Review Article

Mouse and Human Spermatogonial Stem Cells

Morteza Koruji, Ph.D.[1*], Hossein Azizi, M.Sc.[2], Abdolhossein Shahverdi, Ph.D.[2, 3], Hossein Baharvand, Ph.D.[2, 4]

1. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
3. 2. Department of Embryology, Royan institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
4. Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 14155-5983, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran***
Email: koruji@iums.ac.ir

Received: 18/Nov/2009, Accepted: 5/May/2010

Abstract

Spermatogonial stem cells (SSCs) are in the beginning of a complex process in which they transmit genetic information from generation to generation. Any failure in this process can result in infertility. It has been suggested that transplantation of spermatogonial stem cells, following their maintenance and culturing, may restore fertility in some infertile patients. Because fertility restoration through SSCs transplantation has been successfully achieved in animal experiments, we hope human studies can follow in the near future. The isolation and cultivation of SSCs help us study their biological characteristics and their application in therapeutic approaches. In this review, we studied spermatogenesis in rodents and humans. We also compared markers and different SSC culture systems in both.

Keywords: Spermatogonia, Stem Cells, Identification, Isolation, Culture

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 147-158

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش و انسان

سیدمرتضی کروجی .Ph.D[1*]، حسین عزیزی .M.Sc[2]، عبدالحسین شاهوردی .Ph.D[3,2]، حسین بهاروند .Ph.D[4,2]

۱. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۳. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، تهران، ایران
۴. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۵۹۸۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
پست الکترونیک: Email: koruji@iums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۸/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۲/۱۵

چکیده

سلول بنیادی اسپرماتوگونی سرآغاز فرایندی است که طی آن اطلاعات ژنتیکی به فرزندان نسل بعدی فرد منتقل می‌شود. هر گونه اختلال در این فرایند می‌تواند منجر به ناباروی گردد. نگهداری، کشت و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آینده به عنوان روشی جهت درمان برخی ناباروری‌ها در انسان پیشنهاد شده است که تاکنون این امر در حیوانات گونه‌های مختلف به طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است و امید است با تکیه بر مطالعات گذشته، این راه با سرعت بیشتری در انسان طی شود. شناسایی، جداسازی، کشت و تکثیر سلول بنیادی اسپرماتوگونی، ما را در مطالعه خصوصیات بیولوژیکی و کاربردهای درمانی یاری خواهد داد. در این مقاله به بررسی سلول بنیادی اسپرماتوگونی در موش و انسان، شناسایی، جداسازی و کشت پرداخته می‌شود.

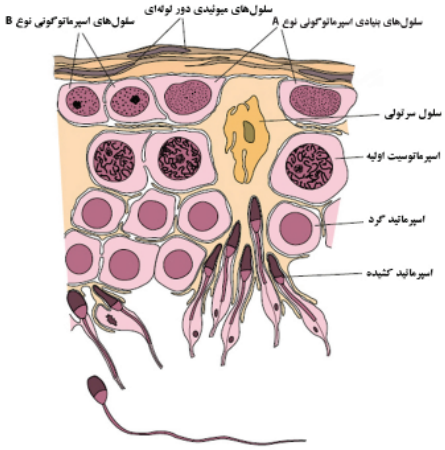
* **کلیدواژگان:** : اسپرماتوگونی سلول‌های بنیادی، شناسایی، جداسازی، کشت

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۱۵۸-۱۴۷

مقدمه

بر روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز انسان و موش بالغ تعدادی سلول زاینده نر به نام سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وجود دارد که اساس اسپرم‌زایی است. اسپرم‌زایی از یک یا چند مرکز کوچک شروع می‌شود و هر مرکز در اثر تکثیر یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی ایجاد می‌گردد (۱). عملکرد بیضه نیز وابسته به تکثیر و تمایز آنها بوده و طی فرایندی به نام اسپرم زایی صورت می‌گیرد. این فرایند از سن بلوغ (۷-۵ روزبعد از تولد در موش و ۱۳-۱۰ سال بعد از تولد در انسان) شروع شده و تا پیری به صورت پویا ادامه خواهد داشت (۲). این روند پیچیده و بسیار سازمان یافته شامل تکثیر، تمایز و آپوپتوزیس می‌باشد که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تمایز یافته و به اسپرماتید کشیده تکوین می‌یابد (۳). این لوله‌ها در پستانداران از سلول‌های سرتولی و رده‌های مختلف سلول‌های زاینده تشکیل شده است و توسط سلول‌های میوئیدی دور لوله‌ای در بر گرفته می‌شود (شکل ۱). سلول‌های سرتولی در قاعده لوله قرار دارد اما زواید سیتوپلاسمی آنها تا مجرای لوله کشیده شده است. این سلول‌ها تکوین سلول‌های زاینده را با ترشح فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها (۴) و برخی فاکتورها نظیر لاکتات و پیروات (۵) تنظیم می‌کند.

اگر چه انواع مختلف سلول‌های بنیادی در یک فرد وجود دارد، اما سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منحصر به فرد بوده چون تنها سلول بدن است که با تقسیم خود می‌تواند ژن‌ها را به سلول‌های فرزندان بعد از خود منتقل نماید. در نتیجه این سلول، منبع ارزشمند جهت آزمایش‌های بیولوژیکی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری دامی و اصلاح ژنتیکی از طریق دستورزی سلول زاینده نر می‌باشد (۶، ۷).



شکل ۱: محل و تقسیمات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش (۸)

شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش

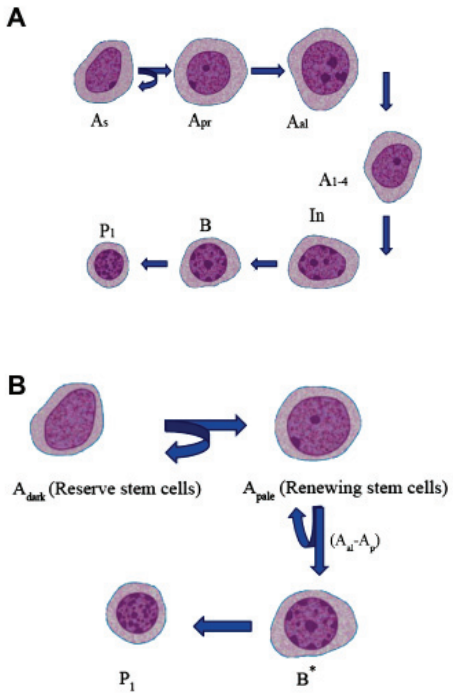
سلول اسپرماتوگونی در جوندگانی مثل موش و رت به اسپرماتوگونی نوع A، بینابینی و گروه B گروه‌بندی می‌شود. اسپرماتوگونی‌های نوع A خود شامل اسپرماتوگونی A_0 (تمایز نیافته) و اسپرماتوگونی‌های A_1-A_4 (تمایز یافته) هستند. اسپرماتوگونی A_0 در اثر تمایز به اسپرماتوگونی‌های A_{pr}، A_s و A_{al} تبدیل می‌شود. اسپرماتوگونی‌های A_s فرد است در حالی که اسپرماتوگونی A_{pr} جفت و A_{al} به شکل زنجیری بوده و توسط پل‌های سیتوپلاسمی به هم اتصال دارند (۹). اسپرماتوگونی A_s همان سلول بنیادی فرایند اسپرم‌زایی است و درصد خیلی کمی از سلول‌های بیضه‌ها را تشکیل می‌دهند (۱۰). آنها در قاعده لوله‌های منی‌ساز تقسیم و تمایز می‌یابند. پس از تقسیم سلول‌های دختری می‌توانند از یکدیگر جدا و منجر به خودنوزایی گردند و یا توسط پل‌های سیتوپلاسمی به همدیگر متصل شده که در اصطلاح اسپرماتوگونی جفت نامیده می‌شوند و این اولین مرحله تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است.

