مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۹، آذر ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسان به سلول‌های جنسی تمایز یافتــه، ســلول‌های استخوانی و چربی

ساناز آشوری موثق: گروه آموزشی تولید مثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

سحر فراغت: گروه آموزشی تولید مثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

مریم فرقدان: جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران و گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

سپیده آشوری موثق: جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران و گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). ashouri@ibrc.ir

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs: Spermatogonial Stem Cells) طی رونـد اسـپرماتوژنز بـه سلول‌های جنسی بالغ تمایز پیدا کرده و باعث باروری در مردان می‌شـوند. تکثیـر و تمـایز ایـن سـلول‌ها در آزمایشـگاه می‌توانـد راهکاری برای درمان برخی از ناباروری‌ها باشد. همچنین با کشت و تمایز این سلول‌های بنیادی به دیگر رده‌های سـلولی امکـان استفاده از این سلول‌ها در زمینه بیوتکنولوژی و پزشکی ترمیمی فراهم می‌شود.

روش کار: در این مطالعه که یک مطالعه مداخله‌ای (آزمایشگاهی) بود، SSCs پس از هضم آنزیمی بافت بیضـه، جـدا شـده و کشت داده شدند. تأیید هویت SSCs با آنتی‌بادی‌هـای OCT4، PLZF بـا روش ایمونوسیتوشـیمی انجـام شـد. SSCs در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند. سپس بیان ژن‌های *SCP3*، *Boule*، *Crem*، *Protamine2* و بیـان پروتئین‌هـای SCP3 و Protamine2 به ترتیب با روش Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی بررسـی شـد. همچنـین تـوان تمـایزی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به سلول‌های استخوانی و چربی با کشت این سلول‌ها در محـیط کشـت تمـایزی بـه ترتیـب بـا رنگ‌آمیزی Alizarin red و Oil Red ارزیابی شد. آنالیز نتایج حاصل از این مطالعه با روش واریـانس یـک طرفـه (One way ANOVA) انجام گرفت.

یافته‌ها: بررسی بیان ژن‌ها و پروتئین‌های مراحل مختلف اسپرماتوژنز پس از کشت تمایزی نشان داد کـه SSCs می‌تواننـد در شرایط آزمایشگاهی به سلول‌های جنسی تمایز یافته اسپرماتوسیت و اسپرماتید تبدیل شوند. همچنین نتایج این مطالعه نشـان داد که این سلول‌ها قادر هستند به دیگر رده‌های سلولی مانند سلول‌های استخوان و چربی تمایز یابند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد با توجه به توان تمایزی SSCs انسانی می‌تـوان از ایـن سـلول‌ها در درمـان برخی از ناباروری مردانه و همچنین در زمینه سلول درمانی و پزشکی ترمیمی استفاده کرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

سلول‌های بنیادی،

اسپرماتوگونی،

تکثیر،

تمایز

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۱۱

شیوه استناد به این مقاله:

Ashouri S, Feraghat S, Farghadan M, Ashouri S. Isolation, culture and differentiation of human spermatogonial stem cells into differentiated germ cells, osteoblasts and adipocytes. Razi J Med Sci. 2019;26(9):1-9.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(9):1-9. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Isolation, culture and differentiation of human spermatogonial stem cells into differentiated germ cells, osteoblasts and adipocytes

Sanaz Ashouri, DVM, Department of Reproduction, School of Veterinary Medicine, Azad Islamic University, Research and Science Branch, Tehran, Iran
Sahar Feraghat, DVM, Department of Reproduction, School of Veterinary Medicine, Azad Islamic University, Research and Science Branch, Tehran, Iran
Maryam Farghadan, MSc, Iranian Biological Resource Center, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), and Department of Immunology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Sepideh Ashouri, PhD, Iranian Biological Resource Center, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), and Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). ashouri_sepideh@yahoo.com

Abstract

Background: Spermatogonial Stem Cells (SSCs) differentiate into adult germ cells during spermatogenesis and cause male fertility. Maintenance of SSCs and induction of spermiogenesis *in vitro* may provide a therapeutic strategy to treat male infertility. Moreover, it is possible to use the SSCs for research in the field of biotechnology and regenerative medicine through differentiation of them into other cell lines.
Methods: SSCs were isolated enzymatically from digested testicular tissue and then were cultured. The identity of SSCs were confirmed by anti-OCT4, anti-PLZF through immunocytochemistry. SSCs were cultured in differentiated culture medium. Then, expression level of *SCP3*, *Boule*, *Crem*, *Protamine 2* genes and also expression level of SCP3, Protamine2 proteins was determined by Real-time PCR and immunocytochemistry, respectively. In addition, the potency of SSCs differentiation into osteoblasts and adipocytes was evaluated by Alizarin Red and Oil Red staining, respectively.
Results: The results showed that SSCs can differentiate into adult germ cells in *in vitro* condition. Also, under differentiation conditions, these cells can be distinguished from other cell lines.
Conclusion: The results of this study showed that, given the differentiation potency of SSCs, these cells can be used for the treatment of male infertility, as well as cell therapy and regenerative medicine.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
Spermatogonial stem cells,
Proliferation,
Differentiation

