شناسایی، کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی

زینب پیراور[1]، شکوه چگینی[2*]

۱. **دکتری**، بخش زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی ساختمان آیت ا... رفسنجانی، تهران، ایران

۲. **کارشناسی ارشد**، بخش زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی ساختمان آیت ا... رفسنجانی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۵)

چکیده

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells) یا SSC ها جمعیتی از سلول های بنیادی هستند که با ایجاد اسپرم در تمام طول زندگی مردان قادر به حفظ تولید مثل می باشند. در پستانداران غیر پریمات، این سلول های بنیادی به ترتیب A-single(A_s) ، A-paired(A_{pr}) و A-aligloed(A_{al}) نامیده می شوند که پیش ساز های سلول های اسپرماتوگونی‌هستند. در انسان به علت محدودیت مطالعات روی سلول های (SSC) یافته های اندکی در دسترس است. دو نوع متفاوت اسپرماتوگونی A در انسان وجود دارد A_{dark} و A_{pale}. A_{dark} به عنوان اسپرماتوگونی ذخیره و A_{pale} به عنوان اسپرماتوگونی تجدید شونده یا خود نوزا (renewing stem cell) است. تنظیم (SSC) ها، شامل بقا و انجام تقسیمات متعدد، به ریزمحیط این سلول ها در لوله های سمی نفروس بیضه بستگی دارد. سیگنال هایی که از سلول های سوماتیکی موجود در ریزمحیط بر می خیزد سرنوشت (SSC) ها را به سمت خود نوزایی یا تمایز به اسپرماتوزوآ تعیین می کند. هر چند نشانگر ها یا مارکر های بیان شونده متعددی می تواند در جداسازی و غنی سازی (SSC) ها کمک کننده باشند اما هنوز مارکر اختصاصی و ویژه این سلول ها شناخته نشده است.کشت سلول های بیضه ای همراه با سلول های تغذیه کننده (feeder cell) امکان پرورش و گسترش این سلول ها (SSC) را برای مدت طولانی مهیا کرده است و هورمون ها و فاکتورهای رشد مختلف و نقش آنها در فرایند تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

کلیدواژگان

ریزمحیط، سلول های بنیادی اسپرماتوگونی، سیستم کشت، مارکرهای ویژه SSC.

* نویسنده مسئول، رایانامه: shokouhchegini@yahoo.com

مقدمه

اسپرماتوژنز فرایند تولید اسپرم در لوله های سمی نفروس است که در زمان بلوغ آغاز می شود (۱۳-۱۰ سال بعد از تولد در انسان و ۷-۵ روز درجوندگان) و در تمام طول زندگی فرد ادامه دارد. لوله های سمی نفروس به وسیله سلول های میوئید احاطه شده اند که با برهم کنش فیبر های اکتین موجود در آنها و انقباض سلول به حرکت اسپرم های تولید شده در طول این لوله ها کمک می کنند. سلول های سرتولی در داخل این لوله ها روی غشاء پایه قرار گرفته و ارتفاع آنها تا لومن لوله های سمی نفروس گسترده شده است. این سلول ها نقش تنظیمی و حمایتی در تکوین سلول های زاینده دارند به طوریکه با ترشح فاکتورهای رشد و فاکتور هایی مانند لاکتات و پیرووات، مواد مورد نیاز متابولیسم سلول های زایا را تأمین می کنند(۱-۳). بافت بینابینی لوله های سمی نفروس شامل رگهای خونی و لنفی، ماکروفاژها و سلول های لیدیگ است که وظیفه ترشح هورمون جنسی نر یا تستوسترون را بر عهده دارند. فرآیند اسپرماتوژنز با تقسیمات پیاپی میتوزی از یک سلول اسپرماتوگونی روی غشاء پایه لوله های اسپرم ساز، آغاز می شود. در آخرین تقسیم میتوزی سلول های اسپرماتوسیت تولید شده وارد فازS چرخه سلولی شده و به دنبال آن پروفاز طولانی اولین تقسیم میوزی آغاز می شود و با پایان تقسیم میوزی دوم اسپرماتیدهای هاپلوئید تولید می شوند. شکل اسپرماتیدها گرد است اما طی فرایند اسپرمیوژنز کشیده و دوکی شکل شده و در لومن لوله های سمی نفروس آزاد می شوند و با حرکت تاژک خود و انقباض دیواره لوله ها در طول آن حرکت می کنند(۴). سلول های بنیادی، پایه اسپرماتوژنز هستند به طوریکه از یک طرف با تقسیمات خودنوزایی جمعیت خود راحفظ کرده و از طرف دیگر به پیشسازهای اسپرماتوگونی ها تمایز می یابند. این ظرفیت دوگانه سلول های بنیادی اسپرماتوگونی(SSC) یک عامل اطمینان برای توانایی طولانی مدت بیضه در تولید اسپرماتوزوا است. روند پویای تولید اسپرم اولین بار در جوندگان تفسیر شد(۵). Brinster و Zimmerman در سال۱۹۹۴ نشان دادند که حضور جمعیتی از سلول های بنیادی مسئول تولید مداوم اسپرم در بیضه ها هستند. این دو دانشمند توانستند برای اولین بار پیوند سلول های(SSC) را درموش نابارور انجام داده و روند اسپرماتوژنز را در موش گیرنده مشاهده کنند(۶). پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و حفظ باروری در جوندگان، بیانگر ظرفیت درمانی این روش در انسان است. در این مقاله مروری، بیولوژی کشت و ویژگی های اختصاصی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انسان در مقایسه با سایر پستانداران مطالعه شده را مورد بررسی قرار می دهیم.