پس از تشکیل سلول اسپرماتوگونی جفت حدود نه تا ده تقسیم دیگر صورت گرفته که منجر به تشکیل کلون‌های اسپرماتوگونیال با زنجیر بلند می‌گردند و در انتهای این مرحله اسپرماتوگونی B شکل می‌گیرد. مراحل تمایز شامل: تغییر آهسته مورفولوژی (۱۱) و خصوصیات سیکل سلولی است. سپس اسپرماتوسیت‌ها شکل می‌گیرند که می‌توانند غشا پایه را ترک کرده و به مجرای لوله نزدیک‌تر شوند (۱۲) (شکل ۲A). سلول‌های اسپرماتوگونی جفت از نظر مورفولوژی شبیه سلولهای اسپرماتوگونی فرد هستند. در این اواخر نشان داده شده است که اسپرماتوگونی جفت و زنجیرهای کوتاه اسپرماتوگونی نیز دارای خواص سلول بنیادی هستند (۱۳). طول زمان شروع تقسیم سلول اسپرماتوگونی تا تبدیل آن به اسپرماتوزا در موش حدودا ۳۵ روز به طول می‌انجامد (۱۴).

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انسان

جزییات کمتری در مورد تکثیر و خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان نسبت به جوندگانی مثل موش و رت وجود دارد. برخلاف موش، سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A بر اساس رنگ‌آمیزی هسته آنها با هماتوکسیلین بعد از ثبوت با محلول بوئن به دو زیر شاخه A_{pale} و A_{dark} تقسیم شده است (۱۵). A_{pale} در هر سیکل اپی‌تلیالی لوله منی‌ساز تقسیم می‌شود و این بدان معنی است که در انسان آنها هر ۱۶ روز یک بار تقسیم می‌گردند ولی A_{dark} در شرایط نرمال خاموش بوده و به عنوان سلول رزرو یا سلول بنیادی در نظر گرفته می‌شود (۱۶). یک سوال مهم مطرح است که آیا سلول‌های A_{pale} و A_{dark} سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند؟ برای پاسخ به این سوال بررسی توپوگرافی این سلول‌ها در غشا پایه حایز اهمیت است. در شرایط یکسان میزان هر دو سلول یکسان بوده و نمی‌توان قضاوت درستی را ارایه نمود. در آزمایشی با پرتودهی بیضه میمون مشخص شده است که A_{dark} همان سلول بنیادی اسپرماتوگونی می‌باشد. نشان داده شده است که نه روز پس از پرتودهی، تعداد سلول‌های A_{pale} به شدت کاهش می‌یابد، در حالی که هیچ تغییری در تعداد سلول‌های A_{dark} مشاهده نشده است(۱۷). این بدان علت است که سلولهای در حال تقسیم و تمایز یافته در اثر اشعه می‌میرند و سلول‌های خاموش زنده می‌مانند. به طور کلی سلول‌های A_{pale} قادر به تکثیر و تشکیل سلول‌های تمایز یافته هستند و مدت زمان برای تبدیل به اسپرم در انسان ۴۸ روز یعنی سه برابر سیکل اپی‌تلیالی لوله منی‌ساز است. سلول‌های A_{dark} سلول خاموش یا سلول بنیادی اسپرماتوگونی می باشد و تنها در صورت آسیب فعال می گردد. آنها در ابتدا به سلولهای A_{pale} تبدیل شده و سپس به دیگر رده‌های سلول زاینده تمایز می‌یابند (۱۶).

مقایسه لوله منی‌ساز انسان و موش نشان می‌دهد که بخش سلول‌های خاموش در موش حذف شده است و فعالیت تکثیری سلول‌های بنیادی حتی در شرایط فعال شدن سلول‌های خاموش در انسان بسیار کمتر از موش است. البته این کاهش تکثیر دارای فوایدی است که باعث کاهش خطا در زمان دو برابر شدن DNA در فاز S می‌گردد. سلول بنیادی کمتر تقسیم بهتری را به همراه دارد (۱۸). همچنین تعداد کلی تقسیمات اسپرماتوگونی بین سلول بنیادی و اسپرماتوسیت در میمون و انسان نیز قابل مقایسه است. در انسان بین A1-B تنها یک نسل اسپرماتوگونی به جای ۶ تقسیم (میمون) وجود دارد (شکل ۲B) (۱۹).



شکل۲: تکثیر و خود نوزایی سلول های بنیادی در موش (A) و انسان (B). این مرحله در انسان فقط یک نسل و در میمون ۶ نسل می باشد (۲۰) با کمی تغییر.

مورفولوژی و ارزیابی عملکردی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی از نظر مورفولوژی قابل شناسایی و شمارش هستند. در موش تعداد سلول‌های بنیادی ۰/۰۳ درصد کل سلول‌های زاینده و ۱/۲۵ درصد همه انواع اسپرماتوگونی‌ها می‌باشد (۱۰) که معادل ۳۰۰۰–۲۵۰۰۰ عدد (۲۱) در موش و ۸۳۰۰۰۰ عدد در رت (۲۲) می‌باشد.

از سال ۱۹۹۴ حضور این سلول‌ها از نظر عملکری نیز به وسیله پیوند قابل ارزیابی شد (۲۳، ۲۴). فناوری پیوند سلول‌های زاینده، دیدگاه‌های جدیدی را در مطالعه محیط زندگی سلول‌های بنیادی و ارزیابی عملکردی آنها برای مشخصه‌های واقعی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گشوده است.

در این ارزیابی سوسپانسیون سلولی حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به بیضه موش گیرنده فاقد اسپرماتوژنزیس درونزاد، تیمار شده با داروهای سایتوتوکسیک یا اشعه (۲۵-۲۳) پیوند می‌شود. در این روش امکان شناسایی سلول‌های بنیادی دارای عملکرد در سوسپانسیون سلولی (با استفاده از روش‌های خالص‌سازی) (۱۶) و امکان مقایسه تعداد سلول بنیادی بعد از تیمار و یا دوره‌های کشت‌های مختلف وجود دارد (۸). مطالعات کمتری نیز در زمینه ارزیابی تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه انجام شده است (۲۶).

با استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌توان روند اسپرم‌زایی، کنش واکنش‌های بین سلولی در بیضه و بیان ژن‌های مختلف در طی فرایند اسپرم‌زایی طبیعی را مورد مطالعه قرار داد (۲۷). همچنین پیوند سلول اسپرماتوگونی که به طور مستقیم ژن مورد نظر در آن القا شده، می‌تواند حیوان ترانس‌ژن را ایجاد نماید (۲۳).

پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از گونه‌های دیگر به موش (زنوگرافت) همراه با اسپرم زایی ناقص (همستر) (۲۸) یا تنها تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (خرگوش و سگ) (۲۹)، گاو (۳۰)، بابون و انسان (۳۱) بوده است. همچنین پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حیوانات اهلی بزرگتر مثل خوک (۳۲)، بز (۳۳) و گاو (۳۰) نیز گزارش شده است. در این موارد اگرچه اسپرم‌زایی کامل اتفاق نمی‌افتد ولی می‌تواند ارزیابی خوبی از پتانسیل سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گونه‌های مختلف پستانداران در طی پیوند باشد.

پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها در گونه‌های معدودی [میمون ماکاکو (۳۴)، خوک (۳۲) و گاو (۳۰)] انجام شده است. نتایج حاصله، اسپرم‌زایی بیشتری را در لوله‌های منی‌ساز نسبت به پیوند همولوگ گزارش نمودند.

نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش

یک مرحله کلیدی در مطالعه بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تعیین پروفایل بیان ژنی آنها می‌باشد. دانش ما در زمینه نشانگرهای مولکولی در دهه‌های اخیر محدود بوده است. تعداد کم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه، نبود نشانگر منحصر به فرد و سیستم کشت تکثیر کننده این سلول‌ها باعث ممانعت از گسترش مطالعه در این زمینه بوده است.

نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجر به جداسازی و خالص‌سازی این سلول‌ها از بقیه سلول‌ها در محیط آزمایشگاه و یا از مدل موجود زنده می‌گردد به علاوه استفاده از نشانگرها در موفقیت پیوند و در نتیجه بازگرداندن باروری به افراد نابارور موثر است (۳۵).

از زمان رایج شدن تکنیک پیوند تاکنون چندین نشانگر جدید و خصوصیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شناخته شده است. کنام (Niche) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نشان می‌دهد که این سلول‌ها ارتباط نزدیکی با ماتریکس خارج سلولی و محتویات آن دارد. اولین مشخصه که پس از پیوند به دست آمد، تمایل سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به لامینین، کلاژن تیپ IV و فیبرونکتین بود. ایمونوسلکشن، با استفاده از اینتگرین α_6 و اینتگرین β_1- دو گیرنده شناخته شده لامینین- منجر به غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شد در حالی که استفاده از ظروف پوشیده از کلاژن تیپ IV و فیبرونکتین باعث غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نشد (۳۶). بعدها سایر پروتئین‌های خارج سلولی در غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیز بررسی گردید و مشخص شد که با استفاده از انتخاب مثبت CD9 سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ۵ و ۷ برابر در رت و موش (به ترتیب) غنی‌سازی می‌شود. با ایمنوهیستوشیمی وجود CD9 در سلول‌های ناحیه غشا پایه و سلول‌های بینابینی نشان داده شد (۳۷).

غنی‌سازی بیشتر (تا ۲۵ برابر) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش نهان بیضه با استفاده از ترکیبی از نشانگرهای غشایی Histocompatibility Complex Class I ($MHC\text{-}1^-$)، $THY\text{-}1^+$ و c-kit انجام گرفت (۳۶). c-kit در A_s تا A_{al} اولیه بیان نمی‌شود و در بیان آن در مراحل بعدی A_{al} و اسپرماتوگونی‌های تمایز یافته افزایش می‌یابد (۳۸). THY-1 که عضوی از ابرخانواده ایمونوگلوبین‌هاست به میزان بالایی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی رت بیان می‌شود (۳۹). عملکرد THY-1 در بیضه ناشناخته می‌باشد و در صورت نبود آن در بیضه موش (مثلا در موتاسیون THY-1) هنوز بارور است (۴۰).

همچنین نشان داده شد که سلول‌های فوق ($THY\text{-}1^+$، $MHC\text{-}1^-$ و $c\text{-}kit^-$)، نیز [$Lymphocyte\ Antigen\ 6\ Complex\ (LY6A^-)$، $CD24^+$ و $CD34^-$] می‌باشند (۴۱). با استفاده از ایمونوهیستوشیمی چندین ژن در بیضه شناسایی شدند که در A اولیه بیان می‌شوند که عبارتند از: Promyelocytic Leukemia Zinc Finger [PLZF(Zfp145)] (۴۲، ۴۳)، GDNF Family Receptor Alpha [GFRα-1] (۴۴، ۴۵)، Early Growth Response 3 (EGR3) (۴۶)، NOTCH1 (۴۵)، SOX3 [SRY (Sex Determining Region Y)-box 3] (۴۷)، Neurogenin 3 (NGN3) (۴۸) و OCT3/4 (۴۹).

PLZF در اسپرماتوگونی A_p، A_s و A_{al} بیان می‌شود و نقش مهمی در تنظیم خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد. بیضه موش فاقد ژن PLZF (PLZF null) و موش لاکسوئید (Luxoid) (موش بدون سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی)، فاقد سلول‌های اسپرماتوگونی بودند (۴۲، ۴۳). NGN3 در اسپرماتوگونی Ap، A_s و A_{al} که c-kit منفی هستد بیان می‌شود و به نظر می‌رسد که در تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی نقش دارد. بیان این ژن در اسپرماتوسیت‌ها دیده شده است (۴۸). Sox3 نیز در اسپرماتوگونی A_p، A_s و A_{al} بیان می‌شود و به احتمال در پیش‌برد روند اسپرم‌زایی نقش دارد (۴۷). GFRα1 گیرنده Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) است که این فاکتور رشد، خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را تنظیم می‌کند. GFRα1 در As بیضه موش بالغ نیز قرار دارد (۴۴). این امر نشان می‌دهد که با این نشانگر می‌توان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را خالص‌سازی نمود. اما پس از انجام خالص‌سازی، نشان داده شد که حدود نیمی از سلول‌های GFRα1 مثبت، c-kit منفی هستند (۴۵). با توجه به این مساله، GFRα1 نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نمی‌باشد. Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 (Stra8) در سلول‌های زاینده پیش میوزی (انواع اسپرماتوگونی) بیان می‌شود (۵۰). قطعه‌ای از پروموتور Stra8 برای بیان مستقیم لوسیفراز (Luciferase) در سلول‌های اسپرماتوگونی استفاده شد، پیوند سلول‌های زاینده انتخاب شده تحت کنترل این قطعه از پروموتور Stra8 منجر به ۷۰۰ برابر غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شد (۵۱). نشانگرهای عمومی‌تر سلول‌های زاینده Germ Cell Nuclear Antigen-1 (GCNA-1) (۵۲) و Heat Shock Protein 90α (HSP90α) (۵۳) می‌باشند.

جدول ۱: نشانگرهای مورد استفاده در شناسایی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جوندگان (موش)

نوع سلول زاینده	نشانگر
سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (A_s و برخی A_{pr})	GFRα1 (44, 45), PLZF (42, 43), NGN (48)
سلول‌های پیش‌ساز (A_{pr}، A_s و A_a)	CDH1, PLZF (42, 43), Oct-4 (49, 54), NGN3 (48), NOTCH-1 (45), SOX3 (47), c-RET (55), GPR125 (56), α_6-integrin (36), β_1-Integrin (36), CD9 (37), Thy-1 (CD90), CD24 (41), EGR3 (46)
سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز یافته A_1-B	NGN3 (48), c-KIT (57)
سلول‌های زاینده	GCNA1 (52), HSP90α (53)
سلول‌های اسپرماتوگونی پیش‌میوزی	STRA8 (50), EE2 (58)
سلول‌های اسپرماتوگونی پیش‌میوزی و اسپرماتید پس‌میوزی	TAF4B (59)
سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های بافت بینابینی	CD9 (37)

CDH1: cadherin 1, type 1, E-cadherin;
EGR3: Early growth response 3;
GCNA1: Germ Cell Nuclear Antigen-1
GFRα1: GDNF family receptor alpha 1;
GPR125: G protein-coupled receptor 125;
NGN: Neurogenin
PLZF: Promyelocytic leukemia zinc finger protein;
POU5F1: Also known as Oct-4;
STRA8: Stimulated by retinoic acid gene 8;
Thy-1: Cell surface antigen

نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان

نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان کمک زیادی به شناخت آنها در جمیعت سلولی بیضه می‌کند ولی تاکنون مطالعات کمتری بر روی خصوصیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان و حتی میمون انجام شده است. بیان برخی نشانگرها در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و تمایز یافته موش (PLZF، DAZL، GFRα1، VASA) در سلول‌های اسپرماتوگونی A_{dark} و A_{pale} میمون ماکاکو نیز تایید شده است (۶۰).