Received: 22/06/2019
Accepted: 02/11/2019

Cite this article as:
Ashouri S, Feraghat S, Farghadan M, Ashouri S. Isolation, culture and differentiation of human spermatogonial stem cells into differentiated germ cells, osteoblasts and adipocytes. Razi J Med Sci. 2019;26(9):1-9.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]

مقدمه

بیضه بافتی پویاست که عملکرد آن وابسته به تکثیر مداوم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells-SSCs) می‌باشد. این سلول‌ها بر روی غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز واقع شده و در بین سلول‌های سرتولی فرو رفته‌اند. در روند اسپرماتوژنز این سلول‌ها با ایجاد کلونی، زنجیره‌هایی از اسپرماتوگونی‌های تمایز یافته را تشکیل می‌دهند که بعد از چندین تقسیم به اسپرماتوسیت و سرانجام اسپرماتید تبدیل می‌شوند. برای حفظ باروری فرد همواره ذخیره‌ای از SSCs در بیضه لازم می‌باشد (۱). هرگونه اختلال در تعداد، تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی می‌تواند منجر به ناباروری در مردان شود (۲). در کودکانی که برای درمان سرطان و یا بیماری‌های دیگر شیمی درمانی و یا رادیوتراپی می‌شوند، تعداد زیادی از سلول‌های اسپرماتوگونی در روند درمان از بین می‌روند و امکان ناباروری و یا اختلال در باروی این کودکان در بزرگسالی وجود دارد. از آنجا که اسپرماتوژنز در دوران کودکی آغاز نمی‌شود امکان فریز اسپرم بالغ در این کودکان نیست (۳ و ۴). افزایش تعداد بیماران نابارور به علت درمان سرطان منجر به انجام طیف وسیعی از مطالعات که مکانیسم‌های سلولی را در طول تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها بررسی می‌کنند، شده است. استراتژی‌های جدیدی برای حفظ سلول‌های جنسی نر به وجود آمده است. دو استراتژی جدید برای حفظ باروری مردان در افراد سرطانی و آزوسپرمی دنبال می‌شود: ۱- پیوند سلول‌های جنسی یا بافت بیضه به یک حیوان میزبان (۵ و ۶). ۲- کشت سلول‌های جنسی یا بافت بیضه در محیط آزمایشگاهی (۹-۷). تکنیک‌های پیوند و کشت آزمایشگاهی سلول‌های جنسی گزینه‌های جدیدی را برای حفظ باروری در افراد بالغ و مریض‌های سرطانی که هنوز به سن بلوغ نرسیدند، فراهم کرده است. زنوگرافت یک محیط مناسب شبیه به وضعیت طبیعی در فرد دهنده برای تمایز سلول‌های جنسی فراهم می‌کند اما انتقال سلول‌های جنسی به یک گونه بیگانه ریسک احتمال آلودگی‌های ویروسی یا عوامل مسری را زیاد می‌کند. این خطر در گرافت‌های اتولوگ وجود ندارد؛ اما انتقال اتولوگ، ریسک عود سرطان را به علت اینکه بافت بیضه ممکن است که حاوی سلول‌های سرطانی باشد را زیاد می‌کند؛ بنابراین چندین روش برای حل این مشکل طراحی شده است که هیچ‌کدام از آن‌ها موفقیتی برای استفاده بالینی نداشتند (۱۰-۱۲). علیرغم ریسک انتقال سلول‌های سرطانی یا ویروس، تکنیک‌های پیوند یا گرافت بافت بیضه منجر به تکمیل اسپرماتوژنز در چندین مدل حیوانی شده است (۱۳). کشت سلول‌های بنیادی جنسی و انجام اسپرماتوژنز در شرایط آزمایشگاهی به منظور دستیابی به اسپرماتوزوا بالغ به عنوان یک چالش در تحقیقات مختلف مطرح است. نتایج امیدبخشی از انجام اسپرماتوژنز و تولید اسپرماتید بالغ در شرایط آزمایشگاهی حاصل شده است که با وجود توان باروری پایین، قادر به تولید بلاستوست‌های نرمال بودند (۳). تاکنون مطالعات مختلفی بر تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی در جوندگان مانند موش و رت انجام شده است (۱۴-۱۶). در این تحقیق با توجه به اینکه بر روی تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی انسان مطالعات بسیارکمی انجام شده است، سعی شده با ایجاد شرایط و محیط کشت مناسب توان تمایز این سلول‌ها به سلول‌های جنسی بالغ در آزمایشگاه بررسی شود. همچنین با توجه به اینکه که سلول‌های اسپرماتوگونی سلول‌های بنیادی هستند، تمایز آن‌ها به دیگر رده‌های سلول می‌تواند کمکی در راستای سلول درمانی باشد که مشکلات اخلاقی و ایمونولوژیکی استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی را ندارد. با کشت این سلول‌ها در محیط‌های تمایزی اختصاصی، توان تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوانی و چربی ارزیابی شده است.

