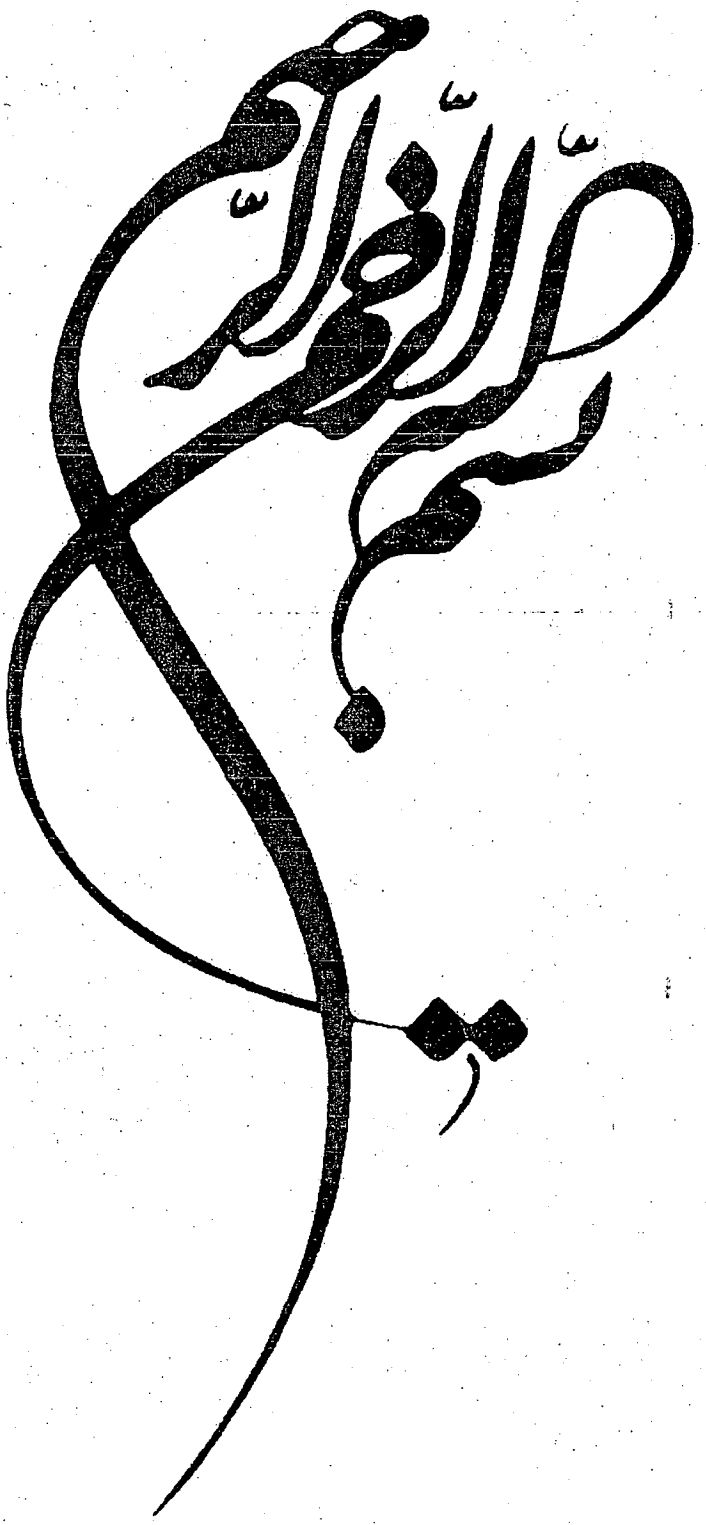


٤١٢٠٢٠٢ - ١٤٢٠٤٨

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی دام

عنوان

تاثیر برخی فاکتورهای رشد بر تکثیر و زنده مانی سلول های اسپرماتوگونی گاو

استادان راهنما

دکترغلامعلی مقدم

دکتر پرویز تاجیک

استادان مشاور

دکترنصرالله پیرانی

دکترعباس برین

پژوهشگر

مهشید ترک زبان

بهمن ۱۳۸۸ شماره ۸۸

۱۴۲۰۴۸

من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق

با نام، یاد و سپاس فراوان از خالقم که هر آنچه هستم عنایت اوست

این مصحف بی ذکر نام این عزیزان ذی ارزش نخواهد بود، که ایشان با آنچه بر من آموخته اند مرا به افتخار بندگی خویش نایل کردند:

از اساتید راهنمای بزرگوارم آقایان دکترغلامعلی مقدم ودکتر پرویز تاجیک که در محضر ایشان کسب علم و فیض نمودم و ایشان با صبر وحوصله فراوان در پیشبرد هر چه بهتر پایان نامه راهنمایم بودند کمال قدردانی و تشکر را دارم. . بی شک مشاوره و مساعدت های علمی و اجرایی اساتید محترم آقایان دکتر نصرا... پیرانی و دکتر عباس برین در مراحل مختلف این تحقیق راهگشا بوده و به پاس زحماتشان از ایشان کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکترحسین دقیق کیا که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند و از سایر اساتید بزرگوار که در این مقطع تحصیلی از محضرشان کسب علم نمودم، آقایان دکتر جلیل شجاع، دکتر اکبر تقی زاده، دکتر حسین جانمحمدی، دکتر سید عباس رافت سپا سگذارم. از همراهی عزیزانی که هر یک به نوعی در پیشبرد پایان نامه یاریم نمودند صمیمانه سپا سگذارم.