تفاوت های بین سلول های بنیادی اسپرماتوگونی پستانداران

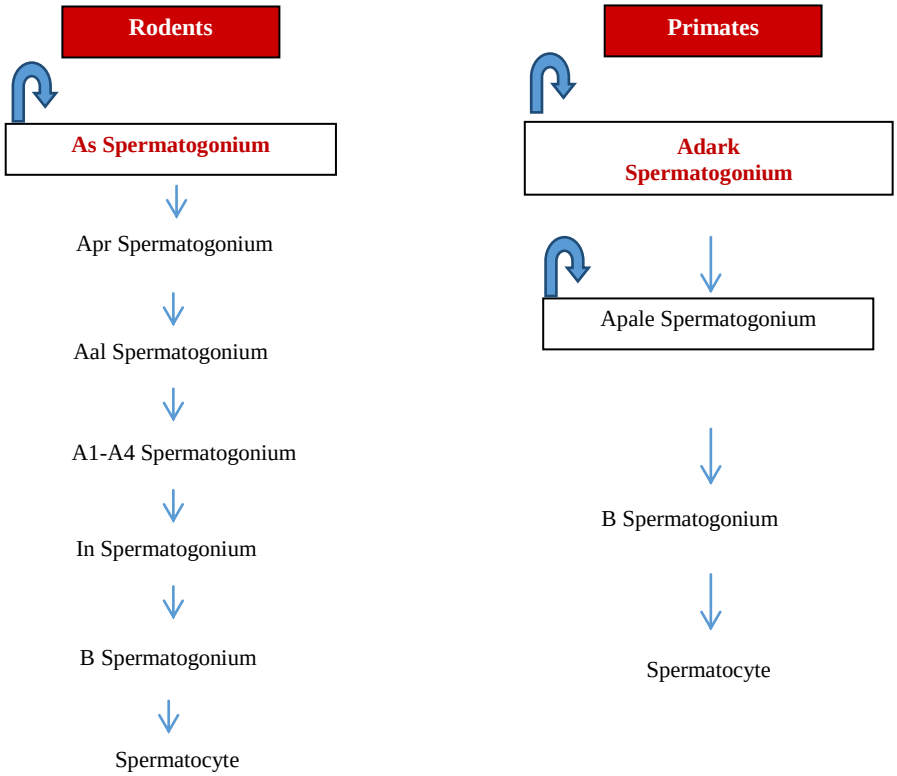
سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در بین گونه های پستانداران از هر لحاظ نوع، تعداد و درجه تمایزیافتگی متفاوت است. انواع رده های اسپرماتوگونی در جوندگان در مقایسه با انسان بیشتر است. مطالعات اولیه روی جوندگان نشان داد دو جمعیت سلول های بنیادی (A0) سلول های بنیادی ذخیره و (A1-4) سلول های بنیادی تجدید شونده، وجود دارند (۸،۷). اسپرماتوگونی نوع A4 پس از تقسیم شدن اسپرماتوگونی تمایز یافته تری به نام اسپرماتوگونی بینابینی (intermediate) را ایجاد می کند. این سلول همچنین می تواند سلول های بنیادی نوع A1 را نیز تولید کند.

در یک تقسیم بندی دیگری، سلول های اسپرماتوگونی جوندگان به A_s(single) به عنوان سلول بنیادی اسپرماتوژنز(۹،۶،۱) تقسیم می شود که در یک تقسیم متقارن از یک طرف یک A_s جدید و یا یک

اسپرماتوگونی A تمایز یافته به نام Apaired(A_{pr}) ایجاد می کند که به وسیله یک پل سیتوپلاسمی به سلول اولیه متصل می ماند (۸،۱۰). A_{pr} تقسیم می شود و یک زنجیره ۴، ۸، ۱۶ و گاهی۳۲ سلولی از اسپرماتوگونی Aaligned(A_{al}) ایجاد می کند. A_{al} فرم اسپرماتوگونیA1 تا A4 را ایجاد کرده و به دنبال آن A بینابینی (In) A و در نهایت اسپرماتوگونی B اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه و نهایتا اسپرماتید ایجاد می شود.

در مقابل در رابطه با مکانیزم خودنوزایی و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی اطلاعات کمی در دسترس است.

Clermont در سال ۱۹۶۳ برای اولین بار در پستانداران دو نوع اسپرماتوگونی را معرفی کرد. A_{dark} به عنوان سلول بنیادی ذخیره در حالی که A_{pale} سلول بنیادی تجدید شونده (خود نوزا)هستند (۷،۱۱). طبق این تعریف سلول بنیادی A_{pale} یا تجدید شونده می تواند تقسیم شود و فرم اسپرماتوگونی B و اسپرماتوسیت را ایجاد کند. این تقسیم بندی اسپرماتوگونی انسانی امروز به وسیله بسیاری از محققین پذیرفته شده است. بنابراین این طور پیشنهاد می شود که سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی یک زیر مجموعه از اسپرماتوگونی های A_{pale} و A_{dark} است(۱۲) (شکل ۱).



شکل ۱- تقسیمات سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در پریماتها و غیر پریماتها

شناسایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی

از زمانی که تکنیک پیوند سلول های بنیادی اسپرماتوگونی مطرح شد، مارکر ها و ویژگی های جدید این سلول ها برای جداسازی جمعیت آنها از سایر سلول های بیضه ای و پرورش و تکثیر آنها در محیط

کشت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. با این حال، هنوز مارکر اختصاصی سلول های(SSC) شناسایی نشده است. آنالیز سلول ها در بافت بیضه نشان می دهد نشانگر های (ZBTB16) PLZF، GFRA1، CDH1، NGN3(NEUROG3) و POU5F1(OCT3/4) به وسیله سلول های تمایز یافته و پیش سازهای اسپرماتوگونی موش بیان می شود(۱۳،۱۰-۱۵).

اسپرماتوگونی های انسانی و پیشسازهای آنها از نظر فنوتیپی شبیه اسپرماتوگونی های موش، خوک، و میمون هستند. زیرا طبق مطالعات انجام شده، سلول های اسپرماتوگونی انسانی نیز مارکرهایی مانند GPR125، THY-1، GFR-A1، ITGA6 و PLZF که مارکرهای SSC به خصوص در جوندگان است بیان می کنند(۱۶،۱۳-۲۱). مطالعات اخیر نشان داده که THY-1و GFRA1 درSSC های میمون نیز بیان می شود(۲۲). بنابراین از این دو مارکر سطحی شاید بتوان برای جداسازی SSC های انسانی نیز استفاده کرد (جدول ۱).

جدول ۱- مارکرهای سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در پستانداران پریمات و غیر پریمات

Positive markers	rodents	Non-rodentd	Primates (Human)
α6-Integrin	+		+
B1-Integrin	+		
Thy-1 (CD90)	+	+	?
GFRα1	+	+	+
C-kit	- +		-
CD24	+		
UCHL1		+	?+
GPR125	+		+
PLZF	+		+
Oct4	+	+	+
CD9	+		-
DAZl	+	+	?-
VASA	+	+?	?-

-? و + ? : نتایج قطعی بدست نیامده است.