بیان برخی ژن‌ها در بافت بیضه، سلول‌های اسپرماتوگونی، کلاسترهای اسپرماتوگونی و ژرم لاین اسپرماتوگونی انسان گزارش شده است که بیان نشانگرهای CD49f، CD133، DAZL، Oct-4، SSEA4، VASA و TSPY در سلول‌های اسپرماتوگونی خالص پس از جداسازی تایید شده است اما بیان نشانگر E-cadherin، NANOG و ویمنتین (نشانگر سلول‌های سرتولی) منفی بوده است.

جدول۲. مقایسه نشانگرهای شناخته شده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش و انسان

نشانگر	موش	انسان	نشانگر	موش	انسان
α_6-integrin (CD49f)	+(۳۶)	+(۶۱)	MAGE-A4	؟	+(۶۳)
β_1-integrin (CD29)	+(۳۶)	−(۶۴)	Neurogenin	+(۴۸)	؟
CD9	+(۳۷)	؟	NSE 1	؟	+
CD24	+(۴۱)	؟	PLZF (Zfp145)	+(۴۲)	+(۴۳ ,۲۰)
CD133	+(۶۱)	؟	POU5F(Oct-4)	+(۶۵)	−(۶۶)
CDH1	+(۶۷)	؟	RET	+(۶۸)	؟
CHEK2	؟	+(۶۹)	STRA8	+(۵۱)	؟
GFRα1	+(۵۵)	+(۶۱)	Thy-1 (CD90)	+(۴۱)	+(۶۱)
GPR125	+(۶۲)	+(۵۶)	TSPY	−(۷۰)	+(۷۱)
KIT (c-kit,CD117)	+(۵۷)	−(۶۳)	Sca-1(LY6A)	−(۷۲ ,۴۱)	؟

CHEK2: CHK2 checkpoint homolog;
MAGE-A4: melanoma antigen family A, 4;
NSE: Neurone-specific Enolase;
POU5F1: also known as Oct-4;
TSPY: testis specific protein, Y-linked.

در بافت طبیعی بیضه انسان DAZL، SSEA4، VASA، P27 CD133، بیان شده و (α_6-integrin، E-cadherin، NANOG، Oct-4 CD49f) و Stella بیان نمی‌شود (۶۱). همچنین بیان PLZF (۲۰) و GPR125 (۶۲) در سلول‌های اسپرماتوگونی انسان نیز تایید شده است. در مقابل اشتراک بیان برخی ژن‌ها در انسان و موش، برخی از آنها فقط در انسان بیان می‌شود و در موش وجود ندارد و یا بر عکس همانند: β_1-TSPY، c-kit، β_1-integrin(CD29) و POU5F(Oct-4) (جدول۲).

با وجود تحقیقات زیاد در این زمینه، هنوز نشانگر اختصاصی خاص سلول‌های اسپرماتوگونی شناخته نشده است و تمامی ژن‌های آزمایش شده، در سلول‌های اسپرماتوگونی که یک یا دو مرحله تمایز را طی نموده‌اند (مانند A_p و A_{al}) نیز بیان می‌شوند. یافتن نشانگر اختصاصی این سلول‌ها در آینده تحول بزرگی محسوب می‌شود.

جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش

اولین مرحله کار با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، جداسازی آنهاست. در موش فقط ۰/۰۳ سلول‌های زاینده سلول‌های بنیادی هستند (۱۰)، بنابراین تلاش در جهت خالص‌سازی این سلول‌ها امری مهم در کشت و تکثیرآنها محسوب می‌شود. تاکنون پژوهشگران به دلیل نبود یک نشانگر اختصاصی، از رویکردهای متفاوتی برای این امر استفاده نموده‌اند.

یکی از ساده‌ترین روش‌های تهیه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با خلوص بالا، استفاده از بیضه‌های نوزاد (۷۳، ۷۴)، می‌باشد. در حیوانات بالغ با ایجاد مدل نهان بیضگی (۷۵)، هیپرترمی بیضه (۷۶) یا استفاده از حیوانات با کمبود ویتامین A (۲۵، ۳۸، ۷۷، ۷۸) نیز می‌تواند به غنی‌سازی کمک نماید. این بیضه‌ها به دلیل عدم تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به سایر رده‌های بعدی خود، ازبین رفتن سلول‌های زاینده در اثر گرمای بدن و توقف در مرحله اسپرماتوگونیA منبع غنی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ توسط بیلوی و همکاران جداسازی از نوزاد موش صورت گرفت. آنها توانستند از بیضه‌های موش ۶ روزه با روش جداسازی مکانیکی لوله‌ها و هضم آنزیمی (با استفاده از آنزیم‌های کلاژناز تریپسین و هیالورنیداز) تعلیق سلولی حاولی ۹۰ درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دست آورند و از نشانگر GCNA-1 برای تثبیت آنها استفاده کنند. در سال‌های بعد، این روش در نوزاد سایر گونه‌ها مانند رت (۷۹)، خوک (۸۰)، گوساله (۸۱) نیز انجام شد. این روش با روش حذف تمایزی (Diffrential Plating) - حذف سلول‌های سرتولی و میوئیدی (در اثر چسبیدن به کف ظرف کشت) - ارتقا یافت. در این روش، سلول‌های به دست آمده پس از هضم آنزیمی به مدت ۲۴-۴ ساعت در پتری دیش کشت نموده، در نتیجه سلول‌های سرتولی و میوئیدی به کف ظرف می‌چسبند. روش حذف تمایزی هم اینک در اکثر موارد چه در حیوان و چه در انسان (۸۲) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شیب غلظتی ناپیوسته پرکل (Discontinuous Percoll Gradient)

این روش در سال ۱۹۹۶ توسط وان پلت و همکاران در حیوان رت استفاده شد. در این روش، ابتدا محلول ایزواسموتیک پرکل شامل پرکل ۸۲ درصد در محیط کشت MEM آماده شده سپس این محلول رقیق شده و شیب غلظتی ناپیوسته تهیه می‌گردد. سپس در لوله آزمایش ته گرد به ترتیب روی هم قرار می‌گیرد. محلول سلولی حاصل از هضم‌های آنزیمی روی شیب قرار گرفته و پس از سانتریفیوژ بر اساس وزن سلول‌ها در غلظت‌های مختلف قرار می‌گیرد. سلول‌های غلظت‌های ۳۶-۳۲ حاوی بیشترین میزان سلول‌های اسپرماتوگونی است. این روش هم اکنون کاربرد کمی دارد.