نام خانوادگی: **ترک زبان** نام: **مهشید**

عنوان پایان نامه: **تأثیر برخی فاکتورهای رشد بر تکثیر و زنده مانی سلول های اسپرماتوگونی گاو**

استاد راهنما: **آقای دکتر غلامعلی مقدم ، آقای دکتر پرویز تاجیک**

استاد مشاور: **آقای دکتر نصرالله پیرانی ،آقای دکتر عباس برین**

مقطع تحصیلی : **کارشناسی ارشد** رشته: **علوم دامی** گرایش: **فیزیولوژی**

دانشگاه: **تبریز** دانشکده : **کشاورزی** گروه: **علوم دامی**

تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۸۸/۱۱/۲۸ تعداد صفحه: ۹۱

کلید واژه ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ، کلونیزاسیون، هم کشتی ،EGF

چکیده

سلول بنیادی اسپرماتوگونی یکی از مهمترین سلول‌های بنیادی بدن است ، اسپرماتوژنز فرایند پیچیده‌ای است که طی آن از سلول بنیادی اسپرماتوگونی تعداد زیادی اسپرم به‌وجود می‌آید. اساس این فرایند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که تعداد آنها در بیضه گاو بالغ محدود و قدرت تکثیر پایینی دارند. بنابراین جداسازی، غنی‌سازی، کشت ، انجماد و پیوند سلول‌های ژرم در شرایط آزمایشگاه ، در شناخت بیشتر آنها وهمچنین کشت آنها جهت خالص‌سازی و افزایش سلول‌های اسپرماتوگونی برای پیوند مفید است و از نقطه نظر بالینی اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه سلول‌های اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز (سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی) از بیضه گوساله با استفاده از مراحل هضم آنزیمی و DSA لکتین جداسازی شدند. ماهیت سلول‌ها علاوه بر ریخت‌شناسی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، از طریق نشانگرهای اختصاصی Oct-4 در سلول‌های کلونی و نشانگرهای اختصاصی

ویمنتین در سلول سرتولی تأیید شد. برای تعیین شرایط مناسب کشت، تعلیق سلولی حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به صورت هم کشت با سلول سرتولی و افزودن غلظت‌های متفاوت از فاکتورهای رشد EGF کشت داده شد. در طول ۲ هفته دوره کشت، ارزیابی کلونی (اندازه‌گیری مساحت و تعداد کلونی) با میکروسکوپ نوری انجام گرفت. برای غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی این سلول‌ها برای مدت دو هفته با سلول‌های سرتولی هم کشت شدند و اثر مکمل (فاکتور رشد اپیدرمی) بر میزان کلونیزاسیون آنها ارزیابی شد . در آخرین مرحله این سلولها منجمد-ذوب شدند تا اثر وجود سلول‌های سرتولی در مجاورت نزدیک با سلول‌های اسپرماتوگونی بر درجه خلوص و قدرت زیست سلول‌ها بنیادی ارزیابی شود. این ارزیابی از طریق بررسی ظرفیت کلونیزاسیون سلول‌ها بنیادی منجمد – ذوب شده در محیط In vitro انجام گرفت و همچنین تجزیه و تحلیل آماری به کمک آزمون‌های آماری انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که می‌توان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی را با درجه خلوص بالا از بیضه گوساله جدا کرد. سلول‌های سرتولی هم در طی کشت باعث غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی میشوند و هم در طی انجماد درجه خلوص و قدرت زیست آنها را افزایش میدهند. بطور کلی می‌توان گفت که با توجه به اهمیت بالای کنش و واکنش‌های بین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی و بعضی فاکتورهای رشد برای شروع و حفظ فرایند اسپرم‌زایی در محیط In vivo می‌توان در محیط In vitro نیز از این رابطه متقابل برای غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در طی کشت و افزایش درجه خلوص و قدرت زیست آنها در طی انجماد استفاده کرد.

