‌های دخیل در فرایند خودنوزایی و مهار تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شوند.	(۶۴، ۷۱، ۷۲)	فاکتورهای متصل شونده به RNA شامل: DAZL، UTP14B (JSD) و NANOS3	باعث القاء تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌شوند.	(۶۸–۷۰)
پروتئین کیناز ATM	تنظیم کننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و پاسخ‌های نقاط کنترلی چرخه سلولی پس از ایجاد شکست در دو رشته DNA، تحلیل تلومر و استرس‌های اکسیداتیو است. همچنین از طریق القاء توقف چرخه سلولی، مکانیسم جدیدی را برای تنظیم خودنوزایی ارائه می‌کند.	(۷۴)	تستسترون	تستسترون اثر مستقیمی بر روی سلول‌های زاینده جنسی ندارد، اما به‌طور غیر مستقیم اسپرم‌سازی را از طریق سلول‌های سرتولی تنظیم می‌کند.	(۷۳)
پروتئین PIN1	از طریق تنظیم چرخه سلولی در القاء فرایند خودنوزایی و حفظ سلول‌های بنیادی اسپرم ساز نقش دارد.	(۷۶)	دما	در انسان و بسیاری دیگر از گونه‌های پستانداران، اسپرم‌زایی موفق نیاز به دمای زیر ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارد.	(۷۵)
GJA1 (CX43)	از طریق کمک به حفظ پایداری اتصالات فاصله‌دار بیضه‌ای، نقش حیاتی را در تمامیت کنام سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بازی می‌کند.	(۷۷)			

جداسازی، کشت و تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

با توجه به کاربردهای گسترده سلول‌ها بنیادی اسپرم‌ساز، تلاش‌های زیادی جهت دسترسی به این سلول‌ها انجام شده و اکنون نیز ادامه دارد. با این وجود مطالعه و دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جهت کاربردهای مختلف مشکل و پیچیده می‌باشد، چرا که این سلول‌ها جمعیت بسیار محدودی دارند (۱۰،۳۰) و از طرف دیگر به سختی از زاده‌های تمایزیافته حاصل از آنها قابل تشخیص هستند. با توجه به این امر از گذشته تا به امروز مطالعات گسترده‌ای جهت حل این مشکلات انجام گرفته است. این مطالعات بر حیطه‌هایی مانند روش‌های جداسازی، کشت تخصصی جمعیت‌های سلولی بیضه‌ای به‌خصوص سلول‌های زاینده جنسی، تعیین هویت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، ایجاد شرایط کشت مناسب جهت غنی‌سازی و نگهداری طولانی مدت جمعیت‌های سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز متمرکز شده‌اند که در ذیل به آنها پرداخته می‌شود.

روش‌های جداسازی و دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

با توجه به دشواری‌های جداسازی و تعداد اندک سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در بافت بیضه و نیز نیاز به مقادیر کافی سلول برای کاربردهای مختلف از جمله پیوند، بنابراین جداسازی،کشت و غنی‌سازی آنها در آزمایشگاه یک مقوله الزامی شد. امروزه روش‌های مختلفی از قبیل هضم آنزیمی بافت بیضه با آنزیم‌های کلاژناز IV و تریپسین و سپس سانتریفیوژ با شیب غلظت BSA یا پرکول و نیز تخلیص بر اساس تفاوت در قابلیت چسبیدن سلول‌ها به بستر ظرف کشت، جهت دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موجودات مختلف استفاده می‌شود (۸۰-۷۸). غالب مقالات ثبت و گزارش شده در رابطه با جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تنها در پستانداران به‌ویژه جوندگان می‌باشند. مطالعات و گزارش‌ها در ارتباط با جداسازی و کشت اسپرماتوگونیای پرندگان به‌ویژه جوجه هنوز اندک می‌باشند. در این مطالعات، به‌طور عمده از روش‌های هضم آنزیمی و سانتریفیوژ با شیب غلظت پرکول و نیز تخلیص بر اساس تفاوت خاصیت چسبندگی برای دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه استفاده شده است (۸۳-۸۱). برای اولین بار Trefil و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که تزریق سوسپانسیون سلولی جدا شده از بیضه خروس‌های دهنده، منجر به کلونیزه شدن مجدد سلول‌های اسپرم‌ساز در بیضه خروس‌های گیرنده عقیم شده به‌وسیله تیمار با اشعه، و بازگشت باروری آنها می‌شود (۸۴). همچنین می‌توان از تکنیک قطعه قطعه کردن بافت بیضه و کشت قطعات بافتی حاصله و مهاجرت و اتصال سلول‌های این قطعات بافتی به سطح ظرف کشت (Primary explantation method)، جهت دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز استفاده کرد (۵۲). از مزیت‌های این روش این است که هزینه بسیار کمتری نسبت به سایر روش‌ها دارد و از آنزیم‌های هضم کننده ماتریکس خارج سلولی که می‌توانند اثرات مضری بر سلول‌ها داشته باشند، استفاده نمی‌شود.

علاوه بر روش‌های یاد شده در بالا، امروزه برای جداسازی بهتر سلول‌های اسپرماتوگونیا به‌طور معمول از روش‌های دقیق‌تری همانند جداسازی سلولی مبتنی براتصال آنتی‌بادی به نشانگرهای مولکولی سطحی اختصاصی این سلول‌ها استفاده می‌کنند. این روش‌ها امکان خالص‌سازی بهتر سلول‌های مورد نظر را در یک ترکیب سلولی فراهم می‌کنند. امروزه به‌طور معمول در مطالعات مختلف از دو روش جداسازی سلولی، براساس بر هم کنش ایمنولوژیک

با نشانگرهای مولکولی سطحی، برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز استفاده می‌کنند. این روش‌ها عبارتند از:

۱. روش FACS (Fluorescence-activated cell sorting): که مبتنی بر اتصال رنگ‌های فلورسنت به آنتی‌بادی اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونیا و جداسازی این سلول‌ها بر مبنای اتصال اختصاصی آنتی‌بادی نشاندار با آنتی‌ژن‌های سطح سلول می‌باشد. در سال ۲۰۰۳، Kubota سلول‌های اسپرماتوگونیا را با روش FACS جدا کرد (۸۵). مطالعات نشان داده‌اند که علاوه بر نشانگرهای مولکولی سطحی که می‌توانند برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیضه با استفاده از فلوسایتومتری استفاده شوند، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز همچنین دارای ویژگی‌های اختصاصی دیگری هستند که می‌توانند جهت جداسازی جمعیت‌های سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیضه، با به‌کارگیری فناوری فلوسایتومتری، استفاده شوند. تکنیک جمعیت فرعی اولین بار در سال ۱۹۹۶ به‌وسیله Goodell و همکارانش شرح داده شد (۸۶). مبنای این تکنیک، خروج رنگ فلورسنت Hoechst 33342 متصل شونده به DNA، از سلول‌های بنیادی و عدم خروج این رنگ از سلول‌های غیربنیادی است.

۲. روش MACS (Magnetic-activated cell sorting): در این روش، آنتی‌بادی اختصاصی علیه نشانگرهای سطحی مورد نظر، به دانه‌های بسیار ریز مغناطیسی متصل می‌شوند تا با عبور محلول حاوی سلول‌ها از میدان مغناطیسی، سلول‌های متصل شده به ذرات مغناطیسی از طریق آنتی‌بادی، جدا گردند. در سال ۱۹۹۹ von Schonfeldt با روش MACS سلول‌های $c\text{-}Kit^{+}$ را جداسازی کرد (۸۷).

