



## Differentiation and Apoptosis in Mammalian Germ Cells

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Analytical Review

#### Authors

Salem M.<sup>1</sup> MSc,  
Mirzapour T.\*<sup>2</sup> PhD,  
Bayrami A.<sup>1</sup> PhD,  
Movahedin M.<sup>3</sup> MSc

#### How to cite this article

Salem M, Mirzapour T, Bayrami A, Movahedin M. Differentiation and Apoptosis in Mammalian Germ Cells. Pathobiology Research. 2019;22(1):51-61.

<sup>1</sup>Biology Department, Sciences Faculty, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

<sup>2</sup>Biology Department, Sciences Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran

<sup>3</sup>Anatomical Science Department, Medical Science Faculty, Tarbiat Modrres University, Tehran, Iran

#### \*Correspondence

Address: Biology Department, Sciences Faculty, Manzarieh Boulevard, Rasht, Guilan, Iran. Postal Code: 4193833697

Phone: +98 (13) 33343630

Fax: +98 (13) 33343633

dr.tooba72@gmail.com

#### Article History

Received: January 31, 2018

Accepted: June 04, 2018

ePublished: March 11, 2019

### ABSTRACT

Primordial germ cells (PGCs) are the specialized cells that are created from epiblast cells and after the migration differentiate into spermatogonial cells. Also, Spermatogonial cells differentiate into spermatids during the spermatogenesis process. Created disorders in each of these stages cause infertility, so the recognizing of the mechanism of these cells from the early stages of formation to the differentiation and investigating the effective factors in differentiation can be useful in the treatment of the infertile people. Today, the cultivation of spermatogonial cells and transplantation of these cells can be effective in the investigation of spermatogonial stem cell and the treatment of infertility. In this paper, the formation and migration of primordial germ cells, the spermatogenesis process and the effective factors in differentiation of spermatogonial stem cells are investigated.

**Keywords** Primordial Germ Cells; Spermatogonial Stem Cells; Cell Differentiation; Apoptosis

### CITATION LINKS

[1] New insights into male ... [2] Morphological and functional ... [3] A comparative study in twelve ... [4] Three-dimensional reconstruction ... [5] Molecular and cellular mechanisms ... [6] Culture of mouse ... [7] Spermatogonial ... [8] Bmp4 is required for ... [9] The allocation of epiblast cells to ectodermal ... [10] Mechanism of mouse germ cell ... [11] Mouse germ cell development ... [12] Molecular control of ... [13] Clonal analysis of the origin of primordial ... [14] Gene-induced embryological modifications ... [15] Developmental expression of ... [16] Stem cells from ... [17] Proliferation and differentiation of ... [18] Retinoic acid metabolism links ... [19] The spermatogonial stem cell ... [20] Transplantation of germ cells from glial cell ... [21] Physiology of testicular ... [22] Autograft of fresh and freezed ... [23] A comparison between the colony formation ... [24] Long-term culture of mouse male ... [25] The response of sandwich panels with ... [26] GDNF family receptor alpha1 ... [27] Effects of different Sertoli cell types ... [28] Homeostatic regulation of germinal stem cell ... [29] Epac is a Rap1 guanine ... [30] Conservation of spermatogonial stem ... [31] CDH1 is a specific marker for ... [32] Glial cell line-derived neurotrophic factor ... [33] The Glial Cell-Derived Neurotrophic ... [34] SMAD expression in the testis: An insight into ... [35] The gene encoding bone morphogenetic ... [36] Requirement of Bmp8b for the generation of ... [37] The bone morphogenetic ... [38] Sertoli cell condition medium can ... [39] The effects of poly L-lactic acid nanofiber ... [40] Restriction of BMP4 activity domains in the developing ... [41] Basic fibroblast growth factor is a ... [42] Reduced activation of RAF-1 and MAP ... [43] Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin ... [44] Effects of basic fibroblast growth factor ... [45] Regulation of fibroblast growth factor ... [46] The effects of rFSH and ... [47] Sertoli and germ cell development in ... [48] Evaluation of growth hormone ... [49] Follicle-stimulating hormone and androgens ... [50] The correlation of cumulus mucification ... [51] Origins and evaluation of DNA damage ... [52] Programmed cell death in animal ... [53] The machinery of programmed ... [54] Male germ cell apoptosis: Regulation and ... [55] Implementation of haemovigilance system ... [56] A morphologic approach to detect apoptosis based ... [57] A cautionary note on the use of the TUNEL ... [58] End labeling studies of fragmented ... [59] Evaluation of caspase activity in ... [60] Ordering the cytochrome c-initiated caspase ... [61] Control of apoptosis ... [62] Identification and characterization of a new ... [63] How apoptosis is regulated, and what goes ... [64] Molecular regulation of apoptosis: Genetic ... [65] Characterization of tumour necrosis factor ... [66] Testicular degeneration in Bclw-deficient ... [67] The role of p63 in germ cell apoptosis in ... [68] Promotion of cathepsin L activity in newt ... [69] Stem cell factor and leukemia inhibitory ...