مقدمه ۱

۱-مروری بر مطالعات انجام شده ۵

۱-۱-اسپرم‌زایی ۵

۱-۱-۱-مراحل تمایز در توسعه و رشد اسپرماتوگونی: ۱۱

۱-۱-۲ تنظیم خود سازی وتمایز سلولهای بنیادی ۱۲

۱-۱-۳- دوره تکثیر اسپرماتوگونی A_s، A_{al} و A_{pr} ۱۴

۱-۱-٤- تنظیم جداسازی اسپرماتوگونی های A_{al} تا A_1 ..... ۱۵

۱-۱-۵- تنظیم تراکم سلولی اسپرم زایی ۱۷

۱-۲-اختلال در فرایند اسپرم‌زایی و ناباروری ۲۱

۱-۳-کشت سلول‌های اسپرماتوگونی ۲۳

۱-٤-عوامل رشد اپیدرمی (EGF) ۳۱

۱-۵-سلول‌های سرتولی ۳۲

۱-٦- انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ۳٤

۱-۷- بیوپسی بیضه ۳۸

۲- مواد و روشها ٤۰

۲-۱- جداسازی اسپرماتوگونی ها و کشت آنها ٤۰

۲-۲- مواد لازم جهت ساخت محیط کشت DMEM ٤۰

۲-۳- آنزیم‌های لازم جهت هضم آنزیمی ٤۱

۲-۳-۱- مرحله اول هضم آنزیمی ٤۱

۲-۳-۲- مرحله دوم هضم آنزیمی ٤۱

۲-٤- جداسازی سلول‌های سرتولی ٤۲
۲-٥- جداسازی سلول‌های اسپرماتوسیت ٤۳
۲-٦- جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی ٤٤
۲-۷- شمارش و ارزیابی درصد سلول‌های زنده ٤٤
۲-۸- هم کشتی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی ٤٤
۲-۸-۱- استفاده از صفحات تمایزی ٤٥
۲-۸-۲- هم‌کشتی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی ٤٥
۲-۹- استفاده از عوامل رشدEGF در طی کشت ٤٥
۲-۱۰- انجماد و ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی ٤٦
۲-۱۰-۱- مواد لازم جهت ساخت محلول انجمادی ٤۷
۲-۱۱- ارزیابی کلونی‌زایی در سلول‌های اسپرماتوگونی ٤۷
۲-۱۱-۱- آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی ٤۷
۲-۱۱-۲- ایمونوهیستوشیمی ویمنتین ٤۸
۲-۱۱-۳- فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ٤۹
۲-۱۱-٤- ایمونوسیتوشیمیOct-٤ ..... ٥۰
۲-۱۲- بررسی آماری ٥۲
۳-نتایج و بحث ٥۳
۳-۱- جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی از گوساله ٥٤
۳-۲- کشت سلول وبهینه‌سازی شرایط کشت ٥۹
۳-۲-۱-بررسی کمی کلونی‌زایی سلول‌ها در محیط in vitro ۶۰

۳-۳-انجماد سلول ها ۷۵

۳-٤- نتیجه گیری کلی ۷٦

مقدمه

اسپرم‌زایی[۱] فرآیند تکثیر و تمایز سلول جنسی نر است که از بلوغ آغاز شده و در طول دوران زندگی فرد جریان دارد [۱۰۶]. این روند پیچیده و بسیار سازمان یافته شامل تکثیر، تمایز و معدوم شدن می‌باشد که طی آن سلول‌های دختری در حال تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی[۲]، به اسپرماتید[۳] تکوین می‌یابد [۱۴۷]. فرآیند اسپرم‌زایی با تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی آغاز و با تقسیمات سلولی اسپرماتوگونی، تقسیم میوز اسپرماتوسیت‌ها[۴] و تغییرات مورفولوژیکی در اسپرماتیدها دنبال می‌شود که نهایتاً منجر به تولید اسپرماتوزا[۵] می‌گردد.

سلول‌های بنیادی هم دارای توانایی خود تکثیری و هم تولید سلول‌هایی است که قادر به تمایز می‌باشند. در حیوان نر طبیعی فرآیند خود تکثیری و تمایز از سن بلوغ تا پیری ادامه داشته و بسیار پویا می‌باشد [۳۶،۱۲۳]. انواع مختلف سلول‌های بنیادی در یک حیوان وجود دارد، اما سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منحصربه‌فرد بوده چون تنها سلول بدن است که با تقسیم خود می‌تواند ژن‌ها را به سلول‌های فرزندان بعد از خود منتقل نماید. در نتیجه این سلول منبع ارزشمند جهت آزمایش‌های زیست شناسی، پژوهش‌های پزشکی، فناوری در زمینه دام و اصلاح ژنتیکی از طریق دستورزی سلول جنسی نر می‌باشد[۱۷].

---

[۱] Spermatogenesis

[۲] Spermatogonial stem cells

[۳] Spermatid

[۴] Sprematocytes

[۵] Spermatozoa

اسپرماتوگونی‌ها بر روی غشاء پایه لوله‌های منی ساز قرار دارند بنابراین در همان محل تقسیم و تمایز می‌یابند. آنها درصد خیلی کمی از سلول‌های بیضه‌ها را تشکیل می‌دهند. تقریبا $۱۰^{۸}$ سلول در بیضه موش وجود دارد که تقریباً ۲×۱۰^{٤} عدد از آن، سلول بنیادی می‌باشد[۱۳۱]. و انتظار بازده اسپرماتوگونی در گوساله. ۱×۱۰^{۸} سلول اسپرماتوگونی می باشد[٦۲].