در رابطه با جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، مطالعات انجام شده در پستانداران از جمله موش و نیز نتایج حاصل از جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز از جوجه حاکی از آنند که بهترین زمان برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز از موجود چند روز اول بعد از تولد می‌باشد. به‌عنوان مثال، کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را به‌طور معمول از بیضه‌های موش ۱۲-۵ روزه می‌گیرند، زیرا مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در این مرحله بیشتر می‌باشند. این امر در جوجه نیز به اثبات رسیده است (۸۳). هر چند که، برخی مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را همچنین می‌توان از سلول‌های بیضه موش تازه متولد شده (۸۸) و بالغ (۵۸) نیز تهیه کرد.

کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و عوامل مؤثر بر کشت آنها

هر چند که پیشرفت‌های چشمگیری طی دهه گذشته در رابطه با جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش و رت انجام شده است، اما متأسفانه دسترسی به سلول‌ها بنیادی اسپرم‌ساز به‌علت تعداد بسیار اندک این سلول‌ها در بیضه و نیز کمبود روش‌های خالص‌سازی و کشت این سلول‌ها از بیضه، محدود می‌باشد (۱۰،۳۰) و بنابراین تاکنون مطالعات گسترده‌ای به‌منظور رفع این مشکلات انجام شده است. امروزه مشخص شده که چندین فاکتور وجود دارد که می‌توانند برای جداسازی، کشت طولانی مدت و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ضروری باشند و تا حدودی ا امکان دسترسی به تعداد مورد نیاز و کافی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را فراهم می‌آورند. این فاکتورها عبارتند از:

۱- توسعه روش‌های جداسازی جمعیت‌های با خلوص بالا از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز که منجر به غنی شدن سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در آزمایشگاه و حذف سلول‌های سوماتیک می‌شود. همانگونه که در بخش قبلی اشاره شد جداسازی

با روش‌های FACS یا MACS بر اساس نشانگرهای مولکولی سطحی می‌تواند جمعیت نسبتاً خالص‌تری را در مقایسه با روش‌های دیگر ارائه کند (۸۰،۸۵،۸۷).

۲- توسعه محیط‌های کشت مشخص فاقد سرم که باعث کشف فاکتورهای رشد ضروری می‌شود. به‌عنوان مثال، مشخص شده است که غنی‌سازی محیط‌های کشت معمول مورد استفاده برای کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، همانند DMEM یا αMEM با فاکتورهای رشد نظیر GDNF، LIF، bFGF، IGF1، CSF1 و EGF برای حفظ و توسعه سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز پستانداران و پرندگان لازم می‌باشد (۳۱،۵۸،۸۷،۸۸). مطالعات نشان داده‌اند که از میان این فاکتورها، GDNF شاید مهمترین فاکتور تلقی گردد زیرا به تنهایی قادر به افزایش قابل توجه تکثیر و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌باشد؛ این در حالی است که سایر فاکتورهای رشد به تنهایی چنین قابلیتی را ندارند و یا اینکه اثر ضعیف‌تری دارند (۳،۵۲،۵۸). از طرف دیگر استفاده از ترکیباتی نظیر B27 که جایگزینی برای سرم می‌باشد، می‌تواند به حذف سلول‌های سوماتیک بیضه‌ای و تولید جمعیت نسبتا خالصی از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز کمک کند (۹۰). به‌طورکلی می‌توان گفت که استفاده از این فاکتورها می‌تواند باعث غنی‌سازی و افزایش بسیار چشمگیر جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در کشت گردد.

۳- سلول‌های مغذی STO و MEF به‌طور معمول برای رشد سلول‌های بنیادی پستانداران لازم می‌باشند. هر چند که نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را می‌توان همچنین در شرایط عاری از سلول‌های مغذی نیز حفظ کرد و استفاده از بسترهای پوشیده شده با لامینین (نوعی ماتریکس مصنوعی)، تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد (۸۸،۹۱،۹۲).

امروزه محققین به دنبال یافتن شرایط بهتری جهت دسترسی و کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موجودات مختلف در آزمایشگاه می‌باشند. با این دیدگاه، تحقیقات گسترده‌ای در شرایط داخل بدن موجود و آزمایشگاه با استفاده از مدل‌های حیوانی مختلف، جهت بهبود روش‌ها و افزایش کارآیی دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، در حال انجام است.

پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

در سال ۱۹۹۴، گروه Brinster برای اولین بار تنها آزمون عملکردی را برای شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌کار بردند (۹۳، ۹۴). مخلوطی از سلول‌های بیضه‌ای از موش‌های ۴ و ۱۲ روزه جدا شدند. این سلول‌ها به لوله‌های اسپرم‌ساز موش گیرنده از طریق مجاری وابران و ریت بیضه، تزریق شدند. موش *W/W* به‌عنوان موش گیرنده انتخاب شد، زیرا این موش‌ها به‌علت وجود جهش در لوکوس خالدار سفید غالب که گیرنده تیروزین کیناز ترانسممبران c-KIT را کد می‌کند، قادر به اسپرم‌زایی در بیضه خود نبودند (۹۵). بعد از پیوند سلول‌های دهنده در بیضه موش گیرنده، اسپرم‌زایی کاملی در بیضه گیرنده

مشاهده شد. این یافته حاکی از آن بود که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز از لومن لوله‌های اسپرم‌ساز به غشاء پایه مهاجرت و سپس از سدهای خونی-بیضه‌ای عبور و در نهایت اسپرم‌زایی را از کنام‌های جدیدی که یافته‌اند، آغاز کرده‌اند (۹۳،۹۴). این یک کشف بسیار مهم و پیشرفت اصلی برای مطالعه سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بود. بنابراین می‌توان گفت که، با این تکنیک می‌توان جمعیت‌های سلولی حاصل از بیضه را برای تعیین وجود سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز حاصل از توسعه روش‌های تخلیص، بررسی کرد. به‌علاوه، با این تکنیک می‌توان افزایش یا کاهش سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را در یک جمعیت مشاهده کرد و همچنین می‌توان اثر فاکتورهای رشد مختلف را بر سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز کشت شده در آزمایشگاه، تعیین کرد. از سوی دیگر، با استفاده از روش پیوند می‌توان تعیین کرد که آیا نقایص باروری در موش تراریخت به‌وسیله نقص در سلول‌های سوماتیک یا زاینده جنسی رخ داده است، یا خیر (۹۶). به‌عنوان مثال، Nakamura و همکارانش گزارش دادند، موش نول برای *Cnot7* به‌علت موتاسیون معیوب کننده اسپرماتیدها، نابارور می‌باشد. برگشت باروری به‌وسیله پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز *Cnot7*$^{-/-}$، به موش گیرنده *W/W* پیشنهاد می‌کند که عملکرد سلول‌های سوماتیک بیضه‌ای در موش *Cnot7*$^{-/-}$ دچار نقص شده است (۹۷).

از زمان اولین گزارش در رابطه با تکنیک پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تاکنون، تغییرات و تحقیقات جدید بسیاری، در گونه‌های مختلف گزارش شده است (۷۸،۹۸،۹۹). پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز سایر گونه‌ها (مانند خرگوش، سگ، میمون، گاو و انسان)، در شرایط Xeno، به بیضه موش گیرنده نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز می‌توانند به غشاء پایه بیضه موش گیرنده مهاجرت کنند، هر چند که تمایز اسپرماتوگونیا رخ نمی‌دهد (۹۸،۱۰۰). به‌طور شگفت‌آوری، پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز رت و هامستر منجر به اسپرم‌زایی کامل در بیضه موش گیرنده شد (۱۰۱،۱۰۲). هر چند که، نقص‌هایی در اسپرماتیدها و آکروزوم‌های هامستر در درون لوله‌های اسپرم‌ساز موش گیرنده مشاهده شد (۱۰۲).