## تمایز و آپوپتوز در سلول‌های زایای پستانداران

مریم سالم MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

طوبی میرزابور\* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

ابوالفضل بایرامی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

منصوره موحدین MSc

گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

## چکیده

سلول‌های زایای بدوی (PGCs) سلول‌های تخصص‌یافته‌ای هستند که از سلول‌های اپی‌بلاست ایجاد و پس از مهاجرت و تکثیر به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تبدیل می‌شوند. این سلول‌ها طی فرآیند اسپرماتوژنز به اسپرماتید تمایز می‌یابند. اختلالات ایجادشده در هر یک از این مراحل باعث ناباروری می‌شوند، با شناخت مسیرهای تولید این سلول‌ها و نیز عوامل موثر در ایجاد نقص و اختلال مسیر می‌توان به شیوه‌های مختلف اختلالات را شناسایی نمود و سپس به دنبال یک تکنیک درمانی موثر براساس ژن‌درمانی یا پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بود تا در جهت بهبود و درمان ناباروری قدم برداشت. در این مقاله تشکیل سلول‌های زایای بدوی، عوامل موثر در تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و نیز فرآیند اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت مسیرهای آپوپتوزی به‌منظور کنترل تولید سلول‌های زایا و روش‌های آزمایشگاهی برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک در شرایط کشت بررسی شد. **کلیدواژه‌ها:** سلول‌های زایای بدوی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، تمایز، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۴

\*نویسنده مسئول: dr.tooba72@gmail.com

## مقدمه

حدود ۱۰ تا ۱۵٪ زوج‌ها نابارور هستند و ناباروری مردانه حدود ۴۰٪ مشکلات ناباروری را تشکیل می‌دهند<sup>[1]</sup>. بعضی از علت‌های شکست در ناباروری مردان به‌دلیل نقص در فرآیند اسپرماتوژنز است که با اختلالات ژنتیکی، عوامل محیطی، پرتودرمانی یا استفاده از داروهای شیمی‌درمانی مثل بوسولفان، ملفان، سیکلوفسفامید و پروکاریازین در ارتباط است. علی‌رغم بسیاری از پیشرفت‌ها در شناسایی علل ناباروری، اتیولوژی در ۵۰٪ موارد هنوز ناشناخته است و به‌عنوان ناباروری با علل ایدیوپاتیک در نظر گرفته می‌شود<sup>[2]</sup>. در بیشتر از ۵۰٪ زوجین نابارور، مشکل حداقل تا حدی به بخش‌های تولیدمثلی مردان مربوط است<sup>[3]</sup>. تا به این لحظه، به بیماری‌هایی که با ناباروری به‌دلیل فقدان اسپرماتوژنز روبه‌رو هستند تنها انجماد مایع منی به‌عنوان یک استراتژی برای حفظ باروری پیشنهاد می‌شود. با این که روش مذکور یک تکنیک ساده و موثر است اما برای گروهی از بیماران (مانند بیماران مبتلا به سرطان در سن قبل از بلوغ، بیماران مبتلا به سندروم کلاین‌فلتر و غیره) نمی‌تواند استراتژی موثری باشد و این بیماران هیچ انتخابی برای حفظ باروری‌شان ندارند و حفظ سلول‌های زایای بدوی در این بیماران چالش‌برانگیز است<sup>[4]</sup>. از طرفی انجام اسپرماتوژنز کامل در شرایط "درون شیشه" برای به‌دست‌آوردن گامت‌های مردانه (اسپرم) هنوز در انسان‌ها حاصل نشده است، اگرچه تلاش‌هایی برای تولید سلول‌های زایای مردانه در موش و نیز تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسان (ESCs) در شرایط آزمایشگاهی انجام شده<sup>[5]</sup> اما هنوز محققان به‌دنبال یافتن راهی برای انجام اسپرماتوژنز کامل انسان در شرایط "درون شیشه" با استفاده از محیط‌های کشت،