روش کار

تهیه نمونه بافت: در این مطالعه مداخله‌ای، بافت بیضه انسان از بیماری که دچار مرگ مغزی شده و کاندید اهدا عضو بود با از رضایت خانواده بیمار و با تأیید کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه تهران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]

(IR.TUMS.REC1394.1751) از بیمارستان سینا وابسته به دانشگاه تهران گرفته شد. بافت بیضه در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی سلول‌های بافت بیضه: جداسازی سلول‌ها از بافت بیضه بر اساس دستورالعمل‌های موجود و با اندکی اصلاح انجام شد (۱۷ و ۱۸). برای جداسازی سلول‌های بافت بیضه ابتدا کپسول رویی بافت برداشته شد و سپس با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline-PBS) شسته شد. بافت بیضه در دو مرحله در حضور آنزیم‌های کلاژناز تیپ یک با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر، هیالورونیداز با غلظت یک ونیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تریپسین با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه هضم شد. سلول‌های حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از محلول تریپان بلو ۰/۴٪ شمارش شده و میزان زنده‌مانی آن‌ها مشخص شد.

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی: سلول‌های حاصل از هضم بافت بیضه در محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco) همراه با ۱۰٪ FBS (Fetal bovine serum, Gibco) کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه برای جداسازی SSCs که دیرتر به بستر کشت متصل می‌شوند محیط کشت رویی سلول برداشته شد. با سانتریفیوژ سلول‌های موجود در محیط کشت رویی جدا شدند و در ظروف کشت پوشش داده شده با ژلاتین ۰/۲٪ کشت داده شدند. محیط کشت اختصاصی استفاده شده برای رشد این سلول‌ها شامل DMEM/F12، ۵٪ KSR (KnockOut Serum Replacement, Invitrogen) و فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor: EGF) به مقدار ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF - Fibroblast growth factors) به مقدار ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ، فاکتور رشد مشتق از گلیا (Glial cell-derived neurotrophic factor-GDNF) به مقدار ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و فاکتور مهارکننده لوکمیا (Leukemia inhibitory factor- LIF) به مقدار 10^3 واحد در میلی‌لیتر بود. به منظور تکثیر SSCs به مدت ۴ هفته کشت در محیط کشت اختصاصی ادامه یافت (۱۸).

تأیید هویت SSCs با روش‌های Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی: پس ۴ هفته از کشت SSCs بیان ژن‌های OCT4 و PLZF با روش Real-time PCR ارزیابی شد. کل RNA سلول‌ها با استفاده از ترایزول و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. از RNA استخراج شده با استفاده از کیت سنتز cDNA (Takara) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده cDNA ساخته شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، q PCR با استفاده از دستگاه Real-time PCR (Applied Bio systems, Foster City, USA) و کیت SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) انجام شد (۱۴).

همچنین برای تأیید بیشتر هویت سلول‌های اسپرماتوگونی بیان ژن‌های OCT4 و GFRα1 در سطح پروتئین با آنتی‌بادی‌های اختصاصی و با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. پس از فیکس کردن سلول‌ها در پارآفرمالدهید ۴٪ سلول‌ها در تریتون ۰/۴٪ قرار گرفته و سپس سلول‌ها در مجاورت سرم بز ۱۰٪ قرار گرفتند. سلول‌ها به مدت ۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت آنتی‌بادی اولیه قرار گرفتند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با PBS شسته شده و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در مجاور آنتی‌بادی ثانویه قرار گرفتند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت برای تأیید مارکرها مشاهده شدند.

تمایز به سلول‌های استخوانی: پس از کشت و تکثیر SSCs قابلیت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوانی بررسی شد. بدین منظور سلول‌ها در پلیت‌های ۶ حفره با محیط کشت پایه DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS ، دگزامتازون، ۰/۲ میلی مولار آسکوربیک اسید و ۱۰ میلی مولار بتا گلیسروفسفات قرار گرفتند. در این مرحله کشت به مدت ۳ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ در صد CO_2 انجام شد. در طول این مدت هر دو روز یکبار محیط کشت تعویض شد. پس از پایان این دوره تمایز سلول‌ها با رنگ آمیزی Alizarin red بررسی شد (۱۹).