در مطالعه ای که قبلا انجام داده ایم(۷۱،۳۶،۳۵) توانستیم GPR125 را در غشاء پلاسمایی زیر جمعیتی از اسپرماتوگونی های انسانی که در نزدیکی غشاء پایه لوله های سمی نفروس واقع شده اند، شناسایی کنیم. علی رغم اینکه این مارکر سطحی در موش به طور گسترده ای بیان می شود (درSSC ها و همه انواع سلول های اسپرماتوژنیک از جمله نوع A ، بینابینی و نوع B) (۲۴،۲۳)، در این مطالعه نشان دادیم فراوانی سلول هایی که GPR-125 مثبت هستند در انسان در هر مقطع عرضی لوله های سمی نفروس ۱ تا ۲ سلول است (۷۱،۳۶،۳۵).

با توجه به مطالعات Clermont، نتایج ما(۷۱،۳۶،۳۵) نشان می دهدکه اسپرماتوگونی های Gpr125- positive انسان یک زیر مجموعه از A_{dark} و یا اسپرماتوگونی A_{pale} است ، و بنابراین ممکن است همان سلولهای SSC در بیضه انسان باشند. PLZF (promyelotic leukemia zinc-finger) یک فاکتور ذاتی حیاتی SSC برای خود نوزایی است. این فاکتور، مهار کننده رونویسی است که تمایز سلول های بنیادی را مهار می کند و به حفظ آن ها در ریزمحیط کمک می کند. Plzf اولین بار در سلول های بنیادی هماتوپویتیک (hematopoietic Stem cells) ، شناسایی شد. این فاکتور نیز نقش بسیار حیاتی در محور اسکلتی و الگودهی اعضا (limbal) دارد(۲۶،۲۵).

Plzf با سرکوب تمایز SSC ها برای تنظیم خود نوزایی آنها حیاتی است و مهار آن در موشهای knockout باعث تمایز SSC ها به سمت سلولهای اسپرماتوژنیک می شود. به علاوه رسپتور c-kit که در اسپرماتوگونی های تمایز یافته بیان می شود مستقیما به وسیله Plzf سرکوب می گردد . بنابراین ، Plzf برای حفظ مخزن سلولهای بنیادین اسپرماتوگونی و جلوگیری از تمایز آنها ضروری است(۲۷). در میمون های بالغ، بیان Plzf محدود به اسپرماتوگونی های A_{dark} و A_{pale} است. بنابراین می توان این طور بیان

کرد که Plzf احتمالا در اسپرماتوگونی های تمایز نیافته موش و پریمات ها از جمله انسان حفاظت شده است(۲۸).

ریز محیط (Microinvironment) سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی

بیضه پستانداران به وسیله اپی تلیوم سمی نفروس پوشیده شده است. این نوع از اپی تلیوم شامل سلول های زاینده است که تکثیر شده و به اسپرم تمایز می یابند. ریز محیط ویژه در این توبولها از مجموع سلول های سوماتیکی موجود در غشا پایه توبولها به نام سلول های سرتولی و ترکیبات تشکیل دهنده فضای بین توبولها از جمله سلولهای ترشح کننده هورمون (سلولهای لیدیگ) و سیستم عروقی ایجاد می شود. سلولهای سرتولی با ترشح فاکتورهای رشد و مولکول های چسبنده غشا پایه مانند لامینین، به تکمیل این نیچ کمک می کنند(۲۹). سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در حاشیه اپی تلیوم لوله های سمی نفروس در تماس با غشا پایه و سلول های سرتولی قرار گرفته اند. درحالیکه مطالعات بسیاری اهمیت نقش ریز محیط را در بیولوژی سلول های بنیادی نشان داده اند، با این حال شناخت ما در مورد فاکتورهایی که روند خود نوزایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را در پستانداران بویژه انسان و تاثیر بر رفتار این سلولها کنترل می کنند بسیار اندک است.

کشت و جداسازی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی

تلاشهای اولیه در جداسازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی با جداسازی اسپرماتوگونی A (حاوی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی) با کمک هضم آنزیمی بافت بیضه آغاز گردید. در این رابطه روشها و تکنیکها مختلفی مورد استفاده قرار گرفت از جمله استفاده از مدلهای حیوانی نابالغ (۳۰،۳۱)، کریپتورکید (۳۲) و نمونه های با کمبود ویتامین A (۳۳) بوده که با کمک سانتریفوژ شیب غلظت (۳۴)، کشت تمایزی(differential plating) (۳۶)، جداسازی بر اساس فلورسانس یا FACS (Sorting Fluorescent-Activated Cell) (۳۷)، جدا سازی با کمک مغناطیس یا MACS (magnetic-activated cell sorting) انجام می گرفته است(۳۸).

جداسازی بر اساس مورفولوژی ساده ترین و مقرون به صرفه ترین روش است اما پایین ترین کارایی را دارد. در این روش آلودگی با انواع مختلف سلول های بیضه ای مثل سلول های سرتولی، سلول های لیدیگ، سلول های میوئید فیبروبلاست ها وجود دارد(۳۹،۴۰). این سلول ها با آزاد کردن فاکتور های رشد، هورمون ها و ماتریکس خارج سلولی در خودنوزایی و تکثیر SSC ها دخالت کنند. در روش ماتریکس خارج سلولی انتخابی از پروتئین های خارج سلولی متفاوت مانند لامینین، فیبرونکتین برای افزایش چسبندگی سلول ها به SSC ها استفاده می شود.

جمعیت SSC هایی با خلوص حداکثر را می توان با روش های جدا سازی FACS و MACS بدست آورد. در این روش ها از یکسری مارکر های متعدد استفاده می شود اما به دلیل نقص های موجود در روند استفاده و پیچیدگی تکنیکی تکثیر و زنده مانی SSC ها کاهش می یابد(۴۱،۴۲).

