Review Article

بررسی شرایط کشت و قدرت کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی در محیط کشت: یک مطالعه مروری

مریم محل دشتیان[۱]، زهره ماکولاتی[۲*]، محمدتقی قربانیان[۱]، مجید نقدی[۲]

۱- گروه سلولی- مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه علوم پایه دامغان، سمنان، ایران.
۲- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۰۶

چکیده

اسپرمزایی، فرآیندی بسیار پیچیده و تنظیم شده است که در طی آن، سلول‌های زایای بنیادی، به اسپرماتوزوآ تبدیل می‌شوند. این سلول‌های بنیادی که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نامیده می‌شوند، در قاعده‌ی لوله‌های منی ساز قرار دارند و دارای توانایی خودنوزایی و تمایز به سلول‌های زایای عملکردی می‌باشند. به دلیل این توانایی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قادر به از سرگیری مجدد فرایند اسپرمزایی پس از آسیب‌های بیضه‌ای ایجاد شده توسط مواد سمی و یا پس از پیوند به گیرنده‌ی نابارور می‌باشد. بنابراین، خودنوزایی این سلول‌ها ضامن حفظ این جمعیت سلولی و در نتیجه، حفظ باروری می‌باشد. اگر چه مطالعات پیشین نشان داده است که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش و سایر گونه‌ها می‌توانند برای مدت طولانی زنده بمانند و تکثیر شوند، اما اطلاعات کمی از محیط کشت مناسب برای رشد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی در دست است. تشخیص مارکرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، امکان جداسازی این جمعیت سلولی را فراهم می‌کند. جمعیت سلولی جدا شده، می‌تواند در محیط کشت تکثیر شده و سپس به گیرنده‌ی نابارور پیوند زده شود. بنابراین، تشخیص مارکرها و تثبیت سیستم‌های کشت طولانی مدت برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی جهت استفاده از توانایی این سلول‌ها در موارد بالینی ضروری است. در این مقاله، به بررسی مارکرهای شناخته شده برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و تکنیک‌های کشت آزمایشگاهی جهت تکثیر این سلول‌ها در انسان پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، کلونی، خودنوزایی.

مقدمه

خودنوزایی و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی در بیضه‌ی انسان: اسپرمزایی فرآیند بسیار پیچیده و تنظیم شده‌ای است که در آن، سلول‌های زایای بنیادی به اسپرماتوزوآ تمایز می‌یابند (۱). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در غشاء پایه‌ی لوله‌های منی‌ساز قرار دارند و اساس اسپرمزایی و باروری مردان را تشکیل می‌دهند. از آن‌جا که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های هدف اصلی جهت حفظ باروری مردانه است، خودنوزایی این سلول‌ها ضامن حفظ این جمعیت سلولی و در نتیجه، حفظ باروری می‌باشد. هرچند مطالعات پیشین نشان داده است که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، در سایر گونه‌ها نظیر موش و خوکچه‌ی هندی، می‌توانند برای مدت طولانی زنده بمانند و تکثیر شوند، اما اطلاعات کمی از محیط کشت مناسب برای رشد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی در دست است (۶-۲). مشابه دیگر سلول‌های بنیادی خاص هر بافت، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیز به‌ندرت یافت می‌شوند، به‌طوری‌که در هر بیضه انسان، ۱۰۸ سلول وجود دارد که از این تعداد، ۲×۱۰۴ سلول، از نوع سلول‌های بنیادی هستند (۷). علت این تعداد کم این است که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، به سرعت وارد تمایز شده و به اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم، تمایز می‌یابند (۸). مطالعات قبلی Clermont، بر روی اسپرماتوژنز انسان، دو نوع اسپرماتوگونیا را بر اساس الگوی رنگ آمیزی هسته‌ها نشان می‌دهد که شامل اسپرماتوگونی Apale (روشن) و اسپرماتوگونی Adark (تیره) می‌باشند (۹ و ۱۰). معمولا هر دو نوع سلول، به‌عنوان سلول‌های بنیادی در نظر گرفته می‌شوند (۱۰ و ۱۱). اسپرماتوگونی‌های Adark، به‌عنوان سلول‌های بنیادی ذخیره‌ای عمل می‌کنند و به ندرت تقسیم می‌شوند، اما در موارد آسیب و بیماری، می‌توانند دچار خودتجدیدی شوند. این در حالی است که اسپرماتوگونی‌های Apale، سلول‌های بنیادی تجدیدپذیر هستند (۱۲-۹). اسپرماتوگونی Apale، به اسپرماتوگونی نوع B تقسیم می‌شود و سپس به اسپرماتوسیت، تمایز می‌یابد. بنابراین، در انسان، مراحل میتوزی کمتری برای رسیدن به اسپرماتوسیت مورد نیاز است و در مقایسه با جوندگان، تکثیر و کلونی‌زایی این سلول‌ها بسیار کمتر است (۱۶-۱۳). Ehmcke و همکاران، پیشنهاد کردند که در پستانداران، برای تولید تعداد مشابهی از سلول‌های بنیادی تمایز یافته، عملکرد میتوزی بالاتر اسپرماتوگونی‌ها لازم است. این عملکرد میتوزی بالاتر، خطر جهش‌های سلول‌های زایا و آسیب‌های سلولی را افزایش می‌دهند. برای کاهش این خطر، اسپرماتوگونی paleA، نقش پیش‌ساز را ایفا می‌نماید و تکثیر آن، تعداد کل سلول‌های زایا را افزایش می‌دهد. در نتیجه، نقش سلول‌های بنیادی، به اسپرماتوگونی‌های darkA محدود می‌شود که در موارد سیتوتوکسیک و یا کاهش طبیعی، سبب