روش Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) و Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)

یکی دیگر از روش‌های مورد استفاده جهت افزایش خالص‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی غربالگری سلول‌ها با استفاده از پروتئین‌های غشایی است. در ابتدا سلول‌های به دست آمده از هضم آنزیمی توسط آنتی‌بادی مشخصی آغشته شده و با عبور از ستون FACS یا MACS سلول‌های اسپرماتوگونی را غربال می‌کنند. این فناوری اولین بار در سال ۱۹۹۹ توسط شینوهارا و همکاران (۳۶) و بر اساس نشانگرهای سطحی α_6-integrin و β_1-integrin صورت گرفت. نشانگرهای دیگری مثل $^{-}$MHC-1, Thy-1, c-kit و GFRα1 در خالص‌سازی بیشتر نیز استفاده شده است (۳۹، ۴۱، ۴۵، ۷۵، ۸۳) ولی از آنجایی که هنوز نشانگر سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وجود ندارد، در آنها درصدی از سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز یافته یافت می‌شود.

برخی مطالعات در بیضه موش‌های ترانس‌ژن دارای بیش بیانی GDNF، میزان بالایی از سلول‌های تمایز نیافته اسپرماتوگونی را نشان داده است (۵۵، ۸۴) گرچه هنوز به عنوان روش غنی‌سازی استفاده نشده است ولی احتمالا این بیضه‌ها منبع خوبی از این سلول‌های اسپرماتوگونی است (۸۵).

خالص‌سازی سلول‌های اسپرماتوگونی موش بالغ نسبت به موش نابالغ به مراتب مشکل‌تر است چون بیضه موش بالغ دارای انواع مختلف سلول ژرم است در حالی که در موش نوزاد و نابالغ تنوع سلولی محدود است. گوان و همکاران از بیضه‌ای موش بالغ ۶-۴ هفته (که دارای انواع مختلف سلول‌های زاینده است) استفاده نمودند که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را با غربال‌گری سلول‌های بیان کننده Stra8 خالص شد. Stra8 در سلول‌های پیش میوزی- همه انواع سلول‌های اسپرماتوگونی- بیان می‌شود. کروجی و همکاران (۵۴، ۸۶) نیز از بیضه‌های موش بالغ ۶-۴ هفته استفاده نمودند و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را با جداسازی سلول‌های سرتولی با ظروف پوشیده با Datura Stramonium Agglutinin- Lectin (DSA-lectin) و اسپرماتوسیت‌ها را توسط با ظروف پوشیده با Peanut Agglutinin (PNA-lectin) خالص‌سازی کردند.

سیندل و همکاران (۵۶) از سوسپانسیون سلولی دارای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده از موش‌های ۳۵-۳ هفتگی استفاده نمودند. در این روش خلوص بسیار پایین‌تر از موش نوزاد می‌باشد. هو و همکاران سلول‌های زاینده را ازموش ۸-۶ روزه استفاده نمودند. این موش‌ها تنها دارای سلول‌های اسپرماتوگونی و احتمالا اسپرماتوسیت‌های اولیه هستند. خلوص این روش نسبت به روش قبلی قابل مقایسه می‌باشد. بولانگر و همکاران نیز تنها بافت بینابینی را از لوله‌های منی‌ساز بالغ حذف کردند و از سوسپانسیون سلولی لوله‌های منی‌ساز استفاده نمودند (۸۷).

جدول ۳: انواع روش‌های مورد استفاده در جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش و انسان

روش جداسازی و خالص‌سازی	نوع گونه
استفاده از حیوان نوزاد	موش (۷۳، ۷٤)، رت (۷۹)، خوک (۳۲، ۸۰)، گوساله (۸۱)
حذف تمایزی	موش (٤٥)، گوساله (۸۱)، انسان (۸۲)
مدل نهان بیضگی	موش (۷۵)
هیپرترمی بیضه	موش (۷٦)
استفاده از حیوانات با کمبود ویتامین A	رت (۷۷، ۷۸)، موش (۳۸)، موش بالغ (۲۵)
شیب غلظتی ناپیوسته پرکل	رت (۷۸)
FACS و MACS	موش نوزاد (۳٦، ٤۱، ٤٥، ۷۵)، موش بالغ (۸۸)، رت (۳۹)، انسان (٦۱، ۸۸)
حیوان ترانس‌ژن با بیش بیانی GDNF	موش (۵۵، ۸٤)

جداسازی و خالص سازی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی انسان

کار بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان از سال ۲۰۰۸ آغاز شده است. کوزاک و همکاران جهت خالص‌سازی بیشتر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیوپسی بیضه انسان بالغ از تکنیک MACS با نشانگر $GFR\alpha_1$ استفاده نمودند (۸۸). کنراد و همکاران نیز با تکنیک MACS با نشانگر α_6-integrin سلول‌های بیضه انسان را خالص‌سازی نمودند. آنها از نشانگرهای GFRα1 و Thy-1 را آزمایش کردند ولی خلوص سلول‌ها با نشانگر α_6-integrin بیشتر بود.

در هیچ یک از این مطالعات فوق، خالص‌سازی کامل سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی صورت نگرفته است. در حقیقت به دلیل نبود نشانگری ویژه برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی این مشکل وجود دارد. به نظر می‌رسد استفاده از هضم آنزیمی و حذف تمایزی به همراه تکنیک MACS به تقریب بیشترین خلوص را در پی دارد. اما با توجه به اهمیت سلول‌های سوماتیک به ویژه سلول سرتولی در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وجود درصد کمی از آنها چندان مضر به نظر نمی‌رسد (۵۴، ۹۳-۸۹).

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش در محیط آزمایشگاه

تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی چه در محیط آزمایشگاه و چه در بیضه نیازمند کنترل تنظیمات هورمونی و مکانیسم‌های اتوکرینی و پاراکرینی زیادی است. بنابراین نگهداری و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت پیشرفت مهمی بوده و سیستم کشت طراحی شده برای آن نیز بایستی بتواند از سلول‌ها حمایت لازم را بکند.

تاکنون عواملی چون نبود نشانگرهای اختصاصی جهت شناسایی سلول‌ای بنیادی اسپرماتوگونی و همچنین دانش ناکافی از نیازمندی‌های تغذیه‌ای و فاکتورهای رشد مورد نیاز سلول‌های اسپرماتوگونی مانعی در راه فعالیت‌های مربوط به کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بوده است (۱۶). تلاش در جهت جداسازی و کشت سلول‌های بیضه‌ای در طی سال‌های ۱۹۷۰ آغاز شده است. دو نوع سیستم کشت در روند تکوین اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه استفاده می‌شود که عبارتند از: کشت ارگان بیضه و کشت تعلیق سلول‌های جدا شده. اگرچه کشت ارگان بیضه جذاب تر به نظر می‌رسد، اما به دلیل ساختار پیچیده بیضه و شرایط فیزیولوژیکی، فراهم آوردن شرایطی که بتواند بر روی سلول‌های مشخصی اثر کند مشکل است. در نتیجه رویکرد کشت سلول‌های زاینده جدا شده، بیشتر استفاده می‌شود (۱۶).