دستیابی به کلونی های سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی نیارمند کشت طولانی مدت و پاساژهای متعدد است. اکثر پروتکل ها با یک کشت افتراقی از سوسپانسیون سلولی اولیه برای حذف انواع دیگر سلول های بیضه شروع می شوند. این تکنیک ها سلول ها را بر اساس توانایی اتصال متفاوتشان جداسازی می کند. سپس سلول ها مستقیما در ظرف های کشت بافت یا ظرف های پوشیده شده از ماتریکس با استفاده از ژلاتین، لامینین، فیبروبلاست یا کلاژن کشت می شوند. بعد از

مدتی سلول های غیر چسبنده که حاوی SSC هستند جمع آوری می شوند(۴۲،۴۳).

Nagano و همکارانش سلول های بیضه ای موشهای نوزاد و بالغ را روی لایه تغذیه ای مانند SIM Mouse Embryo- Derived Thioguanine (STO) and Ouabain Resistant (نوعی فیبروبلاست جنینی موش) برای حداقل ۴ ماه کشت دادند و پس از پیوند این سلولها به بیضه موشهای نابارور شاهد از سر گیری اسپرماتوژنز بودند که نشان دهنده حضور سلولهای بنیادی اسپرماتوژنز در جمعیت این سلولها پس از گذشت ۴ ماه است(۳۸).

حضور لایه تغذیه ای مانند ریز محیط سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی است و با تولید فاکتورهای رشد ویژه برای تحریک خودنوزایی منجر به بقائ این سلولها می شود. این فاکتورهای رشد مانند فاکتور مشتق از سلولهای گلیالی (GDNF) ، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) یا فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF2) که به وسیله سلول های سرتولی تولید می شود، خودنوزایی و تکثیرSSC ها را در محیط کشت در دراز مدت، بهبود می بخشند(۳۶).

Kanatsu-shinohara و همکارانش سلولهای زایای نوزاد موش را با استفاده از سرم و بدون حضور لایه تغذیه ای به مدت ۵ ماه کشت داده و توانستند به کلونی های SSC دست یابند. آنها برای تایید نتایج خود کلونی های بدست آمده را به بیضه موشهای آزواسپرم پیوند زده و شاهد تولید اسپرمهای بارور بودند(۹).

در مطالعه ای که Koroji و همکاران بر کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده از بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی در حضور یا غیاب ظرف های پوشیده از لامینین جفتی انسان و در حضور ترکیبی از فاکتور های رشد GDNF، bFGF، EGF، LIF انجام دادند، افزایش معنی دار کلاستر اسپرماتوگونیال در شرایط اضافه کردن فاکتور های رشد بر روی ظروف پوشیده با لامینین، بیان مارکر های اسپرماتوگونیال نظیر TTGA6، VASA، DAZL، PLZF، TTGB1 را گزارش کردند(۴۴).

با وجود این در رابطه با مطالعه سلولهای اسپرماتوگونی انسان پیشرفت چندانی صورت نگرفته است و از دلایل آن می توان به محدودیت دستیابی به بافت بیضه نرمال و عدم وجود مارکر اختصاصی برای تشخیص SSC های انسانی اشاره کرد(۴۵). علاوه بر آن محدود بودن تقسیمات این سلولها و عدم تمایز بین سلولهای بنیادی و تمایز یافته در بیضه انسانی مطالعه این سلولها را دشوارتر کرده است(۸).

طی تحقیقاتی در آزمایشگاه کشت سلول پژوهشگاه جهاد دانشگاهی ابن سینا با دو روش کشت ما به سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی دست یافتیم. در یک روش سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بدست آمده از نمونه های بیوپسی بیضه نرمال با روش کشت تمایزی (differential plating) و روی ظروف کشت پوشیده شده با لامینین جداسازی شدند.

لامینین به عنوان ماتریکس خارج سلولی می تواند جایگزین لایه تغذیه ای سلول های سوماتیکی باشد. در این مطالعه اضافه کردن فاکتورهای رشد شامل LIF ,GDNF ,bFGF ,EGF ، سبب تسریع تکثیر و خود نوزایی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی و تشکیل کلونیهای متعدد شد(۷۱،۳۶).

همچنین لامینین به عنوان یک لایه ماتریکس خارج سلولی در غشائ پایه اپی تلیوم لوله های سمی نفروس است و بوسیله سلول های سرتولی ترشح می شود. SSC ها با بیان گیرنده های اینتگرین a_6 و اینتگرین b_1 بطور اختصاصی به لامینین متصل می شوند(۴۶).

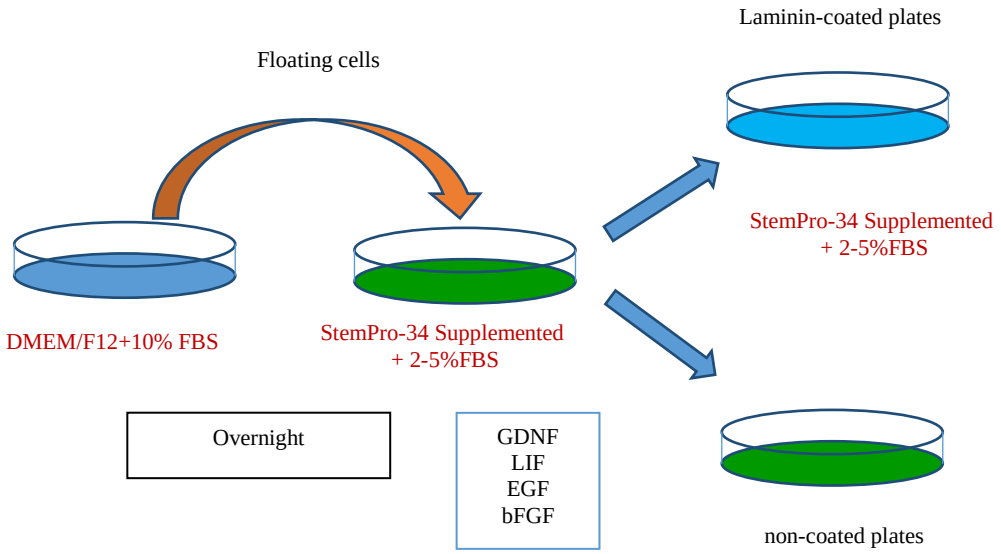
در روش دیگری سلولهای اسپرماتوگونی را از بیضه یک بیمار مرگ مغزی شده کشت داده و باقی مانده سلول های سوماتیک بیضه ای را از سوسپانسیون سلولی جدا کردیم و از آنها به عنوان سلول های لایه

تغذیه کننده جهت حمایت سلولهای SSC استفاده نمودیم. برای جلوگیری از رشد بیش از حد (over growthing) سلول های سوماتیک انسان بالغ در طول کشت، با اضافه کردن غلظت کم سرم (Fetal bovine serum) FBS (۲-۵٪) به نتایج مطلوبی دست یافتیم (شکل ۲) (۳۵).