تعیین فنوتیپ مولکولی (هویت) سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

بسیاری از بافت‌های بدن، حاوی سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پیش‌ساز اولیه هستند. این سلول‌ها پروتئین‌ها یا سایر نشانگرهای مولکولی اختصاصی را بیان می‌کنند که می‌توانند به منظور شناسایی آنها از بقیه سلول‌های اطراف، مورد استفاده قرار گیرند. به‌عنوان مثال، می‌توان با استفاده از این نشانگرهای مولکولی، سلول‌های خون‌ساز و سلول‌های بنیادی جنینی را به راحتی در میان انواع دیگر سلول‌ها شناسایی کرد. از سویی دیگر، شناسایی و استفاده از نشانگرهای مولکولی اختصاصی نوع سلول، می‌تواند یکی از راه‌های دقیق در تفکیک، جداسازی و خالص‌سازی انواع مختلف سلول‌ها با استفاده از روش‌هایی نظیر FACS و MACS باشد. به‌علاوه، شناخت این نشانگرها می‌تواند راهی جهت توسعه وکتورهای حامل نواحی تنظیمی ژن این نشانگرها جهت استفاده در ردیابی تمایز سلول‌های غیر جنسی به سلول‌های جنسی در آزمایشگاه باشد، همانگونه که مطالعه اخیر ما نیز این امر را نشان داده است (۱۰۳). از زمان توسعه تکنیک پیوند تاکنون انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی جدید شناسایی شده است که می‌تواند جهت جداسازی جمعیت‌های سلولی بسیار غنی از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، استفاده شوند (جدول ۳). روش‌های مختلفی از جمله RT-PCR، روش‌های ایمنوفلورسانس همانند

ایمنوسیتوشیمی، ایمنوهیستوشیمی و فلوسایتومتری و فناوری ریزآرایه‌ها برای شناسایی این نشانگرها مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی بیضه و نیز کشت سلول‌های حاصل از بیضه ارگانیسم‌های مختلف از گذشته تا به امروز، منجر به شناسایی انواع مختلفی از نشانگرهای بیان شده به‌وسیله اسپرماتوگونیای اولیه شده است. هر چند که، تاکنون هیچ ژنی یا نشانگری که بیان آن تنها محدود به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز باشد شناسایی نشده است. همچنین انجام مطالعات با استفاده از روش‌های مختلف ذکر شده، منجر به شناسایی انواع مختلف نشانگرها منفی (نشانگرهای مولکولی که در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان نمی‌شوند اما در سلول‌های حاصل از تمایز این سلول‌ها و همچنین در سلول‌های سوماتیک بیضه‌ای بیان می‌شوند) در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز شده است (جدول ۳). می‌توان نشانگرهای منفی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را جهت جداسازی و حذف سلول‌هایی غیر از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز (با استفاده از روش‌های FACS و MACS) از جمعیت سلولی به‌دست آمده از بیضه مورد استفاده قرار داد.

جدول ۳. *نشانگرهای مولکولی بررسی شده در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موجودات مختلف.*

نشانگرهای مثبت سطح سلولی	ارگانیسم مورد بررسی	منبع	نشانگرهای مثبت درون سلولی	ارگانیسم مورد بررسی	منبع	نشانگرهای منفی	ارگانیسم مورد بررسی	منبع
Integrin α6	موش، هامستر، انسان	(۱۰۴، ۱۰۵)	OCT4	موش	(۶۴، ۱۰۵، ۱۰۶)	Integrin αV	موش	(۱۸، ۱۰۹–۱۰۷)
Integrin β1	موش، بز	(۱۱۰، ۱۱۱)	VASA	موش، انسان، جوجه	(۱۰۵، ۱۱۲، ۱۱۳)	c-KIT	موش، رت	(۱۱۸–۱۱۴)
THY-1 (CD90)	موش، رت، انسان	(۱۸، ۸۵، ۱۱۹، ۱۲۰)	PLZF	میمون، موش	(۱۱۲، ۱۱۸)	CD45	موش	(۱۸، ۱۰۷، ۱۰۹)
CD9	موش، رت	(۱۸، ۸۵، ۱۲۱–۱۱۹)	DAZL	موش، جوجه	(۱۰۵، ۱۱۴، ۱۲۲)	CD34	موش	(۱۸، ۱۰۷، ۱۰۹)
CD24	موش	(۱۸، ۸۵، ۱۲۱–۱۱۹)	Stella	موش	(۱۰۵)	SCA1	موش	(۱۸، ۱۰۷، ۱۰۹)
GFRα1	موش، انسان، میمون	(۱۱۷، ۱۱۸، ۱۲۳)	MIL1	موش	(۱۰۵)	MHC-I	موش	(۱۸، ۱۰۷، ۱۰۹)
Ep-CAM	موش، رت	(۱۸، ۸۵، ۱۲۱–۱۱۹)	MIL2	موش	(۱۰۵)	TNAP	موش	(۱۰۵)
GPR125	موش	(۱۰۸، ۱۲۴، ۱۲۵)						
SSEA-1	موش، جوجه	(۳۱، ۸۱، ۱۰۵)						

علی‌رغم مطالعات گسترده در ارتباط با شناسایی نشانگرهای مولکولی در پستانداران طی مراحل مختلف تکاملی، تاکنون مطالعات بسیار اندکی در رابطه با بیان نشانگرهای مولکولی بیان شده در سلول‌های زاینده جنسی بیضه پرندگان (جوجه)، به ویژه سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و به‌طور عمده در جوجه‌های بالغ، انجام شده است. از جمله نشانگرهای مولکولی گزارش شده در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه، می‌توان به SSEA-1، SSEA-3، SSEA-4، DAZL، CVH و STRA-8 به‌عنوان نشانگرهای مثبت و c-KIT به‌عنوان یک نشانگر منفی اشاره نمود (۱۱۴). در این ارتباط، گروه تحقیقاتی ما مطالعاتی را در زمینه شناسایی نشانگرهای مولکولی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه یک روزه انجام داده است (۱۲۶). نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که شاخص‌های *DAZL*، *STRA-8*، *CVH*، *PLZF*، *SPRY-1*، *GFRα1*، *GDNF*، *POU5F1*، *NANOG*، *GPR125*، *THY-1*، *BCL6B* و *ASZ1* در بافت بیضه جوجه یک روزه بیان می‌شوند. در این ارتباط این مطالعه نشان داد که شاخص‌های *DAZL*، *STRA-8*، *CVH*، *PLZF*، *POU5F1*، *NANOG*، *GPR125*، *BCL6B* و *ASZ1* کاملا اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه می‌باشند و در سایر سلول‌های بافت بیضه جوجه یک روزه بیان نمی‌شود. همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که شاخص SSEA-1 برخلاف یک مطالعه قبلی (۱۱۴) که بیان می‌کند این شاخص در سلول‌های بنیادی جوجه بالغ بیان می‌شود، در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه یک روزه بیان نمی‌شود. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا بیان این شاخص می‌تواند وابسته به مرحله تکاملی جوجه باشد، اما اثبات این امر نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد.

اهمیت، کاربردها و چشم‌انداز دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز

دسترسی به سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، زیرا علاوه بر اینکه دانش و درک ما را در رابطه با زیست‌شناسی این سلول‌ها و فرآیند اسپرم‌زایی افزایش می‌دهد، همچنین ظرفیت استفاده و دستکاری این سلول‌ها را جهت کاربردهای عملی در زمینه زیست‌فناوری و پزشکی، بهبود می‌بخشد.