فاکتورهای رشد و سیستم‌های کشت متفاوت، به‌منظور داشتن فرزندان ژنتیکی از خود بیماران هستند. بنابراین انجام تحقیقات و یافتن روش درمانی مناسب می‌تواند کمک شایانی برای درمان این بیماران محسوب شود. تحقیقات نشان داده، در صورت کشت و تمایز موفق سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت شرایط آزمایشگاهی، تولد نوزادان از موش‌های ترانس‌ژنیک مشاهده خواهد شد. در واقع سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی، یک راهکار درمانی مفید برای بازسازی بافت فراهم می‌کند<sup>[6]</sup>. بنابراین شناخت سلول‌های زایای بدوی در پستانداران و عوامل موثر بر تمایز و آپوپتوز این سلول‌ها می‌تواند راه را برای مطالعه برای تمایز این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در نهایت پیوند آنها هموار کند.

## تعین سلول‌های زایای بدوی

سلول‌های زایای بدوی از سلول‌های اپی‌بلاستی با ضخامت یک یا دو لایه سلولی نزدیک اکتودرم خارج جنینی ایجاد می‌شوند. در پستانداران هیچ پلاسم زایایی وجود ندارد و سلول‌های زایای بدوی در حین تکوین جنین، توسط سلول‌های دیگر القا می‌شوند<sup>[7]</sup>. مطالعات جنین‌شناسی نشان داده که سلول‌های پروکسیمال اپی‌بلاست هم در سلول‌های زایای بدوی و هم در مزودرم خارج جنینی یافت می‌شوند. این مطلب نشان می‌دهد که سرنوشت سلول‌های زایای بدوی از همان ابتدا مشخص نبوده و این دو، قبل از گاسترولاسیون پیش‌سلول مشترکی دارند<sup>[8]</sup>. طی مطالعات تام و ژو در سال ۱۹۹۶ مشخص شد که اگر سلول‌های اپی‌بلاستی ناحیه دیستال (مشتق‌شده از نورواکتودرم) به ناحیه پروکسیمال (مشتق‌شده از اکتودرم خارج جنینی) پیوند زده شود قادر به تشکیل سلول‌های زایای بدوی خواهند بود ولی اگر سلول‌های اپی‌بلاستی ناحیه پروکسیمال به ناحیه دیستال پیوند زده شود سلول‌های زایای بدوی شکل نخواهد گرفت. این نتایج نشان می‌دهد که ناحیه اتصالی محدود به اکتودرم خارج جنینی، قادر به تشکیل سلول‌های زایای بدوی هستند. نتایج آزمایشاتی که طی کشت سلول‌های اپی‌بلاستی موش در روزهای ۵:۵ و ۶:۷۵ تکوین جنینی صورت گرفت، نشان داد که اگر لایه تغذیه‌کننده‌ای از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (STO) طی کشت وجود داشته باشد، سلول‌های اپی‌بلاستی قادر به تولید سلول‌های زایای بدوی نخواهند بود اما اگر لایه تغذیه‌کننده، بستری از اکتودرم خارج جنینی باشد، سلول‌های زایای بدوی شکل می‌گیرند<sup>[9]</sup>.