رنگ آمیزی آلیزارین قرمز: برای رنگ آمیزی ابتدا

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]

سلول‌ها با محلول BPS شسته شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت متانول خالص فیکس شدند. سلول‌های فیکس شده با محلول رنگی ۱ درصد Alizarin redدر آب آمونیکی ۲۵ درصد به مدت ۲ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، سلول‌ها با BPS شسته شده و با میکروسکوپ بررسی شدند.

تمایز به سلول‌های چربی: پس از کشت و تکثیر SSCs تمایز آن‌ها به سلول‌های چربی بررسی شد. بدین منظور سلول‌ها در محیط کشت پایه DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ میکرومولار دگزامتازون، ۰/۵ میلی مولار methylisobutylxanthine و ۱۰۰ میکرو مولار ایندومتاسین و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انسولین کشت داده شدند. در این مرحله کشت به مدت ۳ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ در صد CO2 انجام شد. در طول این مدت هر دو روز یکبار محیط کشت تعویض شد. پس از پایان این دوره تمایز سلول‌ها با رنگ آمیزی Oil Red بررسی شد (۱۹ و ۲۰).

رنگ آمیزی Oil Red: ابتدا سلول‌ها با فرمالین ۴٪ به مدت یک ساعت فیکس شده و پس از آن با الکل ۷۰٪ شسته شدند. سپس با محلول Oil Red به مدت۱۵-۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. در نهایت محلول رنگی خارج شده و پس از شستشو با الکل ۷۰٪ سلول‌ها با میکروسکوپ بررسی شدند.

تمایز SSCs به سلول‌های جنسی بالغ: SSCs برای تمایز در پلیت‌های ۶ حفره پوشیده شده با ژلاتین ۰/۲٪ و در محیط تمایزی DMEM-F12 حاوی ۵٪ FBS، ۵٪ KSR، ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انسولین، 10^{-4} آسکوربیک اسید، ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ویتامین E، $3/3\times10^{-7}$ رتینوئیک اسید، ۱ میلی مولار پیرووات، $2/5\times10^{-5}$ واحد FSH، 10^{-7} مولار تستوسترون به مدت ۴ هفته کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ در صد CO2 انکوبه شده و یک روز درمیان تعویض محیط شدند (۱۴).

بررسی تمایز سلول‌ها بنیادی اسپرماتوگونی به سلول‌های جنسی بالغ با با روش‌های Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی: پس از ۴ هفته کشت و تمایز SSCs، RNA این سلول‌ها با استفاده از محلول ترایزول مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. پس از سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه Real-time PCR بیان ژن های مربوط به مرحله اسپرماتوسیت شامل SCP3 و Boule و همینطور سطح بیان ژن های مربوط به مرحله اسپرماتیدی شامل Protamine2 و Crem بررسی شد. همچنین بیان ژن های SCP3 و Protamine2 در سطح پروتئین با آنتی‌بادی های اختصاصی ارزیابی شد. برای این منظور ابتدا سلول‌ها در پارآفرمالدید ۴٪ فیکس و آماده‌سازی شدند. پس از آن سلول‌ها مجاور آنتی‌بادی اولیه قرار گرفته و پس از شستشو و قرار گرفتن در معرض آنتی‌بادی ثانویه با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

آنالیز داده‌ها: محاسبات آماری برای تعیین وجود اختلاف معنی دار در نتایج حاصل از Real-time PCR توسط نرم افزار Graph Pad Prism 6 با روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) انجام گرفت. در این محاسبات، اختلاف با $P< ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