* نویسنده مسئول: زهره ماکولاتی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران. تلفن: ۰۷۳۱-۲۲۲۰۹۹۴
Email: zohreh1438@yahoo.com

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

تجدید سلول‌های پیش‌ساز می‌گردد (۱۷).

مارکرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی: در طی سال‌های گذشته، مجموعه مارکرهایی برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی شناسایی شده است (۱۸). He و همکاران، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان را بر اساس بیان مارکر سطح سلولی و G-پروتئین متصل شده با پذیرنده‌ی ۱۲۵[1]، جداسازی و کشت دادند (۱۹). سلول‌های GPR 125 مثبت، جمعیت سلولی بسیار نادری هستند که احتمالا جزء اسپرماتوگونی darkA یا زیر جمعیتی از اسپرماتوگونی‌های Apale در حال تجدید هستند. همچنین، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی، تعدادی از مارکرهای شناخته شده در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش و دیگر اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته مانند GFRA-1، UCHL1 (PGP 9.5)، ZBTB16 (PLZF) و THY-1 (CD90) را بیان می‌کنند (۱۸و ۱۹). MAGEA 4، یکی از اعضای خانواده آنتی‌ژن سرطان ـ بیضه است که در ترمیم DNA و تمایز سلولی نقش دارد. همچنین، به‌وسیله تمامی اسپرماتوگونی‌های انسان (Apale، Adark) و اسپرماتوسیت B، بیان می‌شود (۱۸و ۱۹) و بیان آن در آغاز میوز، به‌سرعت کاهش می‌یابد (۲۵-۱۹) در مطالعه‌ای دیگر، تجزیه و تحلیل کلی بیان ژن‌های اسپرماتوگونی انسانی مشتق شده از بیوپسی بیضه بزرگسالان، که اسپرماتوگونی، تنها نوع سلول زایا بود، بیان بالای ژن‌هایی که به صورت خاص، مسئول عملکرد سلول‌های اسپرماتوگونی در موش هستند را نشان داده است (۲۶). از این ژن‌ها، پذیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی FGFR3[2] (۲۷،۲۶)، دسموگلین-۲، آنتی‌ژن سرطان ـ بیضه NY-ESO-1 (CTAG 1 A/B B) و فاکتور رونویسی سلول‌های جنینی تمایز نیافته (UTF1)[3] (۳۰-۲۸)، اغلب بیان بالایی را نشان دادند. بیان این مارکرها در سطح پروتئین، با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی از نمونه‌های بیضه طبیعی تایید شده است. FGFR3، در سلول‌های زایای جنین انسان بیان می‌شود و بیان آن در بیضه‌ی بزرگسالان، به اسپرماتوگونی محدود می‌شود (۲۷-۲۶). UTF 1 نیز فاکتور رونویسی دخیل در پرتوانی و خودتجدیدی سلول‌های بنیادی جنین موش و انسان است (۳۰-۲۸). UTF1، ژن هدف مارکر پرتوانی POU5F1 (OCT 3/4) است که همراه با SOX 2، رونویسی POU5F1 را در سلول‌های بنیادی جنینی، تنظیم می‌کند و تکثیر این سلول‌ها را القا می‌کند (۳۱).

بیان UTF 1 در بیضه انسان طبیعی، بعد از تولد عمدتا در اسپرماتوگونی‌های کودکی و بزرگسالی دیده می‌شود (۳۶-۳۲). الگوی بیان UTF 1 در بیضه انسان طبیعی و تومورهای بیضه‌ای، نشان می‌دهد که ممکن است این پروتئین در خودتجدیدی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقش داشته باشد. همچنین، مطالعات، نشان داده است که در گونوسیت‌های نرمال و اسپرماتوگونیا، رنگ آمیزی CHK 2 مثبت می‌باشد (۳۷). NSE (انولاز ویژه‌ی نورون) نیز در اسپرماتوگونی نرمال بیان می‌شود (۳۸). پروتئین‌های خانواده DAZ (حذف شده در بیماران آزواسپرم) ، شامل ژن اتوزوم DAZL (DAZ-like) است و در اسپرماتوگونی‌ها و گونوسیت‌های جنین انسان، بیان می‌شوند (۳۹). قابل توجه است‌که برخلاف DAZ، بیان پروتئین DAZL در سلول‌های زایا، بعد از میوز باقی می‌ماند. اعتقاد بر این است که، پروتئین‌های خانواده DAZ در تکامل سلول‌های زایای نر نقش دوگانه دارند و هم در طول میوز و هم قبل از آن در طول تشکیل جمعیت SSC ها نقش دارند (۴۰). ارتولوگ‌های DMRT 1[4] نیز از مگس و کرم‌ها تا انسان، نقش حفاظتی بالایی در تمایز جنسی دارند (۴۱) و در مهره‌داران، بعد از تولد دارای نقش اساسی در تمایز بیضه‌ها هستند (۴۲). DMRT 1، با استفاده از ایمونوهیستوشیمی، در اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت‌ها قبل از میوز، شناسایی شده است (۴۳).

کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه: تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت، امری مهم است و کلونی‌زایی این سلول‌ها، منبع با ارزشی از سلول‌های زایا را برای مطالعات بعدی نظیر انجماد، پیوند این سلول‌ها در درمان ناباروری، دستکاری ژنتیکی و تمایز در محیط آزمایشگاه فراهم می‌آورد. از این رو، سیستم کشت، بایستی به گونه‌ای باشد که حمایت لازم از این سلول‌ها را فراهم نماید. تا به امروز، سیستم‌های کشت مختلفی برای این منظور ارائه شده است. علی‌رغم موفقیت‌های به دست آمده در این زمینه، به‌دلیل موانع مختلف و پیچیدگی‌های کنش و واکنش سلولی، همچنان ابهامات زیادی باقی مانده است. در حالت کلی، کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مردانه، به دلایل مختلف از جمله تعداد کم این سلول‌ها، امری دشوار است. به‌علاوه، کاهش قابل توجهی نیز در بقای سلول‌های کشت داده شده در طی هفته‌ی اول، ایجاد می‌شود (۴۴). از طرف دیگر، سرعت تکثیر سلولی در محیط کشت، کم است و یا احتمالا وجود ندارد (۴۷-۴۵). در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی، نگهداری و تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی در محیط کشت را گزارش نموده‌اند (۵۷-۴۸) (جدول ۱).

Li YF و همکاران در سال ۲۰۰۵، بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی در آزمایشگاه را با استفاده از سیستم هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی مورد بررسی قرار دادند (۴۸). این محققان، سلول‌های c-kit$^-$ alpha 6$^+$ Thy-1$^+$ به دست آمده با استفاده از تکنیک جداسازی ستون‌های مغناطیسی[5]، را در سیستم هم‌کشتی، کشت داده و مشاهده نمودند که این سلول‌ها می‌توانند در محیط‌های DMEM و DMEM/12F حاوی FBS[6] و بر روی لایه تغذیه کننده، به طور پایدار زنده بمانند. میزان بقا در عرض یک هفته، بیش از ۹۰ درصد بود. کشت سلولی بلند مدت نیز نشان داد که سلول‌ها به تدریج به صورت تکه‌ی سلولی پراکنده یا تجمعات فشرده بر روی سطح سلول‌های سرتولی، متصل شده‌اند. بخشی از سلول‌ها که دارای اتصالات محکم‌تری با سلول‌های سرتولی بودند، می‌توانستند بیش از ۳ ماه زنده بمانند و یا حتی تکثیر شوند. پیوند سلول‌های زایا نشان داد که برخی از سلول‌های c-kit$^-$ alpha 6$^+$ Thy-1$^+$ نشان‌دار شده توسط PKH 26، می‌توانند بر روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز موش nude قرار گرفته و به صورت سلول‌های منفرد و یا جفت، ۲ ماه پس از پیوند، حضور داشته باشند. ارزیابی عملکرد سلول‌های کشت شده به وسیله‌ی شمارش سلول‌های فلورسانس در لوله‌های منی‌ساز نیز نشان داد که ۵۴/۹ و ۹/۲ درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی c-kit$^-$ alpha 6$^+$ Thy-1$^+$، به ترتیب به مدت ۲ و ۴ هفته بعد از کشت هنوز باقی مانده است (۴۸). XH oG و همکاران، در سال ۲۰۰۸

1- G-Protein –coupled Receptor 125(GPR125)
2- Fibroblast Growth Factor Receptor 3(FGFR3)
3- Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1(UTF1)
4- Doublesex and mab-related transcription factor
5- Immuno magnetic beeds sorting technique
6- Fetal Bovine Serum

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

گزارش نمودند که فاکتورهای رشد، بقا و تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی انسانی را افزایش می‌دهند. نتایج تحقیقات این گروه نشان می‌دهد که زمان بقا و سرعت تکثیرسلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه تحت تیمار با فاکتورهای رشد SCF، LIF و bFGF، در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌داری افزایش یافته است (۴۹). YB Wang و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸، تقویت رشد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی را با استفاده از کشت این سلول‌ها بر روی لایه‌ی تغذیه کننده‌ی فیبروبلاست جنینی انسان (hEF)[1]، مشاهده نمودند. نتایج مطالعات این محققین نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بر روی لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی hEF زنده مانده و تشکیل کلونی داده‌اند. کلونی‌ها برای مارکرهای SSEA1 و OCT-4 به شدت مثبت بوده و فعالیت آلکالین فسفاتازی قوی داشتند. به علاوه، بیان بالایی از ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در این سلول‌ها مشاهده شد (۵۰).