تا به امروز سیستم‌های مختلفی برای کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گونه‌های مختلف حیوانات به خصوص موش و گاو به کار رفته است که می‌توان آن را اولین گام جهت فرایند اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه دانست (۷۴، ۸۳، ۹۷-۹۵). استفاده از محیط‌های کشت سرم دار و بدون سرم (۲۵، ۹۸، ۹۹)، کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی لایه تغذیه کننده سلول‌های سرتولی (۵۴، ۱۰۰) یا STO SIM Mouse Embryo-Derived Thioguanine and Ouabain Resistant (نوعی فیبروبلاست جنینی موش) (۷۵، ۱۰۱، ۱۰۳)، افزودن فاکتورهای رشد مختلف (به خصوص GDNF، Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2), Epidermal Growth Factor (EGF) و Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (۷۴، ۸۳، ۱۰۴) و استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی KSOM (۸۰) و Stem Pro-34 (۷۴) همگی تلاش‌هایی بوده که جهت بهبود شرایط محیط کشت در کوتاه مدت و یا دراز مدت به کار رفتند. اگر چه در این زمینه موفقیت‌هایی حاصل شده است، ولی به دلیل موانع مختلف و پیچیدگی‌های کنش و واکنش بین سلولی، تعداد کم این سلول‌ها و تفاوت در نژاد و گونه‌ها، هنوز جای بحث زیادی باقی مانده است.

جهت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی کشت دراز مدت و پاساژهای متوالی لازم می‌باشد. گزارشات اولیه توسط ناگانو و همکاران نشان داد که برخی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش در محیط کشت حاوی ۱۰درصد سرم و روی سلول‌های تغذیه کننده STO (رده سلولی مشتق از فیبروبلاست) می‌توانند به مدت زیادی (چهار ماه) زنده بمانند (۱۰۱، ۱۰۲). این روش‌های کشت هر چند سلول‌ها را زنده نگه می‌داشت اما در طی این مدت هیچ تکثیری از خود نشان ندادند.

به منظور تهیه سیستم کشت مناسب، جیونگ و همکاران سلول‌های زاینده موش بالغ (۶-۴ هفته) را بروی سلول‌های تغذیه کننده STO کشت دادند و به محیط کشت DMEM سرم دار فاکتورهای رشد LIF، bFGF، Stem Cell Factor (SCF)، اینترلوکین-۱۱، Oncostatin M، Insulin-Like Growth Factor 1(IGF-1) و Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) را افزودند. همچنان، کلونی‌های سلول‌های زاینده بعد از ۲۱-۸ روز مشاهده شد. بعد از سه ماه کشت و پاساژ این سلول‌ها تکثیر داشته و باعث کلونی‌زایی در بیضه موش گیرنده شدند (۱۰۳).

یکی ازپیشگامان کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد ، گروه شینوهارای ژاپنی است که می‌توان آنها را مبتکر تمامی روش‌های مختلف کشت این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه نامید. آنها

در سال ۲۰۰۳ سیستم کشت بهبود یافته‌ای را بر اساس محیط کشت ترکیبی و به کارگیری مواد مکمل مختلف از قبیل فاکتورهای رشد شامل: دی-استرادیول، LIF، bFGF، EGF و GDNF طراحی کردند که طی آن تکثیر و شکل‌گیری کلونی را در هفته اول مشاهده نمودند. بعد از زیر کشت‌های مداوم سلول‌های بیضه موش نوزاد در مدت ۵-۴ ماه، گستره‌هایی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را به دست آوردند (۱۰۱۴ برابر) و نام سلول بنیادی رده زاینده Germ-Line Stem Cells (GS) را بر آن نهادند. این سلول‌ها پس از پیوند به موش ناباور ایجاد باروری نمودند (۷۴). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط‌های دارای سرم یا بدون لایه تغذیه کننده نیز کشت شدند (۹۵، ۹۹) و از نظر ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تغییری نداشتند (۹۹). طول مدت کشت آنها در این سیستم‌ها تا دو سال بوده که به میزان 10^{85} برابر افزایش مشاهده شده است (۹۵). همچنین این سلول‌ها در غیاب بستر خارجی و بدون اتصال (Anchorage-Independent Manner) به کف ظروف کشت، زنده مانده و قابل کشت و تکثیر می‌باشند. گرچه کلونی‌های به دست آمده در این روش بدون شکل خاصی بودند ولی پس از پیوند، اسپرم‌زایی ایجاد نمودند (۱۰۵). نتیجه مطالعات آنها نشان می‌دهد که وجود حداقل ۱درصد سرم به محیط کشت باعث افزایش تکثیر سلول‌ها به میزان قابل توجهی می‌گردد. از بین فاکتورهای رشد نیز، نقش GDNF و bFGF در خود نوزایی سلول‌ها ثابت شده است.

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد $Thy\text{-}1^{+}$ بر تک لایه تغذیه کننده سلول‌های STO به همراه استفاده از فاکتور رشد GDNF در محیط بدون سرم، نشان داد که این سلول‌ها می‌توانند تا ده روز زنده بمانند ولی بعد از چهل روز به طور تقریب تمامی آنها از بین می‌روند. افزودن محلول GFRα1 (گیرنده GDNF) و bFGF به محیط کشت بدون سرم فوق فعالیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد(۸۳).

تاکنون انواع فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و افزودنی‌های دیگر از جمله: bFGF، LIF، GDNF، GM-CSF، SCF، IGF-1، Activin A، BMP4، PDGF، IL-11، Oncostatin M و Flk-2L is structurally related to SCF (Flk-2L)، استرادیول، تستوسترون و پروژسترون به تنهایی و یا به صورت ترکیب با یکدیگر جهت بهبود شرایط محیط کشت مورد استفاده قرار گرفته است (۵۴، ۷۵، ۸۳، ۸۹، ۱۰۲، ۱۰۶) که تاثیر آنها بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی متفاوت بوده است. شواهد مختلف نشان داد که اکثر فاکتورهای رشد دارای اثرات طبیعی و حتی کاهنده تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. به احتمال افزایش تعداد سلول‌ها با افزودن فاکتورهای رشد خود نوسازی را نشان می‌دهد و حالت پایدار نشانه حیات و کاهش تعداد، نشان دهنده مرگ سلول‌های بنیادی و تمایز آنها می‌باشد (۱۶).

گزارشات در مورد کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات بالغ به دلایل مختلفی چون: کمی تعداد، کاهش پتانسیل تکثیر و مشکلات در خالص‌سازی آنها به ندرت گزارش شده است. این گزارشات نشان می‌دهد که میزان کلونی‌زایی در محیط کشت در مقایسه با سلول‌های بدست آمده از نوزاد موش به میزان زیادی پایین‌تر می‌باشد (۵۴) ولی می‌توانند سلولی پرتوان ایجاد نمایند (۹۴، ۱۰۷).

در سیستم‌های کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برخی موارد مهم وجود دارد که توجه به آنها می‌تواند در افزایش موفقیت کشت کمک نماید (۱۶، ۱۰۸):

۱. بالا بودن میزان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با انتخاب نمونه‌های نابالغ

۲. استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی مانند Stem Pro-34 و افزودن ویتامین‌ها (A، C و E) و فاکتورهای رشد مختلف (به خصوص GDNF همراه با محلول گیرنده آن GFRα1، FGF2 و IGF)

۳.کشت طولانی مدت همراه با پاساژهای مختلف

۴. کشت این سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه، بهتر انجام می‌گیرد و در دمای ۳۴-۳۲ درجه - که دمای طبیعی سلول‌های بیضه است - به خوبی زنده نمی‌مانند که در این امر هیچ مطالعه‌ای نیز علت آن را توضیح نداده است.