فرآیند اسپرماتوژنز در پستانداران می‌تواند به دو فاز تقسیم شود: (۱) فاز پری‌ناتال که شامل مهاجرت سلول‌های زایای بدوی (CGP) از کیسه زرده به ستیغ‌های تناسلی و تولید ارگان بیضه است، (۲) فاز پست‌ناتال که در آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) به اسپرماتوزوآی بالغ تمایز می‌یابند. در فاز پری‌ناتال، پیش‌سازهای اسپرماتوگونی (PGCs) و پیش‌سازهای سلول‌های سرتولی تجمع یافته و طناب‌های بیضه‌ای را شکل می‌دهند<sup>[9]</sup>. SSCsها از سلول‌های زایای بدوی منشأ می‌گیرند و هنگامی که به ستیغ‌های تناسلی مهاجرت می‌کنند، گونوسیت نامیده می‌شوند. این سلول‌ها توسط سلول‌های سرتولی در حال تمایز احاطه می‌شوند. طی فرآیند تمایز، SSCsها به اسپرماتیدهای بالغ تمایز می‌یابند<sup>[6, 10]</sup>.

مطالعات نشان داده سیگنال‌های مولکولی متعددی از اکتودرم خارج جنینی موش در روز ۶:۰ تکوین جنینی ترشح می‌شود که مسئول برنامه‌دهی خطوط سلول‌های زایای بدوی هستند یکی از این سیگنال‌ها، پروتئین‌های شکل‌دهنده استخوان (Bone

سرتولی تقریباً حدود ۳۰ تا ۵۰ سلول اسپرماتوگونی در مراحل مختلف تکامل را حمایت می‌کند<sup>[4]</sup>. اسپرماتوژنز شامل سه مرحله اصلی شامل میتوز اسپرماتوگونی و تمایز آن، میوز و اسپرمیوژنز است که این مراحل به فاکتورهای تولیدی سلول‌های سرتولی بستگی دارد و به وسیله هیپوتالاموس تنظیم می‌شوند<sup>[5]</sup>.

اسپرماتوگونی‌ها به چندین دسته طبق وضعیت تمایزی تقسیم می‌شوند. دو نوع اسپرماتوگونی قابل تمایز از لحاظ مورفولوژی شامل اسپرماتوگونی A-krad و اسپرماتوگونی A pale وجود دارد. اسپرماتوگونی A-krad ویژگی‌هایی را نشان می‌دهد که گویای آن است که به عنوان سلول‌های بنیادی بیضه‌ای که خاصیت ذخیره شدن دارند عمل می‌کنند. اما اسپرماتوگونی A pale ویژگی‌های معمول یک سلول پیش‌ساز را نشان می‌دهند<sup>[15, 16]</sup>. در اکثریت موارد، سلول‌های تمایزیافته به طور مستقیم از سلول‌های بنیادی مشتق نمی‌شوند و از طریق سلول‌های پیش‌ساز این عمل صورت می‌گیرد. سلول‌های پیش‌ساز جمعیت سلولی واسطه بین سلول‌های بنیادی و تمایزیافته هستند. آنها نمی‌توانند سلول بنیادی جدید تولید کنند اما می‌توانند خودنوزایی و تمایز حاصل کنند. در واقع یک نقش هم‌وستاتیک را در حفظ نسبت بین سلول‌های در حال تکثیر و تمایز و اسپرماتوزوآ بازی می‌کنند<sup>[13, 14]</sup>. طی تکامل CSSsها، اسپرماتوگونی‌های A pale متعهد شده و A single (A<sub>s</sub>) اسپرماتوگونی را تولید می‌کنند<sup>[17]</sup>.