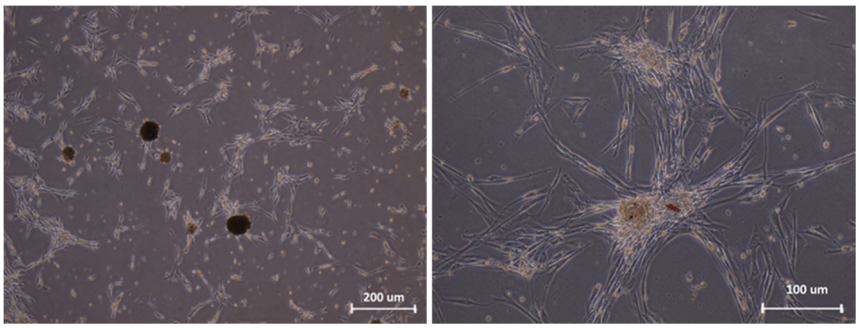
یافته‌ها

ارزیابی رشد و مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده: SSCs در صد کمی از سلول‌های بافت بیضه را تشکیل می‌دهند. با توجه به اینکه این سلول‌ها نسبت به سلول‌های سوماتیک بافت بیضه دیرتر به بستر کشت متصل می‌شوند کشت مجدد سلول‌ها که پس از ۲۴ ساعت هنوز به بستر متصل نشده بودند فرصتی برای جداسازی و خالص سازی این سلول‌ها فراهم کرد. پس از حدود ۲ هفته از کشت این سلول‌ها در محیط کشت اختصاصی کلونی‌های حاصل از رشد و تمایز این سلول‌ها در بستر کشت به خوبی نمایان بود. با افزایش طول دوره کشت تعداد و اندازه این کلونی‌ها افزایش یافت به طوری که پس از ۴ هفته از شروع کشت این سلول‌ها تعداد قابل توجه ای از این سلول‌ها در بستر کشت بودند (شکل ۱).

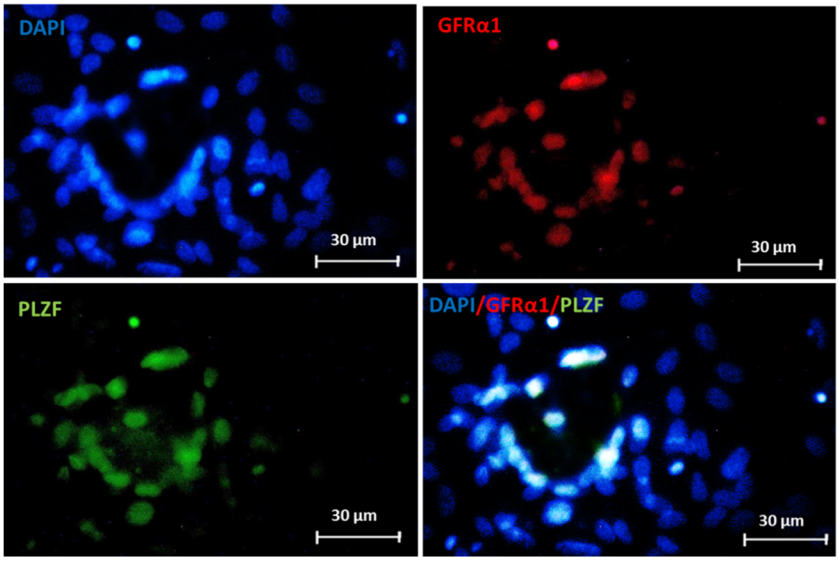
تأیید هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی: پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، کلونی‌های حاصل از رشد این سلول‌ها روش‌های Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شدند. در روش Real-time PCR نشان داده شد که میزان بیان ژن‌های مربوط به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]



شکل ۱- عکس تهیه شده با میکروسکوپ نوری از کلونی های حاصل از تکثیر SSCs که به مدت ۴ هفته کشت داده شدند. در طول این مدت تعداد و انـدازه کلونی‌ها حاصل از رشد این سلول‌ها افزایش یافت.



شکل ۲- عکس تهیه شده با میکروسکوپ فلوروسنت که به منظور تایید هویت SSCsکلونی‌های حاصل از تکثیر این سلول ها با آنتی بادی‌هـای اختصاصـی ضد مارکرهای PLZF و GFRα1 با روش ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شدند. مشاهده می‌شود که اکثر سلول های واقع در کلونی هر دو مارکر را بیان می‌کنند.

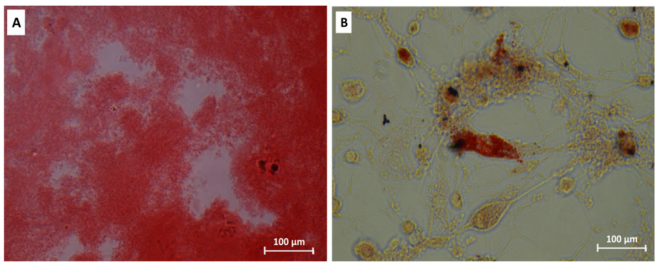
اسپرماتوگونی (PLZF،OCT4) در این کلونی‌ها بالاست. همچنین در روش ایمونوسیتوشیمی نشان داده شد کـه اکثر سلول‌های موجود در این کلونی‌ها هـر دو مـارکر OCT4 و GFRα1 را بیان می‌کنند (شکل ۲).