عوامل زیادی مثل عوامل رشد، هورمون‌ها و کنش و واکنش بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های جنسی، فرآیند اسپرم‌زایی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. نقص هر یک از این عوامل می‌تواند منجر به ناباروری شود [۷۱]. امروزه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، انجماد و پیوند آنها راه جدیدی است که به کمک آن می‌توان زیست شناسی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل مؤثر در ناباروری را بهتر مورد مطالعه قرار داد [۱۰۳].

روش انجماد بهترین روش برای نگهداری طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌باشد. یکی از کاربردهای انجماد، تامین سلول‌های زایا در بیماران جوان با سرطان بیضه است که تحت درمان شیمی درمانی یا اشعه درمانی قرار می‌گیرند. در این بیماران که هنوز اسپرم‌زایی آغاز نشده است، می‌توان فعالیت اسپرماتوژنیک آنها را با نگهداری سلول‌های بنیادی در نیتروژن مایع و پیوند مجدد به بیضه‌ها حفظ کرد. این روش احتمالاً تنها راه حفظ باروری این بیماران جوان است که در آنها تولید اسپرم امکان‌پذیر نیست[۱۰٦]. انجماد اسپرماتوگونی در موش، رت، همستر، خرگوش، سگ، گوساله، خوک و اسب انجام شده است، این دستاوردها نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی اکثر گونه‌ها می‌تواند به منظور حفظ اسپرم‌زایی منجمد گردد[۱۰٦].

در دهه‌های گذشته اکثر پژوهشگران تلاش‌های زیادی را در خصوص اسپرم‌زایی پستانداران در محیط آزمایشگاهی انجام داده‌اند. اگرچه هدف نهایی اسپرم‌زایی کامل در محیط آزمایشگاه، حاصل نشده

اما پیشرفت‌های زیادی در این زمینه صورت گرفته است. در شرایط محیط کشت، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها سلول‌هایی هستند که قادر به ایجاد کلونی می‌باشند. لذا تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌دلیل تعداد بسیار کم آنها تحت شرایط محیط کشت خوب ابزار مهمی جهت پژوهش و همین طور روش درمانی برای ترمیم و تولید مجدد اسپرم‌زایی درحیوان نابارور است[۱۰۶].

تاکنون تلاش‌های زیادی جهت بهبود شرایط محیط کشت به منظور افزایش بقا سلول‌ها و تکثیر آنها صورت گرفته است ولی به‌دلیل عدم آگاهی از نیازهای تغذیه‌ایی این سلول‌ها موفقیت چشمگیری مشاهده نشده است. در شرایط کشت بدون سرم توانایی زنده ماندن در طی هفته اول ۲۰-۳٪ کاهش می‌یابد[۹٤، ۱۰۸] و در طی چند روز همه آنها می‌میرند. افزودن سرم و نگهداری سلول‌های جنسی بر روی لایه تغذیه‌کننده درصد زنده ماندن را بهبود داده است. به‌علاوه، افزودن ترکیبی از عواملی رشد مختلف در شرایط کشت بدون سرم باعث بهبود خفیف و استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی مانند KSOM (محیط غنی از پتاسیم) نیز درصد زنده ماندن را افزایش داده است[۱۰۷،۸] . افزودن سایتوکاین‌ها و عوامل رشد تا حدودی به بهبود محیط کشت و در نتیجه تکثیر و زنده ماندن این سلول‌ها کمک کرده است[۱۵۷،٦۹] ولی در مورد نقش و اهمیت آنها در تکثیر اختلاف نظر وجود دارد. سایتوکاین‌ها و عوامل رشد متعددی توسط سلول‌های سرتولی و بافت بینابینی بیضه ترشح می‌شود که استفاده آنها به‌عنوان مکمل در محیط کشت احتمالا به بهبود شرایط کمک خواهد کرد[۱۳٤،۱٤۰،۱٤۸]. فناوری پیوند اسپرماتوگونی تحول نوینی را در پژوهش بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ایجاد نمود. پیوند اسپرماتوگونی اولین بار توسط برینستر[۶] [۱٦] و همکاران ابداع گردید. آنها تعلیق سلول‌های جنسی را به لوله‌های منی ساز موش فاقد سلول جنسی تزریق نموده و مشاهده کردند که سلول بنیادی

---

۶ Brinster

اسپرماتوگونی موش دهنده قادر به شروع مجدد اسپرم‌زایی در موش گیرنده است[١٠٥،١٦]. حضور قطعی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در یک جمعیت سلولی می‌تواند با پیوند این سلول‌ها به گیرنده کمبود اسپرم مشخص گردد[٨٩،١٨]. اسپرم‌زایی حاصل از سلول بنیادی اسپرماتوگونی موش دهنده فعالیت زیستی و تعداد تقریبی این سلول‌ها را در جمعیت نشان می‌دهد[١٢٦،١١١،٩٠]. این ارزیابی وسیله خوبی برای پژوهش در زمینه زیست شناسی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گونه‌های مختلف است[١٠٢،٩٩].