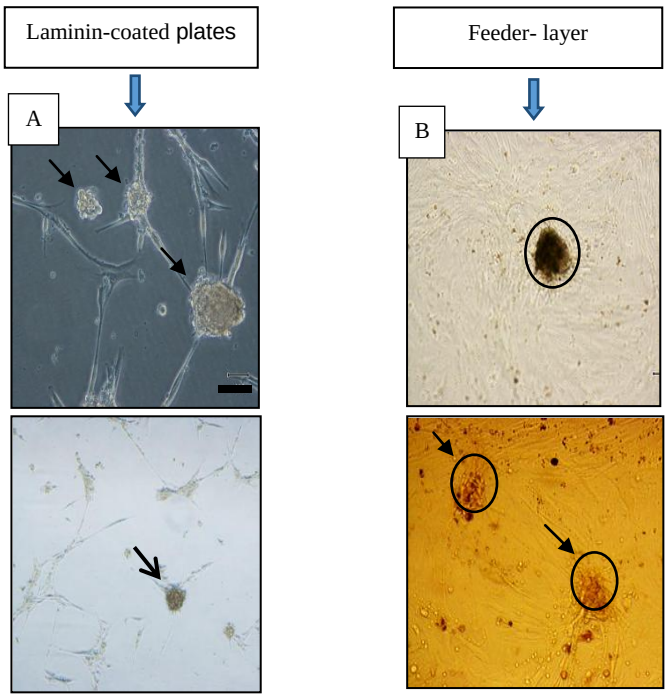
سرم و سلول های تغذیه کننده (feeder) در این سیستم های کشت ممکن است فاکتورهایی تنظیم کننده سلول های اسپرماتوگونی را داشته باشند و مواد ناشناخته ای که تمایز سلولی را تحت تاثیر قرار می دهند در سرم وجود دارد. همینطور سلول های تغذیه کننده به رغم تامین حمایت فیزیکی برای اتصال سلول های بنیادی، با تولید انواع فاکتور های ناشناخته از طریق تعاملاتشان بر سلولهای بنیادی تاثیر می گذارند. بنابراین سرم یا سلولهای تغذیه کننده در کشت، آن ها را غیر قابل کنترل می سازند(۹).

نتایج ما نشان داد که لامینین می تواند جایگزین سلول های تغذیه کننده باشد، و برای القا خودنوزایی لزوما وجود لایه تغذیه ای ضروری نیست. با مقایسه کشت SSC ها در محیط دارای سرم با کشت بدون لایه تغذیه کننده (feeder-free condition) ، مشاهده کردیم مورفولوژی SSC ها روی لامینین تغییر کرده و تمایل به انباشته شدن و تشکیل کلونی های برجسته دارند در صورتیکه به طور معمول و در حضور لایه تغذیه ای SSC ها بیشتر به صورت زنجیره ای رشد می کنند و کلونی کمتر دیده می شود. (شکل ۳). یکی از فاکتورهایی که روی شکل کلونی ها اثر می گذارد مقدار GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) است(۳۵،۳۶،۷۱).

در نتیجه با بیان بیش ازحدGDNF، SSC ها ظرفیت تمایزشان را از دست می دهند و مجبور به تشکیل کلونی توده ای میشوند. بر اساس این مشاهدات، مقدارGDNF بر مورفولوژِی کلونی ها اثر می گذارد. به عنوان مثال مقدار بالای GDNF تقسیمات خود نوزایی سلول های بنیادی را تحریک کرده و بنابراین تشکیل کلونی توده ای مشاهده می شود(۱۷).



شکل ۲- دو روش کشت سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، A : کشت تمایزی روی ظروف پوشیده شده با لامینین. B: کشت همراه با لایه تغذیه ای



شکل ۳- رشد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط in vitro . A: کلونیهای SSC در ظروف کشت شده با لامینین (فلشها) فرم های توده ای و زنجیره ای کلونی ها قابل مشاهده است. B: تشکیل کلونیها در کشت همراه با سلولهای تغذیه کننده.

اخیرا در یک مطالعه تحقیقاتی حذف مؤثر سلول‌های آلوده و کشت SSC بسیار خالص با استفاده از خالص سازی دو مرحله ای گزارش شده است به طوریکه ابتدا SSC های جمع آوری شده روی سلول های سوماتیک و سرتولی کشت می شوند و بعد از جداسازی، سلول ها توسط سانتریفیوژ در شیب غلظت سرم آلبومین گاوی (BSA) خالص می شوند.این روش قادر است بیشتر غیر SSC ها را حذف نماید و خلوص سوسپانسیون سلولی را به بیش از ۹۱/۵٪ برساند(۴۲).

اخیرا در تحقیقاتی نشان داده شده است که هم کشتی با سلول های سرتولی برای مدت بیشتری سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را در مرحله تکثیر نگه می دارد بنابراین می تواند جهت بهینه سازی محیط کشت در کلینیک مورد استفاده قرار گیرد(۴۷).

اثر GDNF بر بقای SSCs

جمعیت سلول های بنیادی در ریز محیط های اختصاصی ایجاد و نگهداری می شوند. تحقیقات اخیر در مورد مگس سرکه مکانیسم مولکولی تعاملات ریزمحیط سلول های بنیادی در بافت بیضه را نشان داده است(۴۸،۴۹).

بقای مجموعه سلول های بنیادی به عوامل درونی که توسط سیگنال های خارجی تنظیم می شوند، بستگی دارد(۲). بنابراین ریز محیط نقش مهمی را در تمایز یا عدم تمایز سلول بنیادی ایفا کرده و شامل برهمکنشهای پیچیده میان سلول های بنیادی ،دودمان تمایز یافته آنها، سلول های سوماتیک و ماتریکس خارج سلولی است(۵۰).