در ادامه‌ی مطالعات پیشین، B Cheng و همکاران در سال ۲۰۰۹، موفق به کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی سلول‌های لایه‌ی تغذیه کننده‌ی شبه فیبروبلاستی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنین انسان[2] و در حضور GDNF[3] حداقل به مدت ۲ ماه گردیدند. آنالیز مارکرهای سطح سلولی نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی سطح بالایی از فعالیت آلکالین فسفاتازی را حفظ کرده و با آنتی بادی‌های SSEA1[4]، OCT4 و CD49F به شدت رنگ شدند. همچنین، در این سلول‌ها ژن‌های مرتبط با سلول‌های زایا نظیر STRA8 و SOX3 و ژن‌های مرتبط با حالت پرتوانی نظیر OCT4، به میزان بالایی بیان شده بود (۵۱). پس از این مطالعات، JJ miL و همکاران در سال ۲۰۱۰، تکثیر طولانی مدت و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی به دست آمده از بیماران آزواسپرم انسدادی و غیرانسدادی را تحت شرایط کشت فاقد لایه‌ی تغذیه کننده‌ی خارجی، مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین با استفاده از روش جداسازی سلول توسط کلاژن و جداسازی سلول مغناطیسی فعال شده، موفق به ایجاد یک سیستم تکثیر طولانی مدت شدند که در آن تعداد بسیار زیادی سلول بنیادی اسپرماتوگونی خالص از بیماران آزواسپرم انسدادی و غیرانسدادی به دست می‌آید. این سلول‌ها، ویژگی‌های خود را به مدت بیش از ۱۲ پاساژ در آزمایشگاه (بیش از ۶ ماه) حفظ کردند. علاوه بر این، جمعیت‌هایی از سلول‌ها که برای مارکرهای خاص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، GFR α-1 و Integrin α-6، مثبت بودند، در پاساژ ۸، بیش از ۸۰ درصد افزایش یافته بودند (۵۲). به دنبال آن، گروه تحقیقاتی S Liu و همکاران در سال ۲۰۱۱، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را طی ۲ مرحله هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم‌های کلاژناز نوع ۱ و تریپسین جدا نمودند. این سلول‌ها که با استفاده از سانتریفیوژ گرادیان غلظتی پرکول و به دنبال آن، با روش اتصال سطحی افتراقی، جداسازی شده بودند، 4OCT مثبت بودند که نشان دهنده‌ی این بود که این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند. درجه‌ی خلوص این سلول‌ها ۸۶/۷٪ بود که با روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جداشده، بر روی لایه‌ی تغذیه کننده‌ی سلول‌های سرتولی انسانی، تشکیل تعداد زیادی کلونی دادند. بعد از گذشت ۱ ماه از کشت، هنوز تعدادی از کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، قادر به تشکیل کلونی‌های پایدار برای مدت طولانی بر روی لایه‌ی تغذیه کننده‌ی سلول‌های سرتولی بودند (۵۳).

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی زایای مرد، با استفاده از هضم آنزیمی و روش MACs، توسط He Z و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز گزارش شده است (۵۴). در این مطالعه، اسپرماتوگونی‌های GPR12 و GFRA مثبت، از بیضه‌های بالغ انسانی جداسازی شدند. خلوص سلول‌های اسپرماتوگونی GPR125 و GFRA1 مثبت جدا شده بعد از MACs، بیش از ۹۵ درصد و میزان زنده‌ماندن سلول‌ها، ۹۶ درصد بود. اسپرماتوگونی‌های GPR 125 و GFRA 1 مثبت جدا شده، ژن‌های GPR 125، Integrin α-6 (ITGA 6)، THY1 (CD90) و GFRA1 UCHL1 را که مارکرهایی برای سلول‌های زایا و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در جوندگان و خوک هستند، را با هم بیان می‌کردند. این امر نشان می‌دهد که سلول‌های GFRA 1 و GPR 125 مثبت در بیضه‌های انسان، از نظر فنوتیپی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هستند. پس از این مرحله، اسپرماتوگونی‌های GPR 125 مثبت انسانی، توانستند به مدت ۲ هفته با یک افزایش قابل توجه در تعداد سلول، کشت داده شوند (۵۴). در مطالعه‌ای دیگر توسط T Mirzapour و همکاران در سال ۲۰۱۲، تاثیر فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (bFGF) و فاکتور مهار کننده‌ی لوکمیا (LIF)، بر روی تکثیر و کشت کوتاه‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی، بررسی شد. در این مطالعه، جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی با استفاده از هضم آنزیمی از بیماران با توقف بلوغ، انجام شد. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم و در ۳ گروه متفاوت، کشت داده شدند. ۱-کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بدون سلول‌های سرتولی ۲-همکشتی با سلول‌های سرتولی (به عنوان گروه کنترل) ۳- همکشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سرتولی و اضافه کردن غلظت‌های متفاوتی از LIF (1000-1500-2000 unit/ml) و bFGF (0.1-1-10 ng/ml). ارزیابی کلونی‌ها هر ۱۰ روز به مدت ۵ هفته کشت، نشان داد که در گروه اول، میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها به طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها، کاهش یافته است. بیشترین تعداد کلونی‌ها در وضعیت کنترل و در روز ۳۰ام مشاهده شد. بیشترین قطر کلونی‌ها نیز به ترتیب در دوزهای ترکیبی 1ng/ml bFGF + 1500 unit/ml LIF و 10ng/ml bFGF+1200 unit/ml LIF در روز ۳۰ام تشکیل شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، برخی مارکرهای سلولی اسپرماتید مانند OCT-4، Stra8، PiwiL و Vasa را بیان می‌کردند. تکنیک‌های پیوند این گروه نیز نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، بعد از تکثیر در سیستم کشت، در لوله‌های منی‌ساز موش، به خوبی قادر به کلونی‌زایی بوده‌اند (۵۵).