تمایز به سلول‌های استخوانی: در مـدت ۳ هفتـه کـه SSCsدر محیط کشت تمایزی کشت داده می شدند بـا میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. پس از گذشت یـک هفته از کشت تمایزی این سلول‌ها تغییرات مورفولـوژی این سلول‌ها در محیط کشت نمایان شد. رشـد و تکثیـر توده‌های سلولی حاصل از تمایز ایـن سـلول‌ها در طـول این دوره تمایز مشهود بود. پس از پایـان دوره تمـایزی ترشح ماتریکس معدنی توسـط سـلول‌ها بـا اسـتفاده از رنگ آمیزی Alizarin red ارزیابی شـد. نتـایج نشـان از حضور ماتریکس غنـی از کلسـیم در توده‌هـای سـلولی تشکیل شده داد (شکل ۳).

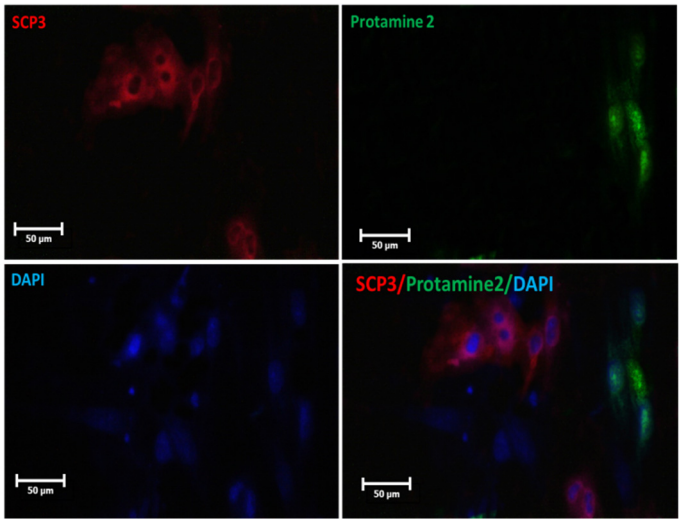
تمایز بـه سـلول‌های چربـی: کشـت SSCsدر محـیط کشت تمایزی القا کننده سلول‌های چربـی بـه مـدت ۳ هفته انجام شد. حضور قطرات چربی در داخل سـلول‌ها در طول دوره تمایز بررسی شد و مشخص شد با افزایش طول دوره تمایز تعداد این قطرات افزایش مـی یابـد. در پایان دوره تمایز با رنگ آمیزی Oil Red قطرات چربـی به رنگ قرمز در آمده و با میکروسکوپ اینورت مشاهده شدند (شکل ۳).

تمایز به سلول‌های جنسی: برای تمایز بـه سـلول‌های جنسی بالغ سلول‌های اسپرماتوگونی به مـدت ۴ هفتـه در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند. پس از پایان ایـن دوره میـزان بیـان ژن‌هـای اسپرماتوسـیتی و اسپرماتیدی با روش‌های Real-time PCR بررسی شـد. نتایج نشان دادند علیرغم عدم بیان ژن های تمایزی در SSCs اولیه پس از ۴ هفته کشت تمایزی، این سـلول‌ها

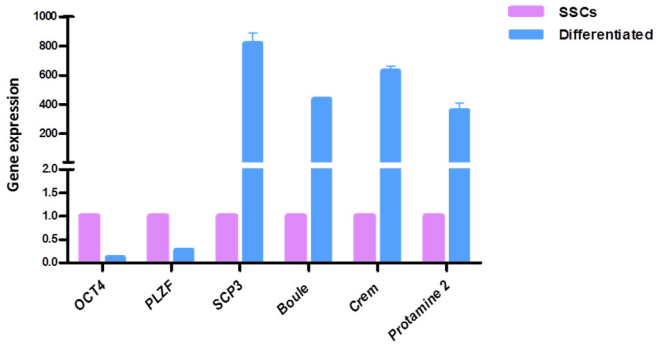
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]



شکل ۳- عکس تهیه شده با میکروسکوپ نوری از تمایز SSCsبه سلول های استخوانی و چربی. رنگ آمیزی Alizarin red، رنگ قرمز نشانگر تمایز به استخوان و ماتریکس خارج سلولی غنی از کلسیم است (A). رنگ آمیزی Oil Red، وجود واکوئل‌های قرمز رنگ نشان دهنده تمایز به چربی است (B).



شکل ۴- عکس تهیه شده با میکروسکوپ فلوروسنت، پس از ۴ هفته کشت تمایزی SSCs تمایز این سلول‌ها با آنتی بادی‌های اختصاصی برای مارکر اسپرماتوسیتی (SCP3) و مارکر اسپرماتیدی (Protamine2) با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. مشاهده می شود که سلول‌های اسپرماتوگونی مارکرهای هر دو مرحله را بیان کرده‌اند.