۵. در سیستم‌های کشت موفق کاناتسو شینوهارا (۷۴، ۹۵) و همکاران درصد کمی از سلول‌های کشت شده قادر به کلونی‌زایی در موش گیرنده است. این به احتمال به دلیل آن است که ممکن است این سلول‌ها مراحل اولیه تمایز را شروع کرده باشند و بعد از پیوند قادر به کلونی‌زایی نباشند و یا اینکه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در یک فاز ویژه‌ای قادر به تکثیر در موش گیرنده است. البته این موارد به مطالعه بیشتر نیازمند است به خصوص آنکه ژن‌های بیان شده در سلول‌های کشت شده نشان نمی‌دهد که این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی باشد.

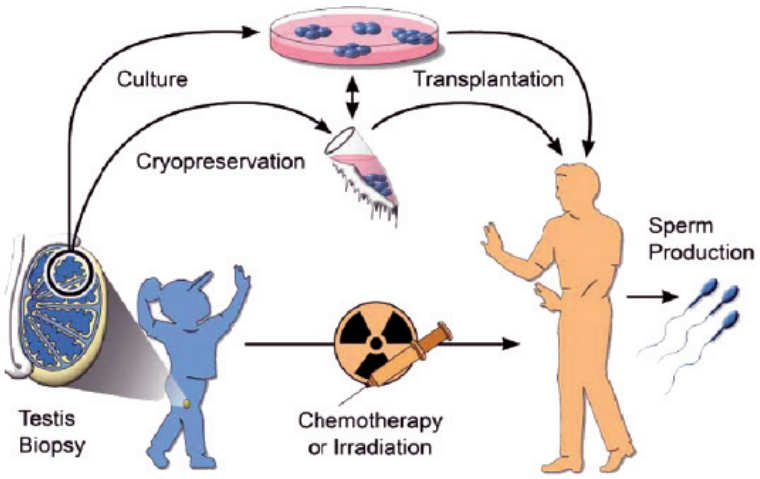
کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان در محیط آزمایشگاه

تاکنون گزارش‌های ارایه شده بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان بیشتر با هدف تولید سلول های پرتوان انجام شده است (۶۱، ۸۸). تنها مورد گزارش شده با تکیه بر مطالعه‌های گذشته (۸۲)، از بیضه‌های کامل انسان (برداشت بیضه به دلیل سرطان پروستات) جهت کشت در شرایط آزمایشگاه استفاده شد. قبل از جداسازی سلول‌های زاینده، قطعات بافت بیضه با محلول انجمادی DMSO ۸ درصد و سرم ۲۰ درصد در ازت مایع منجمد گردید و پس از ذوب در دو مرحله هضم آنزیمی بر اساس روش‌های قبلی (۷۸)، سلول‌ها جداسازی و خالص شدند و به مدت بیست و هشت هفته در محیط آزمایشگاه به میزان زیادی تکثیر شد. بررسی آنها نشان داد که سلول‌های بنیادی زاینده انسان در آزمایشگاه قابل تکثیر می‌باشد.

نتیجه گیری

درمان بیش از ۷۰ درصد سرطان‌های بیضه در کودکان با استفاده از اشعه و شیمی درمانی موفقیت‌آمیز بوده که متاسفانه درصد بالایی از آنها در بلوغ دچار ازواسپرمی و یا کاهش چشم‌گیر تعداد اسپرم می‌شوند. این امر می‌تواند کیفیت زندگی آنها را به خطر بیندازد. نگهداری، کشت و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یکی از راه‌های درمان ناباروری برای این افراد پیشنهاد شده است (شکل ۳) (۱۰۹) که تاکنون این امر در حیوانات گونه‌های مختلف به طور موفقیت‌آمیزی انجام شده است و به خصوص در موش منجر به تولد نوزادان طبیعی شده است (۲۳، ۱۰۴، ۱۱۰) ممکن است در مورد انسان سلول بنیادی درمانی، برای درمان برخی از ناباروری‌ها کاربرد داشته باشد. گر چه مطالعات ارزشمندی در مورد تکثیر این سلول‌ها انجام شده است ولی با وجود ناگفته‌های فراوان در خصوص خالص‌سازی سیستم پیشرفته کشت و در دسترس نبودن رده سلولی بایستی مطالعات ادامه یابد.

همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که رده سلول‌های زاینده



شکل۳. مدل استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در درمان ناباروری کودکان سرطانی (۱۰۹، ۱۱۱)

می‌توانند سلول‌های پرتوان را تولید نمایند. در سال ۲۰۰۴ سلول‌های شبه بنیادی جنینی اولین بار در کشت‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد مشاهده گردید که سلول‌های بنیادی چندتوان رده زاینده نامیده شدند (۱۱۲). در سال ۲۰۰۶ نیز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش بالغ جداسازی و کشت شدند و سلول‌هایی با خواص سلول‌های بنیادی جنینی (سلول‌های بنیادی پرتوان رده زاینده) به دست آمد (۹۴) که مطالعات مختلف دیگری نیز پرتوانی آنها را ثابت نمودند (۵۶).

وجود چنین سلول‌هایی در کشت‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان نیز به اثبات رسیده است (۶۱).

سلول‌های بنیادی چندتوان رده زاینده گرچه پیشرفت قابل توجهی در مطالعات بیولوژی محسوب می‌شود ولی تمایز آنها به رده‌های مختلف لایه‌های جنینی خطر جدی در پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حاصل از کشت در انسان محسوب می‌گردد.

References

1. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 1972; 52: 198-236.
2. Ogawa T. Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. J Mol Med. 2001; 79: 368-374.
3. 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: 1845-1850.
4. Jegou B. The Sertoli cell. In: de Kretser DM (ed). Bailliere's clinical endocrinology and metabolism. The Testis. London: Bailliere Tindall; 1991; 273-311.
5. Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, Clausen OP, van der Molen HJ. Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. J Reprod Fertil. 1982; 65: 431-438.
6. Russell LD. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell interactions. In: Russell LD, Griswold MD (eds). The Sertoli Cell. Clearwater FL: Cache River Press; 1993; 365-390.
7. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. Hum Reprod. 1998; 13 Suppl 1: 1-8.
8. 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: 2207-2213.
9. de Rooij DG. Stem cells in the testis. Int J Exp Pathol. 1998; 79: 67-80.
10. Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. Mutat Res. 1993; 290: 193-200.
11. Chiarini-Garcia H, Russell LD. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. Biol Reprod. 2001; 65: 1170-1178.
12. de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction. 2001; 121: 347-354.
13. Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. Dev Cell. 2007; 12: 195-206.
14. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl. 2000; 21: 776-798.
15. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. Fertil Steril. 1966; 17: 705-721.
16. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. APMIS. 2005; 113: 727-742.
17. van Alphen MM, van de Kant HJ, de Rooij DG. Depletion of the spermatogonia from the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. Radiat Res. 1988; 113: 473-486.
18. Lajtha LG. Stem cell concepts. Differentiation. 1979; 14: 23-34.
19. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. Am J Anat. 1966; 118: 509-524.
20. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res C Embryo Today. 2009; 87: 27-34.
21. Nagano MC. Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. Biol Reprod. 2003; 69: 701-707.

22. Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. Biol Reprod. 2002; 66: 944-949.
23. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91: 11303-11307.
24. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91: 11298-11302.
25. Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction. 2002; 124: 791-799.
26. Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod. 2007; 77: 897-904.
27. Parreira GG, Ogawa T, Avarbock MR, Franca LR, Brinster RL, Russell LD. Development of germ cell transplants in mice. Biol Reprod 1998; 59: 1360-1370.
28. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. Biol Reprod. 1999; 60: 515-521.
29. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. Biol Reprod. 1999; 61: 1331-1339.
30. Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DP, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduction. 2003; 126: 765-774.
31. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. Biol Reprod. 2001; 64: 1409-1416.
32. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod. 2002; 66: 21-28.
33. Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. Mol Reprod Dev. 2003; 64: 422-428.
34. Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. Hum Reprod. 2002; 17: 55-62.
35. McLean DJ. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. Cell Tissue Res. 2005; 322: 21-31.
36. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 5504-5509.
37. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. Biol Reprod. 2004; 70: 70-75.
38. Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. Endocrinology. 1999; 140: 5894-5900.
39. Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. Dev Biol. 2004; 274: 158-170.
40. Barlow JZ, Kelley KA, Bozdagi O, Huntley GW. Testing the role of the cell-surface molecule Thy-1 in regeneration and plasticity of connectivity in the CNS. Neuroscience. 2002; 111: 837-852.
41. 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 USA. 2003; 100: 6487-6492.
42. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. Nat Genet. 2004; 36: 647-652.
43. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat Genet. 2004; 36: 653-659.
44. von Schonfeldt V, Wistuba J, Schlatt S. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. Cytogenet Genome Res. 2004; 105: 235-239.
45. Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. Dev Biol. 2005; 279: 114-124.
46. Hamra FK, Schultz N, Chapman KM, Grellhesl DM, Cronkhite JT, Hammer RE, et al. Defining the spermatogonial stem cell. Dev Biol. 2004; 269: 393-410.
47. 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: 215-225.
48. Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, et al. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. Dev Biol. 2004; 269: 447-458.
49. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. Mech Dev. 1998; 71: 89-98.
50. Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, et al. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. J Cell Biol. 1996; 135: 469-477.
51. Giuili G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. EMBO Rep. 2002; 3: 753-759.
52. Enders GC, May JJ, 2nd. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. Dev Biol. 1994; 163: 331-340.
53. Lee SJ. Expression of HSP86 in male germ cells. Mol Cell Biol. 1990; 10: 3239-3242.
54. 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: 281-289.
55. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science. 2000; 287: 1489-1493.
56. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. Nature. 2007; 449: 346-350.
57. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. Develop-

ment. 1991; 113: 689-699.
58. Koshimizu U, Nishioka H, Watanabe D, Dohmae K, Nishimune Y. Characterization of a novel spermatogenic cell antigen specific for early stages of germ cells in mouse testis. Mol Reprod Dev. 1995; 40: 221-227.
59. Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, Lamb DJ, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. Genes Dev. 2005; 19: 794-803.
60. Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. Hum Reprod. 2009; 24: 1704-1716.
61. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. Nature. 2008; 456: 344-349.
62. Dym M, He Z, Jiang J, Pant D, Kokkinaki M. Spermatogonial stem cells: unlimited potential. Reprod Fertil Dev. 2009; 21: 15-21.
63. Rajpert-De Meyts E, Jacobsen GK, Bartkova J, Aubry F, Samson M, Bartek J, et al. The immunohistochemical expression pattern of Chk2, p53, p19INK4d, MAGE-A4 and other selected antigens provides new evidence for the premeiotic origin of spermatocytic seminoma. Histopathology. 2003; 42: 217-226.
64. Schaller J, Glander HJ, Dethloff J. Evidence of beta 1 integrins and fibronectin on spermatogenic cells in human testis. Hum Reprod. 1993; 8: 1873-1878.
65. Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, et al. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. Dev Biol. 2003; 258: 209-225.
66. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. Cancer Res. 2003; 63: 2244-2250.
67. Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. Biol Reprod. 2007; 76: 130-141.
68. Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. Biol Reprod. 2006; 74: 314-321.
69. Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. APMIS. 2003; 111: 252-265.
70. Kido T, Lau YF. The rat Tspy is preferentially expressed in elongated spermatids and interacts with the core histones. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 350: 56-67.
71. Schnieders F, Dork T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. Hum Mol Genet. 1996; 5: 1801-1807.
72. van Bragt MP, Ciliberti N, Stanford WL, de Rooij DG, van Pelt AM. LY6A/E (SCA-1) expression in the mouse testis. Biol Reprod. 2005; 73: 634-638.
73. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol. 1977; 74: 68-85.
74. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biol Reprod. 2003; 69: 612-616.
75. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod. 2004; 71: 722-731.
76. McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. Biol Reprod. 2002; 66: 1374-1379.
77. Mitranond V, Sobhon P, Tosukhowong P, Chindaduangrat W. Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. Acta Anat (Basel). 1979; 103: 159-168.
78. van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, de Rooij DG, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. Biol Reprod. 1996; 55: 439-444.
79. Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. J Androl. 1996; 17: 708-717.
80. Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod. 1999; 61: 225-230.
81. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction. 2002; 124: 85-94.
82. Sadri-Ardekani H, 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 Cells In Vitro. JAMA. 2009; 302: 2127-2134.
83. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101: 16489-16494.
84. Yomogida K, Yagura Y, Tadokoro Y, Nishimune Y. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. Biol Reprod. 2003; 69: 1303-1307.
85. de Rooij DG. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 7939-7940.
86. Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H. Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2007; 5: 109-115.
87. Boulanger CA, Mack DL, Booth BW, Smith GH. Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:3871-3876.
88. Kossack N, Meneses J, Shefi S, Nguyen HN, Chavez S, Nicholas C, et al. Isolation and Characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. Stem Cells. 2008; 27: 138-149.
89. 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: 709-720.

90. Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, et al. Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1- dependent pathway. FASEB J. 2009; 23: 2076-2087.
91. Kim J, Seandel M, Falciatori I, Wen D, Rafii S. CD34+ testicular stromal cells support long-term expansion of embryonic and adult stem and progenitor cells. Stem Cells. 2008; 26: 2516-2522.
92. Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H. Colony formation efficiency of frozen-thawed adult mouse spermatogonial stem cells in co culture with Sertoli cells. Iranian Journal of Anatomical Sciences. 2007; 4: 303-313.
93. Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. Reproduction. 2008; 136: 543-557.
94. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature. 2006; 440: 1199-1203.
95. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. Biol Reprod. 2005; 72: 985-991.
96. Kubota H, Brinster RL. Technology insight: In vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006; 2: 99-108.
97. 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: 272-281.
98. Nagano M, Brinster RL. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. APMIS. 1998; 106: 47-55.
99. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, et al. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. Development. 2005; 132: 4155-4163.
100. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. Theriogenology. 2006; 65: 1828-1847.
101. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell. 1998; 30:389-397.
102. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. Biol Reprod. 2003; 68: 2207-2214.
103. Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. J Androl. 2003; 24: 661-669.
104. 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: 2660-2667.
105. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Miki H, Ogonuki N, Toyokuni S, et al. Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells in vitro. Biol Reprod. 2006; 74: 522-529.
106. Oatley JM, Reeves JJ, McLean DJ. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. Biol Reprod. 2004; 71: 942-947.
107. Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. Nat Protoc. 2009; 4: 143-154.
108. de Rooij DG. Spermatogonial Stem Cells. In: Baharvand H (ed). Trends in Stem Cell Biology and Technology. New York: Humana Press; 2009; 149-162.
109. Radford J, Shalet S, Lieberman B. Fertility after treatment for cancer. Questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. BMJ. 1999; 319: 935-936.
110. Yuan Z, Hou R, Wu J. Generation of mice by transplantation of an adult spermatogonial cell line after cryopreservation. Cell Prolif. 2009; 42: 123-131.
111. Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. Science. 2007; 316: 404-405.
112. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. Cell. 2004; 119: 1001-1012.