در مطالعه دیگری توسط این گروه تحقیقاتی درسال ۲۰۱۲، اثرات انجماد بر روی زنده ماندن، تکثیر و تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی، در کشت آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

1- human Embryonic Fibroblast(hEF)
2- human embryonic stem cell – derived fibroblast – like cells.(hdf)
3- GDNF family receptor α1 (GFRA)
4- Anti-stage-specific embryonic antigen
5- basic Fibroblast growth factor (bFGF)
6- Leukemia inhibitory factor (LIF)

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

در این مطالعه، سلول‌های بیضه‌ای که توسط هضم آنزیمی از سلول‌های بیضه‌ای بیماران آزواسپرم به دست آمده بود، در ابتدا و ۲ هفته بعد از کشت، منجمد شدند. سپس سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده بر روی سلول‌های سرتولی تازه (گروه تجربی ۱) و سلول‌های سرتولی منجمد- ذوب شده (گروه تجربی ۲) به مدت ۳ هفته دیگر کشت داده شدند. میزان زنده ماندن بعد از هضم آنزیمی، ۹۳/۴ درصد بود. سلول‌های بیضه‌ای که بعد از ۲ هفته، منجمد ـ ذوب شده بودند، در مقایسه با سلول‌های بیضه‌ای که بلافاصله بعد از کشت، منجمد ـ ذوب شده بودند، به طور معنی‌داری دارای درصد بالاتری سلول زنده بودند. سه هفته بعد از کشت، تعداد و قطر کلونی‌های کشت داده شده بر روی سلول‌های سرتولی تازه در گروه تجربی ۱، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل و گروه تجربی ۲ بود. نتایج این مطالعه، پیشنهاد می‌کند که تکنیک انجماد، احتمال نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را برای افرادی که بیماری‌های مرتبط با سرطان دارند و در انتظار شیمی درمانی و یا پرتودرمانی هستند، افزایش می‌دهد (۵۶).

در مطالعه‌ی اخیر توسط Koruji M و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثرات آزمایشگاهی لامینین و فاکتورهای رشد بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغ انسانی به دست آمده از بیماران آزواسپرم غیرانسدادی بررسی شد. در این تحقیق، سلول‌های اسپرماتوگونی با ترکیبی از GDNF و EGF، bFGF و LIF، در حضور یا غیاب ظرف‌های پوشیده از لامینین جفتی انسان، تحت تیمار قرار گرفتند. در طول مدت کشت، ارزیابی کلونی انجام شد. حضور اسپرماتوگونیال به وسیله مطالعه فراساختاری کلونی های سلول، PCR-RT برای مارکرهای اسپرماتوگونیال و Xeno transplantation به بیضه موش گیرنده تحت تیمار با بوسولفان، مشخص شد. نتایج نشان داد که اضافه کردن LIF و bFGF،EGF و GDNF بر روی ظرف‌های پوشیده با لامینین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری تشکیل کلاستر سلول اسپرماتوگونیال را افزایش می‌دهد. به علاوه، بیان مارکرهای اسپرماتوگونیال نظیر DAZL، PLZF، VASA، ITGB1، ITGA6 و مارکر پرتوانی OCT4، در تمام مدت کشت، حفظ شده بود. آزمایش پیوند نیز حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در میان سلول‌های کشت شده نشان داد. همچنین، مطالعات میکروسکوپی گذاره TEM، حضور سلول‌های اسپرماتوگونی با مورفولوژی معمولی را در میان سلول‌های کلونی، تایید کرد (۵۷).