شکل ۵- میزان بیان ژن‌های در مراحل مختلف اسپرماتوژنز با استفاده از Real-time PCR بین سلول‌های اسپرماتوگونی اولیه (SSCs) و سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز یافته پس از ۴ هفته کشت تمایزی. بیان ژن‌های تمایزی پس از کشت تمایزی به میزان معنی‌داری است ($P \leq ۰/۰۱$).

میزان معنی داری از بیان ژن‌های تمایزی را در هر دو مرحله اسپرماتوسیتی و اسپرماتیدی داشتند ($P \leq 0.01$) (شکل ۵). همچنین ارزیابی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن‌های میوزی و پس از میوزی را بعد از دوره تمایز در سطح پروتئین تأیید کرد (شکل ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

کشت SSCs و انجام اسپرماتوژنز در شرایط آزمایشگاهی به منظور دستیابی به اسپرماتوزوا بالغ به عنوان یک چالش در تحقیقات مختلف مطرح است. نتایج امیدبخشی از انجام اسپرماتوژنز و تولید اسپرماتید

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]

بالغ در شرایط آزمایشگاهی حاصل شده است که با وجود توان باروری پایین قادر به تولید بلاستوست‌های نرمال بودند (۳). در بیمارانی که به علل مختلف مانند بیمارانی که باید تحت درمان‌های رادیوتراپی و شیمی درمانی قرار بگیرند و یا افراد آزو اسپرمی که دچار توقف در روند بلوغ در مرحله اسپرماتید گرد هستند کشت و بلوغ سلول‌های اسپرم‌ساز در آزمایشگاه می‌تواند به عنوان یک راهکار مناسب درمانی مطرح باشد (۲). لی و همکارانش اولین گزارش‌ها را در مورد اسپرماتوژنز منتشر کردند. آن‌ها سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیم بافت بیضه موش سه روزه را در کپسول‌های از آلژینات برای مدت ۱۴ هفته کشت دادند و توانستند سلول‌های‌هاپلوئید به دست بیاورند (۲۱). هو لی و همکارانش اسپرماتوژنز را در موش‌های نابالغ هفت روزه در ماتریکسی از کلاژن مورد مطالعه قرار دادند, و سلول‌های اسپرماتید را استخراج کردند (۱۴). ساتو و همکارانش قطعاتی از بافت بیضه موش چند روزه را به مدت دو ماه در یک فازی بین مایع و گاز کشت دادند و توانستند اسپرماتوزوا بالغ تولید کنند که با استفاده از روش‌های کمک باروری منجر به تولید نوزاد شد (۲۲). استوکنبورگ و همکارانش سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیم بافت بیضه، به مدت یک ماه کشت دادند و توانستند اسپرماتیدهای بالغ جدا کنند (۲۳). در مطالعه دیگری الحیجا و همکارانش توانستند اسپرماتوزوا بالغ موشی در محیط برون تنی تولید کنند (۲۴). کروجی و همکاران سلول‌های SSC را از موش نابالغ جدا کردند. سپس این سلول‌ها را بر روی PLLA تکثیر دادند. آن‌ها مشاهده کردند که تعداد کلونی‌های حاصل از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی اسکافولد افزایش داشته است (۲۵). با توجه به اینکه بر روی تمایز SSCs انسان مطالعات خیلی کمی انجام شده است در این مطالعه سعی شد با ایجاد شرایط مناسب توان تمایز این سلول‌ها به سلول‌های جنسی در آزمایشگاه ارزیابی شود. پس از ۴ هفته کشت SSCs در محیط کشت تمایزی نتایج Real-time PCR نشان داد ژن های تمایزی در هر دو مرحله اسپرماتوسیتی و اسپرماتیدی به میزان معنی داری بیان می‌شوند ($P\leq ۰/۰۱$). بیان این ژن‌ها در سطح پروتئین با روش ایمونوسیتوشیمی نیز تأیید شد. علیرغم اینکه نقش اصلی سلول‌های بنیادی جنسی انجام گامتوژنز و تولید سلول‌های جنسی است، اما شواهد مختلفی مانند وجود تومورهای تراتوما در گنادها که حاوی انواع سلول‌ها و بافت‌هاست نشان از توان تمایزی این سلول‌ها به دیگر بافت ها می‌دهد (۲۶). تحقیقات نشان می‌دهند سلول‌های بیان کننده OCT4 می توانند خاصیت چند توانی از خود نشان دهند (۲۷ و ۲۸). بنابراین با توجه به بیان OCT4 در SSCs، این سلول‌ها قادرند این ویژگی را نشان دهند. در مطالعات مختلف توان تمایزی SSCs به دیگر رده‌های سلولی در گونه‌های گوناگون مورد بررسی قرار گرفته است. تاجیک و همکارانش توانستند SSCs گاو را به سلول‌های استخوانی تمایز دهند (۲۹). وانگ و همکارنش توانستند SSCs گرفته شده از خوک را به سلول‌های نورونی و چربی تمایز دهند (۲۰). نگوین توان تمایزی SSCs گرفته شده از جنین جوجه به سلول‌های چربی و استخوان بررسی کرده و مشاهده کردند که این سلول‌ها توان تمایز به این رده‌های سلولی را دارند (۱۹). توان تمایزی SSCs برای بازسازی بافت ها به عنوان یک جایگزین مناسب که مشکلات اخلاقی و ایمونولوژیکی سلول‌های بنیادی جنینی را ندارد حائز اهمیت است. در این تحقیق SSCs انسانی پس از ۳ هفته کشت در محیط تمایزی توانستند به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز پیدا کنند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد با توجه به توان تمایزی SSCs انسانی می توان از این سلول‌ها در درمان برخی از ناباروری مردانه و همچنین در زمینه سلول درمانی و پزشکی ترمیمی استفاده کرد.