هدف اصلی

١- جداسازی اسپرماتوگونی و کشت آنها

- تعیین روش مناسب جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی از سلول‌های لوله‌های منی ساز گوساله
- تعیین ماهیت سلول‌های جدا شده حاصل از کشت سلولی
- تعیین اثر هم کشتی با سلول‌های سرتولی و افزودن و عوامل رشد EGF بر غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوساله
- تعیین بهترین شرایط افزاینده تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در طی مدت زمان کشت

٢- انجماد- ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی و کشت آنها

- تعیین درصد حیات سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوساله پس از انجماد – ذوب

فصل اول

بررسی منابع

۱- مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱-اسپرم‌زایی

تولید اسپرم فرایندی پیچیده است که از تعداد زیادی مراحل پی در پی و منظم تشکیل شده و در طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تقسیم و تمایز می‌یابد وحاصل آن ایجادتعداد نا محدودی اسپرم فعال است [۱۲۲]، در پستانداران اسپرم‌زایی در لوله‌های منی‌ساز انجام می‌گیرد[۹۵،۵۰]. این لوله‌ها از سلول‌های سرتولی و رده‌های مختلف سلول‌های جنسی تشکیل شده است و توسط سلول‌های میوئیدی دورلوله‌ایی در بر گرفته می‌شود. سلول‌های سرتولی در قاعده لوله قرار دارد اما زوائد سیتوپلاسمی آنها تا مجرای لوله کشیده شده است. فرآیند اسپرم‌زایی با شروع تمایز سلول جنسی در زمان بلوغ، توانایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در خود نوسازی و یا تمایز به سایر رده‌های سلول جنسی، فرآیند اسپرم‌زایی را حفظ می‌کند [۵۸].

برای بقای توانایی سلول‌های بنیادی بالغ، نیاز به محیط ویژه‌ایی است که عوامل و کنش واکنش‌های لازم را برای حفظ و توانایی آنها فراهم آورد. این ریز محیط سرنوشت سلول بنیادی را به‌وسیله جلوگیری از تمایز آنها حفظ نموده و غالبا شامل سلول‌های تمایزیافته و بنیادی مجاور و فضای خارج سلولی اطراف این سلول‌ها است. ریز محیط سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در طول غشا پایه لوله‌های منی‌ساز قرار دارد و سلول‌های سرتولی در تشکیل این ریزمحیط نقش بسزایی دارد. این سلول‌ها تکوین سلول‌های جنسی را با ترشح عوامل رشد، سایتوکاین‌ها [٦٤] و برخی عوامل نظیر لاکتات و پیروات تنظیم می‌کند[٦٧،١٥].

پیوند سلول بنیادی اسپرماتوگونی راهکاری را به منظور بررسی مشخصات این ریز محیط فراهم می‌کند. مدت زمانی که لازم است تا یک سلول بنیادی به اسپرم تمایز یابد در گونه‌های مختلف متفاوت است به طوری که در انسان ٦٤ روز، در موش ۳۵ روز و در رت حدود ۵۳ روز طول می‌کشد [۲۱]. در طی این فرایند، اسپرماتوگونی های دیپلوئید با انجام ۱۰ تقسیم میتوزی و ۲ تقسیم میوزی به اسپرماتوزوای هاپلوئید تمایز می‌یابد [۲۱].

اسپرم‌زایی از یک یا چند مرکز کوچک شروع می‌شود و هر مرکز در اثر تکثیر یک سلول بنیادی اسپرماتوگونی ایجاد می‌گردد [۲۱]. سلول اسپرماتوگونی در جوندگانی مثل رت و موش در ۳ گروه قرار می‌گیرند:

۱-اسپرماتوگونی نوع A ۲- اسپرماتوگونی حد وسط ۳- اسپرماتوگونی نوع B

-صرفنظر از اختلافات ویژه ای که در بیضه گاو نسبت به بقیه پستانداران وجود دارد، دسته بندی اسپرماتوگونی در گاو به این صورت است[۱۵۲]:

۱-سلولهای بنیادی پایه ۲- اسپرماتوگونی متراکم ۳- اسپرماتوگونی اختصاصی

سلولهای بنیادی پایه، سلولهای گرد کوچکی با ۱ تا ۳ هستک هستند،که با اسپرماتوگونی های A_s، A_{pr} قابل مقایسه اند. اسپرماتوگونی‌های متراکم دراندازه های مختلف از کوچک تا بزرگ وجود دارند و این سلولهای دارای ۱ تا۲ هستک، شبیه اسپرماتوگونی‌های A_{al} هستند. اسپرماتوگونی اختصاصی، بزرگترین نوع اسپرماتوگونی موجود در بیضه است، وبا یک هسته بزرگ مرکزی، شبیه اسپرماتوگونی A_1 و A_2 می باشند.