امروزه مطالعات مرتبط با جداسازی، کشت و تخلیص سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز همگی به‌منظور استفاده و هدایت این سلول‌ها برای اهداف کاربردی می‌باشند. مطالعات زیادی در رابطه با کاربرد سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در زمینه‌های مختلف درمانی و صنعتی انجام شده است و هنوز نیز ادامه دارد. به‌عنوان مثال، Feng و همکارانش (۲۰۰۲) تولید اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها را از یک رده پایدار سلول بنیادی اسپرم‌ساز موش گزارش دادند، اگر چه پتانسیل باروری این سلول‌ها آزمایش نشد (۱۲۷). همچنین، Sato و همکارانش (۲۰۱۱) تولید اسپرم‌های بارور از یک رده پایدار سلول بنیادی اسپرم‌ساز موش را با استفاده از کشت بافت گزارش دادند (۱۲۸). به‌علاوه، تولید سلول‌های اسپرم موشی کاملاً طبیعی از لحاظ ریخت‌شناسی از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز اولیه موشی در محیط کشت سه بعدی آزمایشگاهی نیز گزارش شده است (۱۲۹). در این ارتباط همچنین ما برای اولین بار سیستم کشت سه بعدی برای اسپرم‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه طراحی و بهینه کردیم. این سیستم باعث القای اسپرم‌زایی در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه یک روزه و تولید سلول‌های شبه اسپرمی (از نظر مورفولوژیکی) مشابه با اسپرماتوزوآ خروس بالغ شد (۱۲۶).

امروزه می‌توان یک نوع سلول را به نوع دیگری تبدیل کرد، این امر می‌تواند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم انجام شود، فرآیندی که تحت عنوان Transdifferentiation نامیده می‌شود (۱۳۰). در این ارتباط، یکی دیگر از کاربردهای سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، تولید سلول‌های بنیادی پرتوان از این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. در سال ۲۰۰۴ Kanatsu-Shinohara و همکارانش برای اولین بار گزارش دادند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش بالغ، بعد از کشت در شرایط آزمایشگاهی به سمت سلول‌های بنیادی جنینی تمایززدایی کرده و ویژگی‌های پرتوانی را از خود نشان می‌دهند (۱۳۱). به‌علاوه، مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۶ نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در شرایط آزمایشگاه به‌طور خودبخود به سمت دودمان‌های سلولی سه لایه جنینی تمایز می‌یابند و همچنین زمانی که به موش دارای نقص ایمنی تزریق می‌شوند، تراتوما تشکیل می‌دهند (۱۳۲). همچنین، مطالعات بعدی گزارش دادند که سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جدا شده از انسان بالغ نیز ویژگی‌های پرتوانی را نشان می‌دهند (۱۲۵،۱۳۳،۱۳۴). بنابراین می‌توان سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را به‌عنوان یک منبع سلولی با ارزش جهت دسترسی به سلول‌های بنیادی شبه جنینی برای اهداف ترمیمی و جایگزینی سلول‌های بنیادی به‌دست آمده از توده سلولی داخلی بلاستوسیست و سلول‌های بنیادی القاء شده که به‌ترتیب از لحاظ اخلاقی و کارآیی مشکل دارند، در نظر گرفت. هر چند که قبل از آن باید جزئیات بیشتری در رابطه با درک ژنتیک، اپی‌ژنتیک، طبیعت پرتوانی و پتانسیل تکوینی حقیقی آنها و نیز ایمنی آنها در آزمایشات پیوند، مشخص گردد تا اجازه به‌دست آوردن دودمان‌های سلولی ویژه بیمار را فراهم آورد.

از دیگر کاربردهای سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، پیوند این سلول‌ها به منظور بهبود برخی از موارد ناباروری مردان می‌باشد. به‌عنوان مثال، شیمی درمانی با دوزهای بالا و تابش اشعه جهت درمان سرطان می‌تواند منجر به ناباروری دائمی گردد. در حالی که می‌توان نمونه سلول جنسی هاپلوئید فرد بیمار را قبل از تیمار، منجمد و نگهداری کرد. این روش را نمی‌توان برای افرادی که به سن بلوغ نرسیده‌اند، به‌کار برد. به‌منظور حل این مشکل، می‌توان سلول‌های بیضه یا بافت بیضه را قبل از درمان سرطان، منجمد و نگهداری کرد و از این سلول‌ها یا بافت‌ها به‌منظور بازگشت باروری فرد، بعد از بهبود بیماری استفاده نمود (۱۷،۱۳۵،۱۳۶). اگر چه هنوز پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به‌منظور باروری انسان مهیا نیست، برای بیماران جوان مبتلا به سرطان که راه دیگری برای برگشت و حفظ باروری آنها وجود ندارد، می‌توان سلول‌های بیضه را منجمد و نگهداری نمود (۱۳۷،۱۳۸). Ginsberg و همکارانش از سال ۲۰۰۸ بافت بیضه افراد جوان مبتلا به سرطان را منجمد و نگهداری می‌کنند و گزارش داده‌اند که این کار با اجازه والدین انجام شده و جدا کردن بیوپسی از بافت بیضه این افراد هیچگونه اثرات جانبی مضری را برای فرد به‌دنبال ندارد (۱۳۹). سیستم کشت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز انسانی می‌تواند به‌طور ویژه برای دسترسی به این هدف مفید باشد، زیرا تعداد اندکی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز را می‌توان از یک قطعه کوچک بیضه به‌دست آورد و بنابراین برای استفاده در درمان، باید آنها را تکثیر کرد. در این ارتباط، سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش، موش صحرایی، جوجه و دیگر حیوانات مدل، می‌توانند سیستم مناسبی جهت فاز مطالعاتی دسترسی و بررسی کاربرهای این سلول‌ها برای درمان ناباروری در مرد باشند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای در

سال ۲۰۱۳ توسط Azizollahi و همکارانش با استفاده از مدل موشی نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز اثر درمانی قابل توجهی بر ایسکمی بیضه‌ای ناشی از چرخش یکطرفه بیضه در موش دارد (۱۴۰).

علاوه بر قابلیت‌های درمانی ذکر شده در بالا و مطالعات انجام شده در این باره، همچنین مطالعاتی در رابطه با منجمد و نگهداری بافت‌های بیضه‌ای یا سوسپانسیون‌های سلولی بیضه‌ای (که حاوی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز هستند) و نیز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز خالص شده، به‌عنوان راهی جهت حفظ نژادها یا گونه‌های با ارزش و یا در معرض خطر انجام گرفته است. به‌عنوان مثال، Honaramooz و همکارانش (۲۰۰۲) نشان دادند که بافت‌های بیضه‌ای موش، خوک یا بزهای تازه متولد شده را می‌توان زیر پوست موش دارای نقص ایمنی پیوند زد و اسپرم‌زایی کاملی را سبب شد (۱۴۱). این مطالعه برای چند گونه دیگر نیز گزارش شده است. از طرف دیگر، رده‌های سلول‌های جنسی با ارزش را می‌توان به‌وسیله منجمد کردن سوسپانسیون‌های سلولی بیضه (که حاوی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز هستند) و نیز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز خالص شده، برای پیوند سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در آینده حفظ کرد. این روش تاکنون برای موش‌ها، رت‌ها، بزها و سگ‌ها به‌کار گرفته شده است (۱). این کاربرد همچنین می‌تواند برای حفظ گونه‌های با ارزش ماکیان مورد استفاده قرار گیرد.