جدول ۱ـ کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی در محیط کشت

سال	نویسنده	روش کار	نتیجه
۲۰۰۵	Li YF و همکاران (۴۸)	هم‌کشتی سلول‌های $\alpha6^{+}$ YHT-1 $^{+}$ckit $^{-}$ با سلول‌های سرتولی	بقا و تکثیر طولانی مدت ۳ ماهه سلول‌های جداسازی شده
۲۰۰۸	Gu XH و همکاران (۴۹)	افزودن فاکتورهای رشد LIF، SCF و bFGF	افزایش زمان بقا و سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی
۲۰۰۸	Wang YB و همکاران (۵۰)	کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی لایه‌ی تغذیه کننده‌ی فیبروبلاست جنینی انسان (hEFs)	بقا سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، تشکیل کلونی‌های Oct –4 و SSEA–1 مثبت با فعالیت آلکالین فسفاتازی قوی و بیان بالایی از ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی
۲۰۰۹	B g Chen و همکاران (۵۱)	کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی لایه‌ی تغذیه‌کننده‌ی شبه‌فیبروبلاستی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی انسان در حضور GDNF	بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حداقل به مدت ۲ ماه، بیان سطح بالایی از فعالیت آلکالین فسفاتازی، CD49f OCT-4 و SSEA 1، بیان میزان بالایی از ژن‌های مرتبط با حالت پرتوانی نظیر OCT-4 و ژن‌های مرتبط با سلول‌های زایا نظیر SOX 3 و STRA 8
۲۰۱۰	Lim JJ و همکاران (۵۲)	کشت خود به خودی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیماران آزواسپرم انسدادی و غیرانسدادی	حفظ ویژگی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به مدت بیش از ۱۲ پاساژ (بیش از ۶ ماه)، افزایش بیش از ۸۰ درصدی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی integrin α-6 و GFR α1 مثبت در پاساژ ۸
۲۰۱۱	Liu S و همکاران (۵۳)	هم‌کشتی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی	تشکیل کلونی‌های پایدار OCT-4 برای مدت طولانی
۲۰۱۲	He Z و همکاران (۵۴)	جداسازی و کشت اسپرماتوگونی‌های GPR 125 و GFRA 1 مثبت بیضه‌های بالغ انسانی	بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نظیر GPR 125، Integrin α-6، THY1 (CD90) و AFRP1 UCHL1، افزایش قابل توجه تعداد سلول‌های $GPR125^{+}$ کشت داده شده

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

۲۰۰۵	Mirzapour T و همکاران (۵۵)	هم کشتی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بیماران دارای توقف بلوغ با سلول های سرتولی و در حضور فاکتورهای رشد LIF و bFGF	تشکیل بیشترین تعداد کلونی‌ها در وضعیت کنترل در روز ۳۰ام کشت و بیشترین قطر کلونی‌ها در دوزهای ترکیبی 1ng/ml bFGF +1500 unit/ml LIF و 1ng/ml bFGF + 1200 unit/ml LIF، بیان برخی مارکرهای سلولی اسپرماتید مانند vasa، piwi1 و Stra8 توسط سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و کلونی‌زایی موفق این سلول‌ها بعد از تکثیر در سیستم کشت در لوله‌های منی‌ساز موش
۲۰۰۸	Mirzapour T و همکاران (۵۶)	انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده توسط هضم آنزیمی از بیضه‌ی بیماران آزواسپرم در ابتدا و ۲ هفته بعد از کشت و سپس کشت سلول‌های منجمد ـ ذوب شده بر روی سلول‌های سرتولی تازه (گروه تجربی ۱) و سلول‌های سرتولی منجمد ـ ذوب شده (گروه تجربی ۲) به مدت ۳ هفته‌ی دیگر	وجود درصد بالاتری از سلول زنده سلول‌های بیضه‌ای که بعد از ۲ هفته منجمد ـ ذوب شده بودند، در مقایسه با سلول‌های بیضه‌ای که بلافاصله بعد از کشت، منجمد ـ ذوب شده بودند، افزایش تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه تجربی یک، ۳ هفته بعد از کشت
۲۰۰۸	Koruji M و همکاران (۵۷)	کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده از بیماران آزواسپرم غیرانسدادی در حضور یا غیاب ظرف‌های پوشیده از لامینین جفتی انسان و در حضور ترکیبی از فاکتورهای رشد GDNF و bFGF، EGF، LIF	افزایش معنی‌دار تشکیل کلاستر سلول اسپرماتوگونیال در شرایط اضافه کردن فاکتورهای رشد بر روی ظرف‌های پوشیده با لامینین، بیان مارکرهای اسپرماتوگونیال نظیر ITGA6، VASA، DAZL، PLZF و ITGB1 در تمام مدت کشت، حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در میان سلول‌های کشت شده پس از پیوند

نتیجه گیری

اسپرماتوژنز توسط فاکتورهای اندوکرین و فاکتورهای رشد اتوکرین/ پاراکرین بیضه‌ای تنظیم می‌شود. این فاکتورها توسط سلول‌های سرتولی، سلول‌های زایا، سلول‌های اطراف توبولی و سلول‌های بینابینی (عمدتا سلول‌های لایدیگ و ماکروفاژها) تولید می‌شوند. تعامل و نسبت بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا در لوله‌های منی‌ساز، باعث اسپرماتوژنز موفق می‌شود. به منظور کشت آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، محققان سعی در غلبه بر برخی موانع از جمله تعداد کم سلول‌های بنیادی در بیضه‌ها، فقدان مارکرهای ویژه‌ی شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و مشکلات زنده نگه داشتن این سلول‌ها در محیط کشت دارند. اخیرا تعدادی از فاکتورهای مهم رشد نظیر LIF، SCF و GDNF برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، شناسایی شده‌اند. همچنین مارکرهایی برای شناسایی این سلول‌ها گزارش شده است. گروه‌های تحقیقاتی متعددی نیز در زمینه‌ی کشت طولانی مدت و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موفقیت‌هایی را به دست آورده‌اند. بنابراین، کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، علاوه بر کمک به درک مکانیسم‌های مولکولی خودتجدیدی، یک ابزار مناسب برای کشف راه‌های درمانی جدید برای برخی از مردان نابارور یا برای بیماران تحت شیمی درمانی/ رادیوتراپی، قبل یا بعد از بلوغ است (۵۸).