البته دریک تعریف کلی: اسپرماتوگونی نوع A سلول‌های کروی با هسته گردی هستند که اندازه‌های متفاوتی دارند و این اختلاف اندازه ممکن است مربوط به مرحله چرخه سلولی و یا روند تمایز سلول باشد. در مرکز هسته این سلول‌ها ۱ تا ۳ هستک متراکم وجود دارد که قطری حدود ۳-۱ μM دارند. این سلول‌ها را بر حسب اندازه‌شان به دو دسته کوچک و بزرگ تقسیم می‌کنند، سلول‌های بزرگ یک هستک مرکزی بزرگ دارند و سلول‌های کوچک ۱ تا ۳ هستک دارند [۸۰]. تعداد سلول‌های بزرگ ۱۰ برابر سلول‌های کوچک است[٦١]، زمانیکه سلولها کوچک هستند، مرحله G_1 بیشتر از ۱۰ درصد زمان تشکیل سلول را به خود اختصاص می دهد.

از نظر تمایزی سلول‌های اسپرماتوگونی بزرگ تمایز یافته‌تر از سلول‌های کوچک هستند [۱۲۵] و قابل مقایسه بااسپرماتوگونی های تمایز یافته A_1-A_4 می باشند.

البته در توبولها ی منی ساز گونوسیتها هم وجود دارند، اگر چه گونوسیتها سلولهای بزرگی هستند اما ممکن است بعد از جدا سازی با اسپرماتوگونی نوع A بزرگ اشتباه شود البته تعداد کمی از این سلولها و اندازه آنها قابل تشخیص از اسپرماتوگونی نوع A هستند[٦٠].

اسپرماتوگونی‌های نوع A خود شامل اسپرماتوگونی .A (تمایز نیافته) و اسپرماتوگونی‌های A_1-A_4 (تمایزیافته) هستند. اسپرماتوگونی .A در اثر تمایز به اسپرماتوگونی‌های A_s، A_{pr} و A_{al} تبدیل می‌شود. اسپرماتوگونی‌های A_s به شکل منفرد هستند در حالی که اسپرماتوگونی A_{pr} به شکل جفت و A_{al}به شکل زنجیری بوده و توسط پل‌های سیتوپلاسمی به هم اتصال دارند [۳۲] .

اسپرماتوگونی A_s سلول بنیادی فرآیند اسپرم‌زایی است [۳۵]. در بیضه موش سلول‌های بنیادی، ۱/۳٪ کل اسپرماتوگونی‌های نوع A را تشکیل می‌دهند[۱۳۲] . در گاو سلولهای اسپرماتوگونی A_{pr} خواص سلولهای بنیادی را داراست [۶۰].

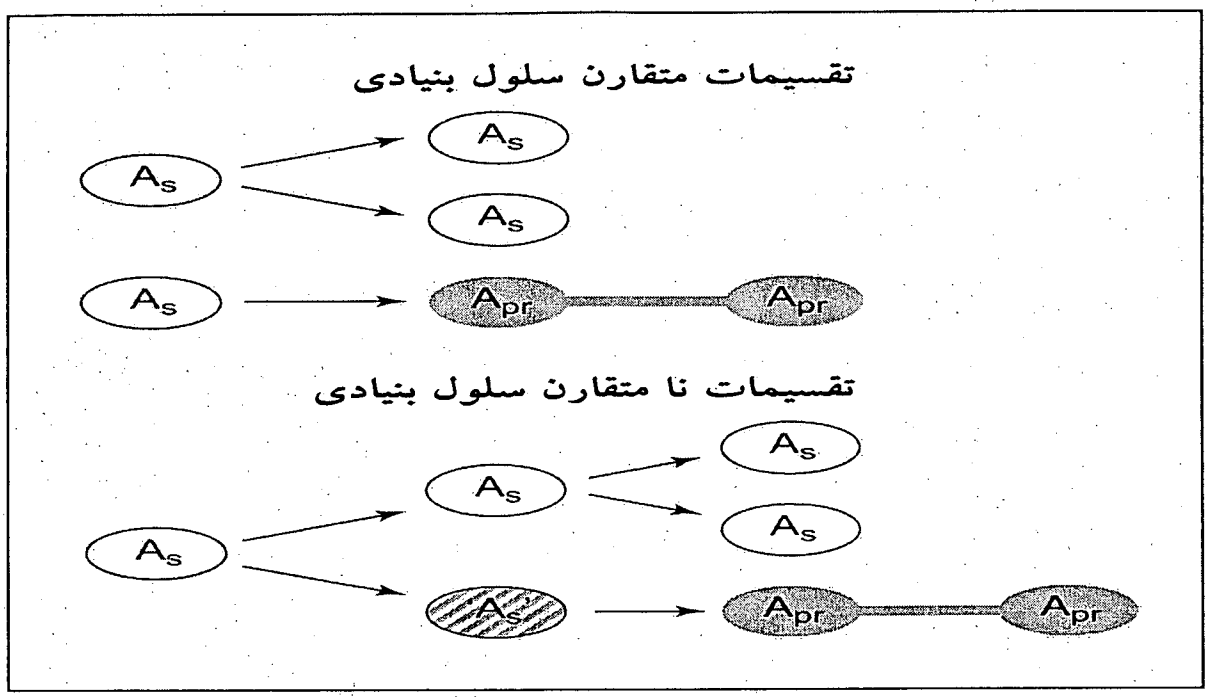
فرآیند اسپرم‌زایی شامل سه مرحله متفاوت است:

- مرحله تکثیر اسپرماتوگونی
- مرحله میوزی
- مرحله تبدیل اسپرماتید گرد به اسپرم طویل[۷]

مرحله تکثیر اسپرماتوگونی با تکثیر و تقسیم میتوزی سلول‌های اسپرماتوگونی روی غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز آغاز می‌گردد و تا تقسیم اسپرماتوگونی B برای تولید اسپرماتوسیت‌های لپتوتن انجام می‌گیرد. در مرحله میوزی، اسپرماتوسیت با تقسیمات میوزی متوالی به اسپرماتید تکوین می‌یابد که این مرحله اسپرماتوسیتوژنز گفته می شود. اسپرماتوسیت‌ها غشاء پایه را ترک کرده [۱۰۶] و در حالی که تماس خود را با سلول سرتولی[۸] حفظ می‌کنند، به سمت مجرای لوله منی‌ساز حرکت می‌کند. در مرحله سوم اسپرماتوزوئید تولید می‌شود که به‌داخل مجرا رها شده و به سمت اپیدیدیم حرکت می‌کنند [۴۰].

[۷] Spermiogenesis

[۸] Sertoli cells



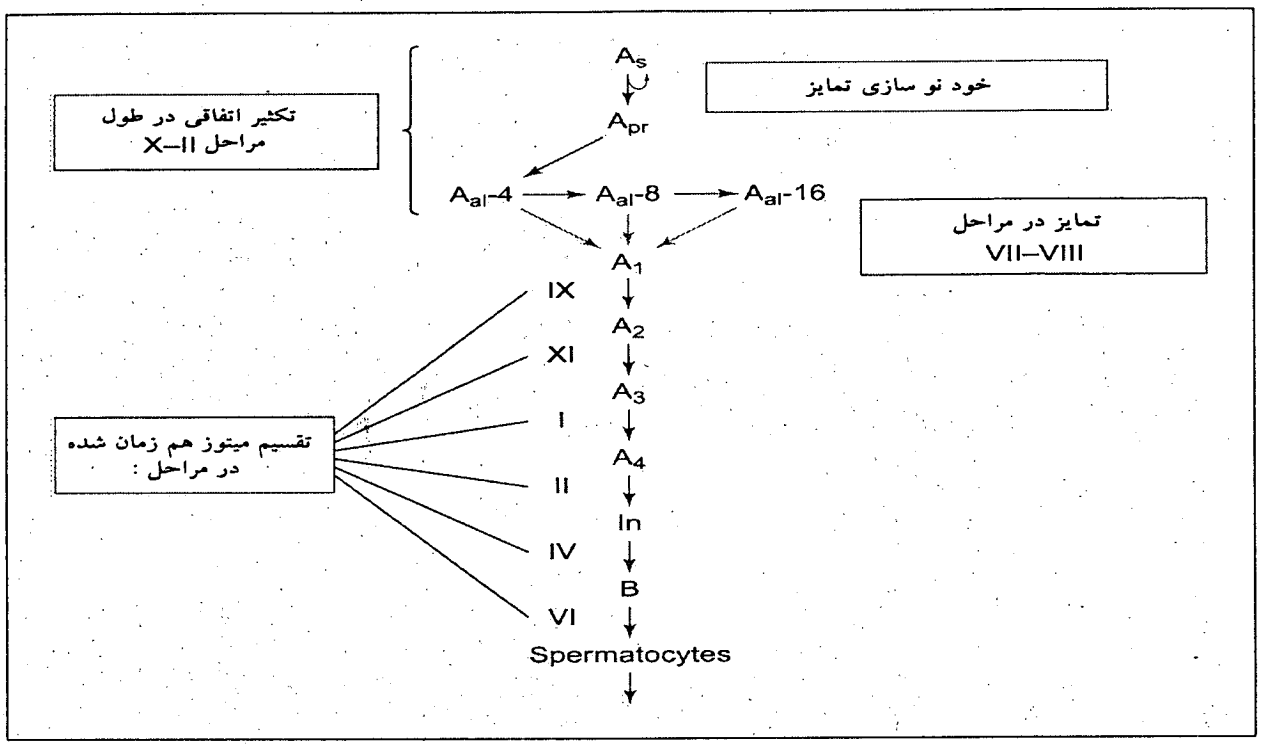
۱-۱-a- مکانیسم ممکن برای نوساری سلول بنیادی

در حقیقت اسپرماتوگونی‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که بشکل منفرد روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز قرار دارند [۱۰۶]. در اثر تقسیم این سلول، سلول‌های دختر حاصله یا از هم جدا شده و دو سلول بنیادی جدید ایجاد می‌کنند و یا اینکه به کمک پل بین سلولی در کنار هم باقی مانده که به آن اسپرماتوگونی زنجیره‌ای گویند، اسپرماتوگونی A_{pr} به زنجیره های ٤ تایی اسپرماتوگونی A_{al} تقسیم میشود(شکل۱-۱-a).