از لحاظ کاربردهای زیست فناوری، گونه‌های پرندگان از قبیل جوجه و بلدرچین در مقایسه با پستانداران به راحتی قابل دسترس می‌باشند، چرخه تولید مثلی کوتاهی دارند و تعداد زیادی تخم تولید می‌کنند، بنابراین کاندیدهای بسیار مناسبی برای دستکاری ژنتیکی و تولید ماکیان تراریخت به‌عنوان یک بیوراکتور قدرتمند برای تولید پروتئین‌های دارویی و صنعتی در تخم مرغ می‌باشند (۱۴۲). سیستم بیوراکتور ماکیان تراریخت، در مقایسه با میکروارگانسیم‌ها، گیاهان و پستانداران دارای چندین مزیت می‌باشد (۱۴۳). اول، ماکیان دارای پتانسیل بالای تولید پروتئین در تخم مرغ می‌باشند و بیش از نیمی از این پروتئین از یک ژن (ژن اوآلبومین) بیان می‌شود، بنابراین، به راحتی می‌توان مقادیر زیادی پروتئین نوترکیب را با خلوص بالا تحت کنترل پروموتر این ژن به‌دست آورد (۱۴۲). دوم، الگوی قنددار شدن برخی پروتئین‌های انسانی بیشتر شبیه به جوجه می‌باشد تا دیگر سیستم‌های بیوراکتوری (۱۴۴). سوم، وجود مهارکننده‌های طبیعی پروتئازها در تخم مرغ و محیط استریل طبیعی درون تخم مرغ، محیط ایده‌آلی را برای پایدار شدن فعالیت بیولوژیک پروتئین‌های خارجی فراهم می‌کند (۱۴۵). به‌علاوه، برخی مطالعات قبلی حاکی از آنند که تولید برخی پروتئین‌هایی که برای پستانداران سمی هستند را گاهی اوقات می‌توان در پرندگان تراریخت فرآهم آورد (۱۴۶،۱۴۷). هر چند که قبل از رسیدن به این اهداف، باید روش‌های تولید ماکیان تراریخت بهینه‌سازی و معمول گردد.

مطالعات حاکی از آنند که تغییرات مستقیم در یک جنین با استفاده از وکتورهای DNAیی و ویروسی امکان‌پذیر می‌باشد، اما این روش‌ها قابلیت ایجاد تغییرات در یک لوکوس ویژه و مشخص را در ژنوم ندارند. جهت غلبه بر این مشکل چندین روش مبتنی بر سلول (سلول‌های بلاستودرمال، سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های زاینده جنسی آغازین و سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز) را جهت تولید جوجه‌های تراریخت استفاده می‌کنند. در حال حاضر، سیستم کاملی برای جداسازی، توسعه، ترانسفکت، انتخاب و

توسعه مجدد کشت سلول‌های بنیادی جنینی و به دنبال آن تولید کایمرهای سوماتیک با درجه بالا توسعه یافته است، اما کایمرهای رده‌های سلولی جنسی از زاده‌های تراریخت شده، گزارش نشده است. اگر چه استفاده از سیستم‌های ویروسی می‌تواند کارآیی بسیار بالایی در انتقال ژن داشته باشند، اما نگرانی‌های مرتبط با ایمنی،کاربردهای آنها را محدود ساخته است. از میان بسیاری از تغییرات اساسی ممکن و ترکیبات سلول هدف و روش‌های شرح داده شده، مطالعات حاکی از آنند که هدفگیری سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در آزمایشگاه با استفاده از انتقال ژن بر اساس روش‌های غیر ویروسی و تزریق مجدد آنها به بیضه خروس، مؤثرترین و کارآمدترین روش جهت تولید ماکیان تراریخت است (۸۱،۱۴۸،۱۴۹). به‌عنوان مثال، تولید کارآمد جوجه‌های تراریختی که پروتئین فلورسنت سبز (GFP) را بیان می‌کردند با استفاده از ترانسفکشن سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در داخل بدن موجود زنده و *ex vivo* از طریق تزریق مستقیم پلاسمید نوترکیب حامل GFP به بیضه خروس گیرنده، انجام شده است (۱۴۸). همچنین انتقال سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جدا شده از بیضه خروس بالغ، به جنین مرحله X و جنین‌های مرحله ۱۶-۱۴، باعث مهاجرت این سلول‌ها به گنادهای جنینی و در نهایت تولید جوجه‌های گیرنده به‌عنوان کایمرهای رده سلولی جنسی، شد (۱۴۹). از سوی دیگر، در سال ۲۰۱۰ به منظور مطالعه خودنوزایی، تغییرات ژنتیکی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز ماکیان، این سلول‌ها را از بیضه جنین‌های ۱۶ روزه با استفاده از روش هضم آنزیمی به‌دست آوردند و سپس آنها را به مدت ۲ ماه کشت دادند. این سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جدا شده را سپس به‌وسیله وکتور حامل ژن کدکننده پروتئین فلورسنت سبز افزایش یافته (eGFP) ترانسفکت کردند و سلول‌های ترانسفکت شده را به بیضه خروس‌های عقیم شده تزریق کردند و با این کار توانستند اسپرم‌های تراریخت به‌دست آورند (۸۱). همچنین Min و همکارانش با ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز جوجه با وکتور حامل *eGFP-MMx* Mx-protein در شرایط آزمایشگاه، جوجه‌های تراریخت به‌دست آوردند (۱۵۰).

علاوه بر موارد ذکر شده در بالا، یکی از اهداف مهم دهه‌های گذشته تا به امروز، انجام فرآیند اسپرم‌زایی و در نتیجه تولید اسپرم‌های فعال در آزمایشگاه به منظور استفاده برای کاربردهای مختلف بوده است. طی چند سال اخیر نیز موفقیت هایی در این ارتباط با استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز موش، انسان و جوجه با استفاده از توسعه محیط‌های کشت سه بعدی حاصل شده است (۱۲۶، ۱۲۹،۱۵۱). در واقع، اسپرم‌زایی قوی و کارآمد در آزمایشگاه، نه تنها می‌تواند کاربردهای بالینی بالقوه‌ای را در درمان برخی از ناباروری‌ها و نیز برای کاربردهای زیست فناوری فراهم آورد، بلکه این امر همچنین می‌تواند کشف و درک مکانیسم‌های سلولی و مولکولی که ذیل فرآیند اسپرم‌زایی قرار دارند را تسریع بخشد.

تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه اسپرماتوگونیا و اسپرماتید

امروزه می‌توان از طریق برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming) و فرایند Transdifferentiation مستقیم یا غیر مستقیم یک نوع سلول را به نوع دیگری تبدیل کرد (۱۳۰). با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و دودمان‌های حاصل از آنها در باروری جنس نر و نیز قابلیت‌های کاربردی آنها، بنابراین طی سالیان اخیر مطالعات و تلاش‌های مختلفی جهت تبدیل سلول‌های بنیادی دیگر به سول‌های بنیادی اسپرم‌ساز و دودمانهای حاصل از آنها انجام