References

1. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl. 2000; 21(6):776–798.
2. Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long term culture and transplantation of murine Testicular germ cells. J Androl. 2003;24(5):661-9.
3. Kanatso shinohara M, Takehashi M, Takashima S , Lee J , Morimoto H , Chuma S , et al. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germ line niche depends on beta-integrin. Cell Stem Cell. 2008;3(5); 533-42.
4. Mohamadi SM, Movahedin M, Koruji SM, Jafarabadi MA, Makoolati Z.Comparison of colony formation in adult mouse spermatogonial stem cells developed in Sertoli and STO co culture systems. Andrologia. 2012;44(suppl.1):431-7.
5. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011;47(5-6):391-8.
6. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Haron AW, Makoolati Z, Nowroozi MR. Effect of donor cells concentration on colonization of human spermatogonial stem cells in recipient mouse testes. J Biol Sci. 2010;10:730-738.
7. Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying gene important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival.PNAS.2006; 103(25): 9524-9.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

8. Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365(1546):1663-78.
9. Clermont Y. the cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat. 1963; 112: 35- 51.
10. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. Fertil Steril. 1966; 17(6): 705 – 721.
11. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. Am J Anat. 1966; 118(2):509–524.
12. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 1972; 52(1):198–236.
13. Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-Reviers MT, Holstein AF. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. Andrologia. 1975; 7(2):141–163.
14. Johnson L. A new approach to study the architectural arrangement of spermatogenic stages revealed little evidence of a partial wave along the length of human seminiferous tubules. J Androl. 1994; 15(5):435–441.
15. Johnson L, Neaves WB, Barnard JJ, Keillor GE, Brown SW, Yanagimachi R. A comparative morphological study of human germ cells in vitro or in situ within seminiferous tubules. Biol Reprod. 1999;61(4):927–934.
16. Johnson L, Staub C, Neaves WB, Yanagimachi R. Live human germ cells in the context of their spermatogenic stages. Hum Reprod. 2001;16(8):1575–1582.
17. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. Hum Reprod Update. 2006;12(3):275–282.
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. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. Biol Reprod. 2010;82(2):363–372.
20. Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Chomez P, et al. MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. Cancer. 2001;92(11):2778–2785.
21. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. Int J Cancer. 2000;85(4):460–465.
22. Yakirevich E, Sabo E, Dirnfeld M, Sova Y, Spagnoli GC, Resnick MB. Morphometrical quantification of spermatogonial germ cells with the 57B anti-MAGE- A4 antibody in the evaluation of testicular biopsies for azoospermia. Appl Immuno- histochem Mol Morphol. 2003;11(1):37–44.
23. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. Biol Reprod. 2004;71(6):2012–2021.
24. Pauls K, Schorle H, Jeske W, Brehm R, Steger K, Wernert N, et al. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. Hum Reprod.2006; 21(2):397–404.
25. Hudolin T, Kastelan Z, Derezić D, Basić-Jukić N, Cesare Spagnoli G, Juretić A, et al. Expression of MAGE-A1, MAGE-A3/4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in fetal testis. Acta Dermatovenerol Croat. 2009;17(2):103–107.
26. Von Kopylow K, Kirchhoff C, Jezek D, Schulze W, Feig C, Primig M, et al. Screening for biomarkers of spermatogonia within the human testis: a whole genome approach. Hum Reprod. 2010;25(5):1104–1112.
27. Juul A, Aksglaede L, Lund AM, Duno M, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E. Preserved fertility in a non-mosaic Klinefelter patient with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene: case report. Hum Reprod. 2007;22(7):1907–1911.
28. Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, et al. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. EMBO J. 1998;17(7):2019–2032.
29. Fukushima A, Okuda A, Nishimoto M, Seki N, Hori TA, Muramatsu M. Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity. J Biol Chem. 1998;273(40):25840–25849.
30. Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. Stem Cells. 2004;22(1):51–64.
31. Nishimoto M, Miyagi S, Yamagishi T, Sakaguchi T, Niwa H, Muramatsu M, et al. Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus. Mol Cell Biol. 2005;25(12):5084–5094.
32. Kristensen DM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Graem N, Jacobsen GK, Rajpert-De Meyts E, et al. Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms. Hum Reprod. 2008;23(4):775–782.
33. Wang P, Li J, Allan RW, Guo CC, Peng Y, Cao D. Expression of UTF1 in primary and metastatic testicular germ cell tumors. Am J Clin Pathol. 2010;134(4):604–612.
34. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. Cancer Res. 2003;63(9):2244–2250.
35. Perrett RM, Turnpenny L, Eckert JJ, O'Shea M, Sonne SB, Cameron IT, et al. The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. Biol Reprod. 2008;78(5):852–858.
36. de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, Boer M, et al. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. J Pathol. 2008;215(1):21–30.
37. Bartkova J, Falck J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. Oncogene. 2001;20(41):5897–5902.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019