زنجیره های اسپرماتوگونی A_{al} می تواند زنجیره های ۸ یا ١٦ سلولی و ندرتا۳۲ سلولی را ایجادکند. به اسپرماتوگونی A_1 تمایز می‌یابد و پس از ٦ تقسیم میتوزی A_2، A_3، A_4 و سرانجام هم اسپرماتوگونی نوع B را ایجاد می‌کند. اسپرماتوگونی نوع B در آخرین تقسیم میتوزی به اسپرماتوسیت تبدیل می‌شود[۷۳]. اسپرماتوگونی‌ها روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز و بین اتصالات محکم سلول‌های سرتولی قرار دارند و از فضاهای مجرائی و بینابینی (فضای بین لوله‌های منی‌ساز) جدا هستند.

اسپرماتوگونی‌ها در همان محل خودشان، تقسیم و تمایز می‌یابند، حاصل این تقسیم و تمایز اسپرماتوسیت‌ها هستند که غشای پایه را ترک می‌کنند [۱۲۳]، سپس اتصالات محکم بین سلول‌های سرتولی شکسته می‌شود و لذا راه اسپرماتوسیت‌ها به سمت مجرا باز می‌شود و در همین زمان سلول تقسیم میوز خود را کامل می‌کند و به اسپرماتید تمایز می‌یابد [۹۷].

اسپرم زایی یک پروسه سیکلیک است که می تواند به ۱۲ مرحله تقسیم شود(شکل۲-۱-b) . در مرحله VIII اسپرماتوگونی های A_{pr} وA_s وتعداد کمی اسپرماتوگونیA_{al} حضوردارند. از مرحله x به بعد این سلولها شروع به تکثیر وتوسعه می کنند، طوری که در اثر تقسیم این سلول‌ها، تعداد سلولهای اسپرماتوگونی A_{pr} وA_s باقیمانده نسبتا به طور ثابت بیشترو بیشتر می شود و اسپرماتوگونی نوعA_{al} شکل می گیرد. تکثیر از مراحل ۲و۳ قطع شده (۱۲ مرحله در حقیقت ادامه مرحله ۱ است) و سلولها در مرحله G_1 وG_0 متوقف می شوند. سپس همه اسپرماتوگونی های A_{al} در طول دوره ای از تکثیر و تمایز فعال، به اسپرماتوگونی A_1 تبدیل می شوند، اسپرماتوگونی A_1 وارد مرحله S می شود و در مرحله VIIو VIII تقسیم شده وبه اسپرماتوگونیA_2 تبدیل می شود، بعد از آن ۵ تقسیم دیگر هم انجام می گیرد که طی آنها اسپرماتوگونی های A_3 وA_4 و بعد از آن به ترتیب اسپرماتوگونی B و اسپرماتوسیت های اولیه بوجود می آیند. در مجموع ۱۱-۹ تقسیم میتوزی در طول پیشرفت اسپرماتوگونی صورت می گیرد [۳۵].



۱-۱-b- تکثیر اسپرماتوگونی و سلول بنیادی

۱-۱-۱- مراحل تمایز در توسعه و رشد اسپرماتوگونی:

به نظر می رسد ۲ مرحله تمایز در مسیر رشد وتمایز اسپرماتوگونی رخ می دهد. در ابتدا اولین تمایز در مرحله تبدیل اسپرماتوگونی A_s به اسپرماتوگونی A_{al} رخ میدهد، بعد از آن اندازه سلولهای جنسی شامل کلونی سلولهای به هم پیوسته بزرگتر می شود.

از زمان تقسیم A_{pr} به بعد همه تقسیمات به عنوان سلولهای دختری با پل های اتصالی درون سلولی هستند. اما این مسأله که پل های سلولی بین اسپرماتوگونی های A_{al} و A_{pr} چگونه یک مرحله تمایز غیر قابل برگشت را تشکیل می دهند[۱۳۲]هنوز شناخته شده نیست، دراپیتلیوم منی ساز طبیعی موش [۱۳۲] و همستر چینی [۸۰] فقط کلونی اسپرماتوگونی های ٤، ٨ ، ١٦ یا۳۲ تایی یافت می شود در وضعیت طبیعی تمامی پل های ظاهر شده داخل سلولی محافظت می شوند و کلونی ها به واحدهای