شده است. به‌عنوان مثال، Nayernia و همکاران برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که می‌توان سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش را به سلول‌های شبه سلول‌های جنسی نر تبدیل کرد. آنها نشان دادند که از طریق تیمار دودمان‌های سلول‌های بنیادی مغز استخوان با رتینوئیک اسید، می‌توان این سلول‌ها را به سلول‌های شبه سلول‌های جنسی تبدیل کرد. در واقع آنها نشان دادند که بعد از تیمار رده‌های سلول‌های بنیادی مغز استخوان با رتینوئیک اسید، سلول‌ها نشانگرهای اختصاصی سلول‌های جنسی، شامل OCT4، STRA8، STELLA، DAZL، MVH، اینتگرینهای β1 و α6 و انواع دیگری از نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، را بیان می‌کنند (۱۵۲). در این ارتباط همچنین Hua و همکارانش نشان دادند که ترکیب رتینوئیک اسید و عصاره بافت بیضه کارایی مطلوبی در تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌دست آمده از مغز استخوان انسان به سلول‌های شبه سلول‌های جنسی دارد (۱۵۳). به‌علاوه پتانسیل گامت‌زایی سلول‌های بنیادی مشتق شده از بند ناف انسان (۱۵۴) و نیز اثر درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان در ناباروری و تولید سلول‌های جنسی در مدل حیوانی موش صحرایی به اثبات رسیده است (۱۵۵). اخیرا نیز طی یک مطالعه گزارش شد که غلظت ۱۰μM از رتینوئیک اسید می‌تواند طی ۱۴ یا ۲۱ روز و نیز TGFβ طی ۲۱ روز باعث القاء تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی گوسفند به سلول‌های جنسی شود (۱۵۶). مطالعه‌ای نیز توسط Mazaheri و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که می‌توان از طریق دستکاری‌های ژنتیکی، سلول‌های شبه سلول‌های آغازین جنسی مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش را به سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تبدیل کرد. آنها با استفاده از القاء بیان ژن *Stra8* و همچنین تیمار سلول‌ها با مخلوطی از رتینوئیک اسید، LIF و bFGF توانستند سلول‌های شبه سلول‌های جنسی آغازین را تبدیل به سلول‌هاس شبه سلول‌های بنیادی نمایند (۱۵۷). علاوه بر تبدیل سلول‌های بنیادی بافتی، گزارش‌هایی نیز در ارتباط با تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های جنسی ارائه شده است. Easley و همکارانش در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند که می‌توان بدون دستکاری‌های ژنتیکی و با استفاده از محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی انسان و نیز سلول‌های پرتوان القایی را به دودمان‌های سلولی جنسی از قبیل سلول‌های جنسی پس از میوز (Postmeiotic cells) و سلول‌های شبه اسپرماتید تمایز داد و بنابراین استراتژی جدیدی را جهت مطالعه اسپرمزایی تحت شرایط آزمایشگاهی ارائه کردند (۱۵۸).

به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که این مطالعات همگی حاکی از آن هستند که می‌توان تحت شرایط آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی دیگر را به سلول‌های جنسی از جمله سلول‌های شبه سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تبدیل کرد. با این حال، این مطالعات هنوز در ابتدای راه هستند و نیاز به تحقیقات بیشتری، به ویژه در زمینه میزان شباهت سلول‌های جنسی به‌دست آمده در آزمایشگاه نسبت به سلول‌های جنسی طبیعی موجود در بافت بیضه، می‌باشد. همچنین با توسعه روش‌های برنامه‌ریزی مجدد سلولی و نیز کشف عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی مؤثر در تمایز و تکامل سلول‌های جنسی، می‌توان این امید را داشت که بتوان علاوه بر سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایزیافته را نیز تبدیل به دودمان‌های سلولی جنسی کرد که بیشترین شباهت را به سلول‌های جنسی طبیعی داشته باشند.

نتیجه‌گیری

در این مقاله مروری با برخی خصوصیات تکوینی و سلولی مولکولی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز در جوندگان، پریمات‌ها و پرندگان آشنا شدیم. به علاوه، عوامل شناخته شده دخیل در القاء خودنوزایی و تمایز این سلول‌ها و همچنین یافته‌های موجود در ارتباط با روش‌های مورد استفاده در زمینه جداسازی، شناسایی و خالص‌سازی و نیز کاربردهای مختلف این سلول‌ها در حیطه‌های مختلف ارائه شده است. علی‌رغم تحقیقات گسترده‌ای که در پستانداران بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز انجام شده است، اما هنوز جنبه‌های ناشناخته بسیاری در ارتباط با زیست‌شناسی سلولی و مولکولی این سلول‌ها وجود دارد، که شناخت آنها می‌تواند مدل و راهگشایی جهت درک بسیاری از فرآیندهای زیست‌شناختی دخیل در اسپرم‌زایی و باروری مردان و نیز مورد استفاده در حیطه‌های درمانی و زیست‌فناوری باشد. به‌علاوه، مطالعات بر روی زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز پرندگان، به ویژه در حیطه سلولی و مولکولی، محدود می‌باشند. با توجه به اهمیت بسیار بالای این سلول‌ها در زمینه کاربردهای زیست‌فناوری و تولید محصولات نوترکیب دارویی و صنعتی، مطالعه و استفاده بیشتر از این سلول‌ها می‌تواند حائز اهمیت فراوانی باشد.

References

1. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365(1546): 1663-1678.
2. Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec* 1971; 169(3): 533-557.
3. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 263-286.
4. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(4): 411-416.
5. McCarrey JR. *Development of the germ cell. In Cell and molecular biology of the testis* New York, NY: Oxford University Press; 1993; 58-89.
6. Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013; 29: 163-187.
7. Chiarini-Garcia H, Russell LD. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* 2001; 65(4): 1170-1178.
8. Chiarini-Garcia H, Russell LD. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction* 2002; 123(4): 567-577.
9. Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods Mol Biol* 2008; 450: 95-107.

10. deRooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 2000; 21(6): 776-798.

11. Hamer G, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Kal HB, De Rooij DG. Intercellular bridges and apoptosis in clones of male germ cells. *Int J Androl* 2003; 26(6): 348-353.

12. Zhou Q, Griswold MD. Regulation of spermatogonia 2008; 1-17.

13. de Rooij DG, Mizrak SC. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development*2008; 135(13): 2207-2213.

14. de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 1998; 79(2): 67-80.

15. Yoshida S, Nabeshima Y, Nakagawa T. Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1120: 47-58.

16. Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 2000; 23(9): 609-615.

17. Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC, Orwig KE. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? *Reproduction* 2010; 139(3): 479-493.

18. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87(1): 27-34.

19. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 2008; 29(5): 469-487.

20. Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction* 2006; 132(5): 673-680.

21. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 2006; 12(3): 275-282.

22. Lavial F, Pain B. Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Dev Growth Differ* 2010; 52(1): 101-114.

23. Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol* 1976; 49(2): 321-337.

24. Mozdziak PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, Petitte JN. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult Sci* 2005; 84(4):594-600.

25. Ukeshima A, Yoshinaga K, Fujimoto T. Scanning and transmission electron microscopic observations of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1991; 40(2): 124-128.

26. Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, et al. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult Sci* 2007; 86(10): 2182-2193.

27. Han JY. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32(2): 61-80.

28. Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, et al. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell.* 2002; 111(5): 647-659.

29. Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, et al. dead end, a novel vertebrategerm plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol* 2003; 13(16): 1429-1434.

30. Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H101/F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290(2): 193-200.

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

32. Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, et al. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(51): 21672-21677.

33. de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8): 580-585.

34. Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev* 2012; 92(2): 577-595.

35. Smith JF, Yango P, Altman E, et al. Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. *Stem cells translational medicine* 2014; 3(9): 1043-1054.

36. Baratelli GM, Lanzani A, Sacco RN. Biography of Enrico Sertoli. *Urology* 2002; 60(1): 196-198.

37. Steinberger A, Steinberger E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis *in vivo* and in organ culture. *Biol Reprod* 1971; 4(1): 84-87.

38. Kluin PM, Kramer MF, de Rooij DG. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl)* 1984; 169(1): 73-78.

39. Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 1982; 165(1): 13-25.