شناخت GDNF به عنوان فاکتور تغذیه ای ترشح شده از سلولهای گلیالی مغز درک عملکرد ریزمحیط را آسان تر کرد. این فاکتور که از اعضای ابر خانواده TGFβ شناخته شده است در تمایز نورونهای دوپامینرژیک مغز جنین نقش دارد(۱۶،۵۴). بیان این فاکتور همچنین در دیگر اندام های در حال تکوین

شامل تخمدان و بیضه اثبات شده است(۵۰-۵۳). در بیضه این فاکتور پاراکراین ترشح شده توسط سلول های سرتولی بعد از تولد مسئول حفظ و خودنوزایی SSC ها در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی است(۲،۳،۱۷). عوامل رشد دیگر، مثلا فاکتور بنیادی رشد فیبروبلاستی (bFgf یا Fgf2) و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) نیز برای تکثیر SSC ها لازم است(۳).

با این حال این عوامل به نظر نمی رسد که برای خودنوزایی این سلولها در داخل بدن کافی باشند. Simon و همکاران اخیرا این فریضه را با نشان دادن تاثیر FSH بر افزایش بیان GDNF در رده سلولی سرتولی (TM_4) ، تایید کردند(۵۵). علاوه بر این، تولید GDNF توسط سلول های سرتولی به عواملی مانند Fgf_2 ، فاکتور نکروز کننده تومور α (TNFα) و اینترلوکین ۱β (IL - ۱β) در شرایط آزمایشگاهی بستگی دارد(۵۵). بنابراین تولید GDNF و تاثیر بر خودنوزایی SSC ها بوسیله عوامل مختلفی کنترل می شود(۱۷).

GDNF به یک رسپتور پیچیده در سطح سلول متصل می شود. این فاکتور با اتصال به گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) که بخش خارج سلولی رسپتور GDNF یا GFRα-1 و رسپتور تیروزین کینازی RET که در عرض غشائ سلول است، متصل می شود. ازطریق این اتصال، GDNF چندین مسیر سیگنالینگ درسلول های پاسخگو را فعال می کند(۵۶). فقدان GDNF در موشهای نوزاد ، به علت اختلال در بخش های کلیه و سیستم عصبی باعث مرگ آنها می شود. فقدان رسپتور GDNF نیز نتایج مشابهی در پی داشته است. علاوه بر آن GDNF، Ret و Gfrα-۱ نقش مهم و حیاتی در بقای SSC ها دارند. ناباروری یا رشد تومورهای بیضه ای از جمله Seminoma در بزرگسالی، با بیان بالای GDNF همراه است و به دنبال آن افزایش اسپرماتوگونی های تمایز نیافته در تومورهای سمی نفروس را به دنبال دارد(۵۷).

جداسازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بدلیل تعداد محدود و عدم شناسایی مارکرهای سطحی مخصوص این سلولها بسیار دشوار است. در مطالعات مختلفی که روی این سلولها انجام گرفته در شرایط کشت برای مدت طولانی روی لایه های تغذیه کننده درحضور GDNF و دیگر فاکتورهای رشد مثل EGF، Fgf و محلول رسپتور Gfrα-۱، قابل نگهداری و تکثیر بودند(۳،۹،۵۸).

برای ارزیابی توانایی بقا و خودنوزایی SSC ها، این سلولها پس از یک دوره کشت ۳ تا۶ ماهه، به بیضه موشهای نابارور پیوند زده شده و از سر گیری اسپرماتوژنز و ایجاد اسپرم بارور مشاهده گردید. در این مطالعات توانایی حفظ SSC ها برای خود نوزایی در شرایط کشت آزمایشگاهی نقش تعیین کننده GDNF به عنوان عامل موثر در این فرایند، ثابت شد. رسپتور عملکردی GDNF، Ret تیروزین کنیاز، در اصل به وسیله Takahashi و همکارانش کشف شد. آنها با استفاده از کشت کوتاه یا طولانی مدت بدون سرم (Serum-free) SSC های بافت بیضه انسان، برخی از مسیر های القا شده توسط GDNF را مشخص کردند(۳۶).

Gfrα-۱ و Ret در سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می شوند. با فعال شدن Ret یک مسیر سیگنالینگ از طریق کنیازهای خانواده Src در سلول آغاز می شود که نقش مهمی در تکثیر SSC دارد. GDNF رسپتور RET را فعال میکند. این رسپتور به صورت پروتئین اینتگرال (عرض غشائی) بوده و دارای ویژگی تیروزین کنیازی است، به این معنی که تیروزین های بخش داخل سلولی رسپتور ، اتوفسفریله می شود. مسیرسیگنال دهی دیگری که توسط GDNF در SSCs ،فعال می شود، Ras است(۵۹). با فعال شدن Ret یک آبشار پروتئینی فعال شده در نهایت منجر به فسفریلاسیون و فعال سازی عوامل رونویسی و افزایش بیان ژن cyclin A می شود.

cyclinA یک پروتئین کلیدی تنظیم کننده است که در کنترل فاز S چرخه سلولی در سلول های پستانداران نقش دارد. علاوه بر این cyclin های تیپ A عمدتا در روند اسپرماتوژنز بیان می شوند(۶۰). سیکلین A_1 به شدت در پاکی تن (pachytene) اسپرماتوسیتها بیان شده و برای میوز مورد نیاز است، و cyclin A_2 عمدتا در اسپرماتوگونی تیپ A محتوی SSC حضور دارد(۶۰). به علاوه BCL6B ، ETV5، ID4، LHX1، POU3F1 از عوامل رونویسی القاکننده GDNF هستند (۶۴)

فاکتورها و مسیرهای سیگنالینگ تنظیم کننده SSC ها

سلول های سرتولی تنها نوع سلول های سوماتیک در توبول ها هستند که مستقیما در تعامل با SSC ها برای کنترل تکثیر و تمایز از طریق ترشح فاکتور های خاصی اند. فاکتور های رشد سلول سرتولی مثل فاکتور نوروتروپیک مشتق شده سل لاین گلیال (GDNF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ (FGF 2)، همچنین فاکتور های رونویسی سلول سرتولی مثل ETS نوع ۵ (ERM، شناخته شده به عنوان ETV5)، nociception، neuregulin1 (NRG1)، رسپتور آندروژن (AR) به عنوان مهمترین فاکتور های تنظیم کننده up stream شناسایی شده اند که خودنوزایی و میوز اسپرماتوسیتها را تنظیم می کنند.سایر فاکتور های رونویسی و مسیر های سیگنالینگ مانند GDNF–RET–GFRA1 signaling،FGF2–MAP2K1 signaling ، CXCL12–CXCR4 signaling، CCL9–CCR1 signaling، FSH–retinoic acid/FSH–،nociceptin/OPRL1 NRG/ERBB4 و AR/RB–ARID4A/ARID4B شناسایی و معرفی شده اند(۶۱).