38. Kang JL, Meyts ER, Skakkebaek NE. Immunoreactive neuron-specific enolase (NSE) is expressed in testicular carcinoma-in-situ. J Pathol. 1996;178(2):161–165.
39. Xu EY, Moore FL, Pera RA. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. Proc Natl Acad Sci U S. 2001; 98(13):7414–7419.
40. Reijo RA, Dorfman DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke H, et al. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. Biol Reprod. 2000;63(5):1490–1496.
41. Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. Genes Dev. 2000; 14(20):2587–2595.
42. Pask AJ, Behringer RR, Renfree MB. Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis--from marsupials to mice. Cytogenet Genome Res. 2003; 101(3-4):229–236.
43. Looijenga LH, Hersmus R, Gillis AJ, Pfundt R, Stoop HJ, van Gurp RJ, et al. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. Cancer Res. 2006; 66(1):290–302.
44. Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type spermatogonia from prepubertal rat testis. J Androl.1996;17(6):708-717.
45. Izadyar F, Ouden KD, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. Biol Reprod. 2003; 68(1): 272-278.
46. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue cell. Tissue Cell.1998;30(4):389-97.
47. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in-vitro. Biol Repro. Biol Reprod. 2003;68(6):2207-14.
48. Li YF, Guo YL, Li XH, Jim FS, Sun ZY. Long term survival of human spermatogonial stem cells in vitro and its functional identification.Zhonghua Nan Ke Xue. 2005;11(12):886-90.
49. GU XH, Lin Y, Wang YL, Zheng LW. Growth factors promote the proliferation and survival of human spermatogonial stem cells in vitro. Zhonghua Nan Ke Xue. 2008;14(10):876-8.
50. Wang YB, Chen B, Wang YC, Zhang ZL, Wang HX, Lu YN, et al.The feeder layer of human embryonic fibroblasts , supports the growth of human spermatogonial stem cells. Zhonghua Nan Ke Xue. 2008;14(12):1063-8.
51. Chen B, Wang YB, Zhang ZL, Xia XL, Wang HX , Ziang QZ, et al.Xeno-free culture of human spermatogonial stem cells supported by human embryonic stem cells –derived fibroblast-like cells. Asian J Androl.2009;11(5):557-65.
52. Lim JJ, Sung SY, Kim HJ, Song SH, Hong JY, Yoon TK, et al. Long term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstractive azoospermia under exogeneous feeder- free culture condition. Cell Prolif. 2010;43(4):405-17.
53. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. Reprod Biol Endocrinol. 2011 ;9:141. doi:10.1186/1477-7827-9-141
54. He Z, Kokkinaka M, Jiang J, Zeng W, Dobrinski L, Dym M. Isolation of human male germ-line stem cells using enzymatic digestion and magnetic – activated cell sorting. Methods Mol Biol. 2012;825:45-57.
55. Mirzapour T, Movahedian M, Teng ku lbrahim TA , Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, et al. Effect of basic fibroblast growth factor and leukemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. Andrologia. 2012;44(suppl.1):41-55.
56. Mirzapour T, Movahedian M, Tengku Ibrahim TA, Haron AW, Nowroozi MR. Evoluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells in vitro culture. Andrologia. 2013;45(1):26-34.
57. Koruji M, Shahverdi A, Janan A, Piryaei A, Lakpour MR, Gilani Sedighi MA. Proliferation of small number of human spermatogonial stem cells obtained from azoospermic patients. J Assist Reprod Genet. 2012; 29(9):957-67.
58. Huleihel M, Abuelhija M, Lunenfeld E. In vitro culture of testicular germ cells: regulatory factors and limitations. Growth Factors. 2007;25(4):236-52.

Review Article

Assessment of Culture Condition and In Vitro Colonization Ability of Human Spermatogonial Stem Cells: A Review Article

Mahal Dashtian M[1], Makoolati Z[2*], Ghorbanian MT[1], Naghdi M[2]

1- Department of Molecular & Cellualr Biology, Faculty of Biology, Damghan University, Semnan, Iran.
2- Department of Anatomy, Medicine School, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.

Received: 25 Dec 2012 Accepted: 24 Feb 2013

Abstract

Spermatogenesis is a highly complex and regulated process in which germ stem cells differentiate into spermatozoa. These stem cells, called spermatogonial stem cells (SSCs), are in the base of seminiferous tubules and have the ability of self-renewal and differentiation into functional germ cells. Due to this ability, SSCs can restore spermatogenesis after testicular damage caused by cytotoxic materials or following transplantation into an infertile recipient. Therefore, self-renewal of these cells is critical for the preservation of SSC populations and restoration of fertility. While previous studies have shown that the SSCs of mice and other species can survive and proliferate for long periods of time, little information is available about suitable culture media for the growth of human SSCs. Identification of SSC markers allows for the isolation of these populations of cells. The isolated cell can be expanded in culture and transplanted into infertile recipients. Consequently, the recognition of markers and the establishment of long-term culture systems for human SSCs will be essential for using the potential of these cells in a clinical setting. In this article, we focus on the markers that have been identified for human SSCs and in vitro culture techniques used for human SSCs proliferation.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Colony, Self-renewal

*** Corresponding author: Makoulati Zohreh,** Department of Anatomy, Medicine School, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
Tel:+98 7312220994
Email: zohreh1438@yahoo.com

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 2:49 +0330 on Sunday October 20th 2019