40. Petersen C, Soder O. The sertoli cell-a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 2006; 66(4): 153-161.

41. Carr I, Clegg EJ, Meek GA. Sertoli cells as phagocytes: an electron microscopic study. *J Anat* 1968; 102(Pt 3): 501-509.

42. Plotton I, Garby L, Morel Y, Lejeune H. Decrease of anti-Mullerian hormone in genetic spermatogenic failure. *Andrologia* 2012; 44(5): 349-354.

43. Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave inmice. *Reproduction* 2008; 136(3): 345-359.

44. Cai K, Hua G, Ahmad S, et al. Action mechanism of inhibin alpha-subunit on

51. Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Toyokuni S ,Shinohara T. Regulation of mouse spermatogonial stem cell self-renewing division by the pituitary gland. *Biol Reprod* 2004; 70(6): 1731-1737.

52. Momeni-Moghaddam M, Matin MM, Boozarpour S, Sisakhtnezhad S, et al. A simple method for isolation, culture and *in vitro* maintenance of chicken spermatogonial stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014; 50: 155-161.

53. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287(5457): 1489-1493.

54. Zhou Q, Li Y, Nie R, et al. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 537-545.

55. Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL . Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem* 2007; 282(35): 25842-25851.

56. He Z, Jiang J, Kokkinaki M, Golestaneh N, Hofmann MC, Dym M. Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells* 2008; 26(1): 266-278.

57. Loveland KL, Schlatt S. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J Endocrinol* 1997; 153(3): 337-344.

the development of Sertoli cells and first wave of spermatogenesis in mice. *PLoS One* 2011; 6(10): e25585.

45. Caneguim BH, Beltrame FL, da Luz JS, Valentini SR, Cerri PS, Sasso-Cerri E. Primordial germ cells (spermatogonial stem cells) of bullfrogs express sex hormone-binding globulin and steroid receptors during seasonal spermatogenesis. *Cells Tissues Organs* 2013; 197(2): 136-144.

46. Lardone MC, Castillo P, Valdevenito R, et al. P450-aromatase activity and expression in human testicular tissues with severe spermatogenic failure. *Int J Androl* 2010; 33(4): 650-660.

47. Morrow CM, Tyagi G, Simon L, et al. Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets variant 5 and contributes to blood-testis barrier function. *Biol Reprod* 2009; 81(5): 871-879.

48. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod* 2003; 18(12): 2660-2667.

49. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod* 2005; 20(9): 2376-2382.

50. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 2007; 317(5845): 1722-1726.

58. 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): 16489-16494.

59. Yoon KA, Chae YM, Cho JY. FGF2 stimulates SDF-1 expression through the Erm transcription factor in Sertoli cells. *J Cell Physiol* 2009; 220(1): 245-256.

60. Raverot G, Weiss J, Park SY, Hurley L, Jameson JL .Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol* 2005; 283(1): 215-225.

61. Ballow D, Meistrich ML, Matzuk M, Rajkovic A. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev Biol* 2006; 294(1): 161-167.

62. Hao J, Yamamoto M, Richardson TE, et al. Sohlh2 knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia. *Stem Cells* 2008; 26(6): 1587-1597.

63. Choi Y-J, Yoon J-W, Pyo C-W, Kim J-A , Bae S-H, Park S-S. A possible role of STRA8 as a transcriptional factor. *Genes Genom* 2010; 32: 521-526.

64. Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(25): 9524-9529.

65. Kaucher AV, Oatley MJ, Oatley JM. NEUROG3 is a critical downstream effector for STAT3-regulated differentiation of mammalian stem and progenitor spermatogonia. *Biol Reprod* 2012; 86(5): 164, 1-11.

66. Chen JX, Xu LL, Wang XC, Qin HY, Wang JL. Involvement of c-Src/STAT3 signal in EGF-induced proliferation of rat spermatogonial stem cells. *Mol Cell Biochem* 2011; 358(1-2): 67-73.

67. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia* 2012; 44(1):41-55.

68. Schrans-Stassen BH, Saunders PT, Cooke HJ, de Rooij DG. Nature of the spermatogenic arrest in Dazl -/- mice. *Biol Reprod* 2001; 65(3): 771-776.

69. Boettger-Tong HL, Johnston DS, Russell LD, Griswold MD, Bishop CE. Juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant seminiferous tubules are capable of supporting transplanted spermatogenesis. *Biol Reprod* 2000; 63(4): 1185-1191.

70. Lolicato F, Marino R, Paronetto MP, et al. Potential role of Nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. *Dev Biol* 2008; 313(2): 725-738.

71. Falender AE, Freiman RN, Geles KG, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev* 2005; 19(7): 794-803.

72. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *NatGenet* 2004; 36(6): 647-652.

73. Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004; 27(6): 335-342.

74. Takubo K, Ohmura M, Azuma M, et al. Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNAdamage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 170-182.

75. Shetty G, Weng CC. Cryptorchidism rescues spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice. *Endocrinology* 2004; 145(1): 126-133.

76. Atchison FW, Means AR. A role for Pin1 in mammalian germ cell development and spermatogenesis. *Front Biosci* 2004; 9: 3248-3256.

77. Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, et al. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 2007; 171(1): 19-31.

78. Izadyar F, Creemers LB, van Dissel-Emiliani FM, van Pelt AM, de Rooij DG. Spermatogonial stem cell transplantation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169(1-2): 21-26.

79. Xueming Z, Liangxue L, Dexue L, et al. eparationand purification of spermatogonia in mouse. *Acta Anatomica Sinica* 2000; 31(3): 235-238.

80. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 141.

81. Yu F, Ding LJ, Sun GB, et al. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(4): 340-347.

82. Hong W, Bi-chun L, Guan-yue Z, Si-yu S, Jie Q, Guo-hong C. Isolation,purificationand culture of spermatogonia in chicken. *Acta Vet et Zootechnica Sinica* 2006; 37: 1173-1178.

83. Wu XS, Wu H, Li BC, et al. Isolation, purification and culture of spermatogonia in chicken. *J Animal Vet Adv* 2009; 8(12): 2418-2423.

84. Trefil P, Micakova A, Mucksova J, et al. Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. *Biol Reprod* 2006; 75(4): 575-581.

85. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(11): 6487-6492.

86. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1797-1806.

87. von Schonfeldt V, Krishnamurthy H, Foppiani L, Schlatt S. Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. *Biol Reprod* 1999; 61(3): 582-589.

88. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture

and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 612-616.

89. 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): 722-731.

90. Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(48): 17430-17435.

91. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van PeltAM. *In vitro* propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA* 2011; 305(23): 2416-2418.

92. 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.

93. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11303-11307.

94. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11298-11302.

95. Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells in the w/wv mutant mouse testis. *Biol Reprod* 2003; 69(6): 1815-1821.

96. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 2000; 6(1): 29-34.

97. Nakamura T, Yao R, Ogawa T, et al. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat Genet* 2004; 36(5): 528-533.

98. Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod Dev* 1999; 53(2): 142-148.

99. Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2003; 126(6): 765-774.

100. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod* 2001; 64(5): 1409-1416.

101. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril* 2002; 78(6): 1225-1233.

102. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57(3): 270-279.

103. Dastpak M, Matin MM, Farshchian M, et al. Construction and quantitative evaluation of a dual specific promoter system for monitoring the expression status of Stra8 and c-kit genes. *Mol Biotechnol* 2014; 56(12): 1100-1119.

104. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonialstem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10): 5504-5509.

105. Lacham-Kaplan O. *In vivo* and *in vitro* differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction* 2004; 128(2): 147-152.

106. Huang YH, Chin CC, Ho HN, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J* 2009; 23(7): 2076-2087.

107. van Pelt AM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG, van Dissel-Emiliani FM. Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* 2002; 143(5): 1845-1850.