تحقیقات جدید نقش تستسترون را در تنظیم بیان GDNF در سلولهای میوئید اطراف توبولهای سمی نفروس (Peritubular Myoid) و تاثیر روی ریز محیط و حفظ SSC ها نشان می دهند(۶۲).

در تنظیم منفی خود نوزایی SSC ها به عواملی مانند F-box و WD – 40 domain protein 7 (FBXW7) می توان اشاره کرد(۶۳). (Csf 1) Colony-stimulating factor1 به عنوان یک محرک خارجی خود نوزایی SSC ها شناسایی شده است که با تاثیر در سلول های لیدیگ و میوئید، سلول های بنیادی بیضه در پستانداران را تحت تاثیر قرار می دهد(۶۵).

روش های ارزیابی عملکرد SSC

توانایی ترمیم، انجماد، کشت و پیوند سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی رویکردهای جدیدی را برای درک بیولوژی این سلول های مهم در برداشته است. همچنین در جهت کاربردهای آزمایشگاهی و پزشکی فرصتهای مهمی در اختیار قرار می دهد. پیوند سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی به لوله های منی سازموشهای نابارور و و تکثیر این سلولها و ایجاد جمعیت اسپرماتوژنیک، روشی کاربردی بود که توسط Brinster در اواسط دهه نود ارائه شده است(۶،۶۶).

در این روش مجموعه ای از سلولهای بیضه ای با فرض حضور SSC ها، به شبکه بیضه موشها تزریق شد و اسپرماتوژنز در این لوله ها با تولید اسپرم از سر گرفته شد. با افزایش تعداد SSC ها در محیط کشت امکان مطالعه در زمینه های مختلف ژنتیکی و سلولی و مولکولی فراهم می شود. با دستکاری های ژنتیکی در رده سلولهای زایا، مانند آنچه در مورد سایر سلولهای بنیادی و یا سلولهای جنینی انجام می گرفته، اطلاعات زیادی در مورد این سلولهای بنیادی بدست خواهد آمد. هر چند مطالعه این سلولها در انسان، محدودیت های بالینی و اخلاقی مهمی به همراه دارد، Nagano و همکارانش ظرفیت کلونی زایی SSC های انسانی را با پیوند به بیضه موشهای nude آزواسپرم نشان دادند(۶۷).

پیوند زنوگرافت SSC ها در سایر پریماتها مانند میمون نیز صورت گرفته است به طوریکه SSC های کشت شده به لوله های سمی نفروس موشهایی که از قبل بوسیله بوسولفان آزواسپرم شده بودند، پیوند زده شد. همانطور که انتظار میرود، اسپرماتوژنز سلولهای انسان و میمون در بیضه موش ناقص بوده و درمرحله تقسیمات اسپرماتوگونی ها متوقف می شود (۶۷-۶۹). انجماد سلول های بنیادی روشی است که در تمام گونه های پستانداران با هدف حفظ این سلولها انجام می شود. این روش می تواند برای حفظ سلولهای زاینده گونه هایی در معرض خطر انقراض هستند بسیار با ارزش باشد. شاید ارزشمندترین کاربرد پزشکی تحقیقات روی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، در مورد پسران نابالغی است که به دلیل مبتلا شدن به سرطان تحت شیمی درمانی و یا رادیوتراپی قرار می گیرند(۷۰).

زیرا از عوارض جانبی این گونه درمانها تخریب کامل SSC ها و در نتیجه نابارور شدن این بیماران است. با گرفتن بیوپسی از بیضه این بیماران پیش از شیمی درمانی و تهیه سوسپانسیون سلولی که حاوی SSC ها است، میتوان این سلولها را به صورت فریز نگهداری کرده و پس از پایان درمان در هر سنی، به بیضه بیمار پیوند کرد. به این ترتیب با کلونی زایی مجدد SSC ها، امکان آغاز اسپرماتوژنز و تولید اسپرم وجود خواهد داشت. مسلما بهبود و پیشرفت در روشهای کشت SSC، دستیابی به این هدف بزرگ پزشکی را راحت تر و سریع تر خواهد کرد.

نتیجه گیری

با توجه به آمار وزارت بهداشت مبنی بر بهبودی روزافزون بیماران مبتلا به سرطان با استفاده از درمانهای مختلف، این بیماران از آثار جانبی ناشی از این نوع درمانها رنج می برند. یکی از این مسائل و مهمترین آنها مشکل ناباروری ایجاد شده در اثر این درمانهاست، بطوریکه می تواند مشکلات فردی، اجتماعی و روانی را برای افراد به خصوص کودکان به همراه داشته باشد. یکی از راه کارهای مناسب برای حل این مشکل، جداسازی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی بیمار پیش از درمان و پیوند مجدد آن پس از پایان دوره درمان به خود فرد است. هرچند مطالعات انسانی با توجه مشکلاتی که در دسترسی به نمونه بیضه، جداسازی، کشت و شناسایی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی وجود داشته است پیشرفت قابل توجهی نداشته است. با این حال، افزایش دانش ما در رابطه با مکانیسم های خودنوزایی و درک مکانیسم های تنظیم کننده تمایز و تنظیم فاکتورهای تولید شده توسط سلول های سوماتیک در ریز محیط این سلولها در پیش برد مطالعات بسیار یاری کننده است.