References

1. Schlatt S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. Mol Cell Endocrinol. 2002;187(1):107-11.
2. Aslam I, Fishel S. Short-term in-vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in-vitro conception. Hum Reprod. 1998;13(3):634-8.
3. Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Mawatari Y, Tanaka I, Kusunoki H. Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. Fertil Steril. 2003;79:795-801.
4. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]

Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. Best Pract. Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25(2):287-302.

5. Sofikitis N, Kaponis A, Mio Y, Makredimas D, Giannakis D, Yamamoto Y, et al. Germ cell transplantation: a review and progress report on ICSI from spermatozoa generated in xenogeneic testes. Hum Reprod Update. 2003;9(3):291-307.

6. Staub C. A century of research on mammalian male germ cell meiotic differentiation in vitro. J Androl. 2001;22(6):911-26.

7. Georgiou I, Pardalidis N, Giannakis D, Saito M, Watanabe T, Tsounapi P, et al. In vitro spermatogenesis as a method to bypass pre-meiotic or post-meiotic barriers blocking the spermatogenetic process: genetic and epigenetic implications in assisted reproductive technology. Andrologia. 2007;39(5):159-76.

8. Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, et al. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. Cancer Res. 2006;66(23):11166-71.

9. Hou M, Andersson M, Zheng C, Sundblad A, Söder O, Jahnukainen K. Decontamination of leukemic cells and enrichment of germ cells from testicular samples from rats with Roser's T-cell leukemia by flow cytometric sorting. Reproduction. 2007;134(6):767-79.

10. Hou M, Andersson M, Zheng C, Sundblad A, Söder O, Jahnukainen K. Immunomagnetic separation of normal rat testicular cells from Roser's T-cell leukaemia cells is ineffective. Int J Androl. 2009;32(1):66-73.

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

12. Cremades N, Bernabeu R, Barros A, Sousa M. In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. Hum Reprod. 1999;14(5):1287-93.

13. Cremades N, Sousa M, Bernabeu R, Barros A. Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. Hum Reprod. 2001;16(9):1938-44.

14. Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. Biomaterials. 2006;27(14):2845-53.

15. 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(7088):1199.

16. Galdon G, Atala A, Sadri-Ardekani H. In vitro spermatogenesis: how far from clinical application? Curr Urol Rep. 2016;17(7):49.

17. 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(2):612-6.

18. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA. 2009;302(19):2127-34.

19. Nguyen TL, Yoo JG, Sharma N, Kim SW, Kang YJ, Thi HHP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of chicken spermatogonial stem cell derived embryoid bodies. Ann Anim Sci. 2016;16(1):115-28.

20. Wang X, Chen T, Zhang Y, Li B, Xu Q, Song C. Isolation and culture of pig spermatogonial stem cells and their in vitro differentiation into neuron-like cells and adipocytes. Int J Mol Sci. 2015;16(11):26333-46.

21. Lee DR, Kaproth MT, Parks JE. In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. Biol Reprod. 2001;65(3):873-8.

22. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature. 2011;471(7339):504.

23. Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, et al. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. J Androl. 2008;29(3):312-29.

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

25. Orwig KE, Ryu B-Y, Avarbock MR, Brinster RL. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal rat testes. Proc Natl Acad Sci. 2002;99(18):11706-11.

26. Stevens LC. Spontaneous and experimentally induced testicular teratomas in mice. Cell Differ. 1984; 15(2-4):69-74.

27. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell. 1992;70(5):841-7.

28. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. Nature. 1992;359(6395):550.

29. Qasemi-Panahi B, Tajik P, Movahedin M, Moghaddam G, Barzgar Y, Heidari-Vala H. Differentiation of bovine spermatogonial stem cells into osteoblasts. Avicenna J Med Biotechnol. 2011;3(3):149.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.9.5]