108. Seandel M, James D, Shmelkov SV, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 2007; 449(7160): 346-350.

109. YehJR, Nagano MC. Spermatogonial stem cell biomarkers: improved outcomes of spermatogonial transplantation in male fertility restoration? *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9(2): 109-114.

110. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(15): 8346-8351.

111. Pramod RK, Mitra A. *In vitro* culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (Capra hircus). *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(8): 993-1001.

112. Eildermann K, Gromoll J, Behr R. Misleading and reliable markers to differentiate between primate testis-derived multipotent stromal cells and spermatogonia in culture. *Hum Reprod* 2012; 27(6): 1754-1767.

113. Lavial F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, Pain B. Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol* 2009; 330(1): 73-82.

114. Heo YT, Lee SH, Yang JH, Kim T, Lee HT. Bone marrow cell-mediated production of transgenic chickens. *Lab Invest* 2011; 91(8): 1229-1240.

115. Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet* 2004; 13(7): 727-739.

116. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 1991; 113(2): 689-699.

117. Goertz MJ, Wu Z, Gallardo TD, Hamra FK, Castrillon DH. Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3456-3466.

118. Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, et al. Characterization, cryopreservation, and

ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2330-2338.

119. Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(40): 14302-14307.

120. Kanatsu-Shinohara M, Muneto T, Lee J, Takenaka M, et al. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol Reprod* 2008; 78(4): 611-617.

121. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* 2004; 70(1): 70-75.

122. Zheng Y, Thomas A, Schmidt CM, Dann CT. Quantitative detection of human spermatogonia for optimization of spermatogonial stem cell culture. *Hum Reprod* 2014; 29(11): 2497-2511.

123. Ebata KT, Zhang X, Nagano MC. Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol Reprod Dev* 2005; 72(2): 171-181.

124. Martin LA,Seandel M. Propagation of Adult SSCs: From Mouse to Human. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 1-9.

125. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456(7220): 344-349.

126. Sisakhtnezhad S, Bahrami AR, Matin MM, et al. The molecular signature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015; 51(4):415-25.

127. Feng LX, Chen Y, Dettin L, et al. Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297(5580): 392-395.

128. Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, et al. *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2011; 2: 472.

129. Abu Elhija M, Lunenfeld E, Schlatt S, Huleihel M. Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system. *Asian J Androl* 2012; 14(2): 285-293.

130. Sisakhtnezhad S, Matin MM. Transdifferentiation: a cell and molecular reprogramming process. *Cell Tissue Res* 2012; 348(3): 379-396.

131. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119(7): 1001-1012.

132. Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-1203.

133. Mizrak SC, Chikhovskaya JV, Sadri-Ardekani H, et al. Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod* 2010; 25(1): 158-167.

134. Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, et al. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev* 2009; 18(8): 1115-1126.

135. Orwig KE, Schlatt S. Cryopreservation and transplantation of spermatogonia and testicular tissue for preservation of male fertility. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 51-56.

136. Goossens E, Geens M, De Block G, Tournaye H. Spermatogonial survival in long-term human prepubertal xenografts. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 2019-2022.

137. Virant-Klun I, Skutella T, Bhartiya D, Jin X. Stem cells in reproductive tissues: from the basics to clinics. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 357102.

138. Schlatt S, Ehmcke J, Jahnukainen K. Testicular stem cells forfertility preservation: preclinical studies on male germ cell transplantation and testicular grafting. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(2): 274-280.

139. Ginsberg JP, Carlson CA, Lin K, et al. An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety. *Hum Reprod* 2010; 25(1): 37-41.

140. Azizollahi S, Aflatoonian R, Sedigi-Gilani MA, et al. Recruiting testicular torsion introduces an azoospermic mouse model for spermatogonial stem cell transplantation. *Urol J* 2014; 11(3): 1648-1655.

141. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer H, Dobrinski I, Schlatt S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 2002; 418(6899): 778-781.

142. Ivarie R. Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol* 2006; 24(3):99-101.

143. Li JJ, Lu LZ. Recent progress on technologies and applications of transgenic poultry. *Afr J Biotechnol* 2010; 9(24): 3481-3488.

144. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 2000; 10(5): 477-486.

145. Rapp JC, Harvey AJ, Speksnijder GL, Hu W, Ivarie R. Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res* 2003; 12(5): 569-575.

146. Zhu L, van de Lavoir MC, Albanese J, et al. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 2005; 23(9): 1159-1169.

147. Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, et al. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(6): 1771-1776.

148. Li B, Sun G, Sun H, et al. Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells *in vivo* and ex vivo transfection. *Sci China C Life Sci* 2008; 51(8): 734-742.

149. Jung JG, Lee YM, Kim JN, et al. The reversible developmental unipotency of germ cells in chicken. *Reproduction* 2010; 139(1): 113-119.

150. Min S, Qing SQ, Hui YY, et al. Generation of antiviral transgenic chicken usingspermatogonial stem cell transfected *in vivo*. *African J Biotechnol* 2011; 10(70): 15678-15683.

151. Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni M, et al. New horizons for *in vitro* spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(9): 521-529.

152. Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006; 86(7): 654-63.

153. Hua J, Pan S, Yang C, et al. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(1): 99-105.

154. Kaviani M, Ezzatabadipour M, Nematollahi-Mahani SN, et al. Evaluation of gametogenic potential of vitrified human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Cytotherapy* 2014; 16(2): 203-212.

155. Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(6): 131.

156. Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad MB, Sedighi-Gilani M. Derivation of male germ cells from ram bone marrow mesenchymal stem cells by three different methods and evaluation of their fate after transplantation into the testis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015.

157. Mazaheri Z, Movahedin M, Rahbarizadeh F, Amanpour S. Generation of *In-vitro* spermatogonial stem cells following genetic manipulation of primordial germ-like cells. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4(2): 55-63.

158. Easley CAT, Phillips BT, McGuire MM, et al. Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep* 2012; 2(3): 440-446.

Spermatogonial Stem Cells: Biology, Isolation, Culture, Characterization, and Practical Perspectives

Sajjad Sisakhtnezhad, Ph.D. [1*], Ahmad Reza Bahrami, Ph.D.[2], Maryam Moghadam Matin, Ph.D. [2], Fatemeh Behnam Rassouli, [3] Ph.D., Madjid Momeni-Moghadam, Ph.D. [4], Sohrab Boozarpour, Ph.D. [5]

1. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Professor, Department of Biology, Faculty of Science & Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science & Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
5. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

* Corresponding author; e-mail: s.sisakhtnezhad@razi.ac.ir

(Received: 9 April 2015 Accepted: 15 Dec. 2015)

Abstract

Spermatogonial stem cells (SSCs) also known as germ stem cells (GSCs) are the basis of spermatogenesis process in the testis. Furthermore, they are also valuable cells with different applications in developmental biology, transgenesis technology, and clinic. Understanding the new findings related to the cell and molecular biology of SSCs and the methods for isolation and maintenance of these cells are important and essential for their applications in medicine to treat some infertility problems and also in biotechnology to produce transgenic animals. The present review was conducted to describe the cell and molecular basis of development, self-renewal, and differentiation of mammalian and poultry SSCs *in vivo* (natural niche) and *in vitro*. Moreover, this study represents specific molecular markers to characterize SSCs. We also introduce methods to isolate, cultivate and enrich these cells, which are important for their applications. Finally, the significance of SSCs in different fields and their practical perspectives, and also the differentiation potential of other stem cells into spermatogonial- and spermatic-like cells are discussed.

Keywords: Spermatogonial stem cell, Self-renewal, Differentiation, Molecular markers, Fertility

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(2): 797-828