منابع و مآخذ

1. Wu X, Goodyear SM, Tobias JW, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial Stem Cell Self-332 Renewal Requires ETV5-Mediated Downstream Activation of Brachyury in Mice. Biol Reprod. 2011; 85:1114-1123.
2. Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. Dev Biol. 2005; 279: 114-124.
3. 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: 16489-16494.
4. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. Am J Anat. 1966; 118: 509-524.
5. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. American Journal Anatomy. 1956; 99: 507–516.
6. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91: 11298-11302.
7. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 1972; 52: 198-236.
8. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res C Embryo Today. 2009; 87: 27-34.
9. 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.
10. Greenbaum MP, Yan W, Wu MH, et al. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:4982–4987.
11. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. Am J Anat 1963; 112: 35-51.
12. Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. Reproduction. 2006; 132:673–680.
13. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. Nat Genet. 2004; 36:647–652.
14. Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, et al. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. Dev Biol. 2004; 269:447–458.
15. 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.
16. 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.
17. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, et al. Regulation of cell fate decision of 366 undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science 2000; 287:1489–1493.
18. He Z, Jiang J, Hofmann MC, Dym M. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. Biol Reprod. 2007; 77:723–733.
19. 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.
20. 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; 100:6487–6492.

21. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:5504–5509.

22. 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 380 macaques. Hum Reprod. 2009; 24: 1704–1716.

23. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125þ germline progenitors. Nature. 2007; 449:346–350.

24. Seandel M, Falciatori I, Shmelkov SV, Kim J, James D, Rafii S. Niche players: spermatogonial progenitors marked by GPR125. Cell Cycle. 2008; 7:135–140.

25. Reid A. et al. Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. Blood. 1995; 86: 4544–4552.

26. Barna M. et al. PLZF mediates transcriptional repression of HoxD gene expression through chromatin remodeling. Dev. Cell. 2002; 3: 499–510.

27. Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, Shuttleworth JJ, McFarland D, Hobbs RM, Pandolfi PP, Schatten GP, Orwig KE. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. Stem Cells. 2007; 25: 2330–2338.

28. Filipponi D, Hobbs R.M, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini E.A, Pandolfi P.P, Dolci S. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. Mol. Cell. Biol. 2007; 27: 6770–6781.

29. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. Science. 2007; 317:1722– 1726.

30. 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.

31. 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;68:272–81.

32. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. Dev Biol. 2000;220:401–11.

33. Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AMM, 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;124:791–9.

34. van Pelt AMM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FMF, 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;55:439–44.

35. Akhondi M, Mohazzab A, Jeddi-Tehrani M, Sadeghi M, Eidi A, Khodadadi A, Piravar Z. Propagation of human germ stem cells in long-term culture. Iran J Reprod Med. 2013 ;11(7): 551-558.

36. Piravar Z, Jeddi-Tehrani M, Sadeghi M, Mohazzab A, Eidi A, Akhondi M. In vitro Culture of Human Testicular Stem Cells on Feeder-Free Condition. J Reprod Infertil. 2013;14(1):17-22.

37. Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. Dev Biol. 2004;274:158–70.

38. Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. Biol Reprod. 1999; 60:1429–1436.

39. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. World J Stem Cells. 2015;7(4):669-80.

40. Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. Reproduction. 2014;147(3): R65-74.

41. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. World J Stem Cells. 2015;7(4):669-80.

42. He BR, Lu F, Zhang L, Hao DJ, Yang H. An alternative long-term culture system for highly-pure mouse spermatogonial stem cells. J Cell Physiol. 2015; 230(6):1365-75.

43. Lim JJ, Seol DW, Choi KH, Shin DH, Kim HJ, Song SH, et al. Spermatogonial stem cell enrichment using simple grafting of testis and in vitro cultivation. Sci Rep. 2014;4:5923.

44. 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.

45. Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. Stem Cells. 2007; 25: 2330-2338.

46. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:5504–5509.

47. Khanehzad M, Abolhasani F, Koruji M, Ragerdi Kashani I, Aliakbari F, The roles of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells. Tehran University Medical Journal, March 2016; 73(12): 878-887.

48. Tran J, Brenner TJ, DiNardo S. Somatic control over the germline stem cell lineage during Drosophila spermatogenesis. Nature. 2000; 407:754–757.

49. Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. Science. 2003; 301:1547–1550.

50. Moore M, Klein R, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips, H., Reichardt, L., Ryan, A., Carver-Moore, K., Rosenthal, A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. Nature. 1996; 382, 76–79.

51. Hellmich H, Kos L, Cho E, Mahon K, Zimmer A. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. Mech. Dev. 1996; 54, 95–105.

52. Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez C. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. J. Cell Biol. 1995; 130, 137–148.

53. Golden J, Demaro J.A, Osborne P.A,Milbrandt J, Johnson E.J. Expression of neurturin,GDNF, andGDNFfamily-receptormRNAin the developing and mature mouse. Exp. Neurol. 1999; 158, 504–528.

54. Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A & Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. Mechanisms of Development. 2002; 113 29–39.

55. Simon L, Ekman GC, Tyagi G, Hess RA, Murphy KM & Cooke PS Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF. Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. Experimental Cell Research. 2007; 313 3090–3099.

56. Airaksinen MS & Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nature Reviews. Neuroscience. 2002; 3 383–394.

57. Meng X, de Rooij DG, Westerdahl K, Saarma M & Sariola H. Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis. Cancer Research. 2001; 61 3267–3271.

58. Ogawa T., Ohmura M., Yumura Y., Sawada H., Kubota Y. Expansion of murine spermatogonial stem cells through serial transplantation. Biol. Reprod. 2003; 68, 316–322.

59. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. Biol Reprod. 2010;82(2):363-72.

60. Tufro A, Teichman J, Banu N & Villegas G. Crosstalk between VEGF-A/VEGFR2 and GDNF/RET signaling pathways. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007; 358 410–416.

61. Chen SR and Liu YX, Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling, Reproduction and Fertility .2015; 149 R159–R167

62. Chen LY, Brown PR, Willis WB & Eddy EM . Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. Endocrinology. 2014; 155: 4964–4974.

63. Kanatsu-Shinohara M, Onoyama I, Nakayama KI & Shinohara T Skp1- Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. 2014. PNAS 111. 8826–8831

64. Song HW & Wilkinson MF .Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2014; 30: 14–26.

65. Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW & Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Development. 2009; 136: 1191–1199.

66. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:11303–7.

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

68. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. Biol Reprod. 1999; 61:1331–1339.

69. Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature. 2008; 454:646–650.

70. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AM. In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. JAMA. 2011;305(23):2416-8.

71. Piravar Z, Culture and Transplantation of human Spermatogonial Stem Cells to Azospermic Immunodeficient mice.[Thesis ph.D]. Tehran. Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 2012.