در بیضه موش و پستانداران، A single (A<sub>s</sub>) اسپرماتوگونی منبعی برای تولید مداوم گامت‌ها است. A single اسپرماتوگونی به دو سلول بنیادی یا دو سلول دختری تقسیم می‌شود که از طریق پل‌های سیتوپلاسمی با هم اتصال بین‌سلولی دارند و A paired (A<sub>pr</sub>) اسپرماتوگونی نام دارند. A<sub>pr</sub> اسپرماتوگونی‌ها تقسیم شده و زنجیره‌ای از ۴، ۸ و ۱۶ سلول را ایجاد می‌کنند که اتصال سیتوپلاسمی داشته و A aligned (A<sub>al</sub>) اسپرماتوگونی نامیده می‌شوند. A<sub>al</sub> اسپرماتوگونی تقسیم شده و به A<sub>1</sub> اسپرماتوگونی تبدیل می‌شود که طی شش تقسیم متوالی A<sub>2</sub>، A<sub>3</sub> و A<sub>4</sub> و سرانجام B اسپرماتوگونی را ایجاد می‌کنند. B اسپرماتوگونی‌ها از طریق تقسیم میتوز به اسپرماتوسیت اولیه تبدیل می‌شوند. هر اسپرماتوسیت اولیه، اولین تقسیم میوز را انجام داده و اسپرماتوسیت ثانویه را ایجاد می‌کند. این سلول‌ها تقسیم دوم میوز را کامل کرده و سرانجام سلول‌های هاپلوئیدی اسپرماتید را شکل می‌دهند که از طریق پل‌های سیتوپلاسمی به هم متصل هستند. سرانجام اسپرماتیدها در لبه داخلی مجرا قرار گرفته اتصالات سلولی خود را از دست داده و به اسپرماتوزوآ تمایز می‌یابند<sup>[6]</sup>. مطالعات مورفولوژیک بیضه نشان داده که از کل ۱۰ سلول بیضه بالغ، حدود ۳۵۰۰۰ مربوط به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است<sup>[7]</sup>.

به طور کلی اسپرماتوژنز فرآیندی است که در موش به ۱۲ قسمت تقسیم می‌شود، این تقسیم‌بندی براساس مراحل تکامل اسپرماتید است. در مرحله X-III سلول‌های اسپرماتوگونی‌ای A<sub>s</sub>، A<sub>pr</sub> و A<sub>al</sub> شروع به تقسیم می‌کنند. در مرحله VIII، A<sub>s</sub> و A<sub>pr</sub> و مقدار کمی A<sub>al</sub> اسپرماتوگونی حضور دارند. در مرحله X این سلول‌ها شروع به تکثیر کرده و تعدادی A<sub>s</sub> و A<sub>pr</sub> و مقدار بیشتری A<sub>al</sub> اسپرماتوگونی شکل می‌گیرد. در مرحله VII-VIII همه A<sub>al</sub> اسپرماتوگونی‌ها حاصل از تکثیر به A<sub>1</sub> اسپرماتوگونی تبدیل می‌شوند. A<sub>1</sub> اسپرماتوگونی نیز وارد فاز S شده و در مرحله IX به A<sub>2</sub> اسپرماتوگونی تبدیل می‌شوند. A<sub>s</sub>، A<sub>pr</sub> و A<sub>a</sub> اسپرماتوگونی‌ها در دوره‌های مختلفی تقسیم می‌شوند در حالی که

Morphogenetic PROTEIN-4) از خانواده فاکتورهای رشد تغییر شکل‌دهنده بتا (Transforming Growth Factor B) است. این پروتئین باعث فعال شدن مسیر alk3/r-SMAD در سلول‌های پیش‌ساز زایای بدوی و مزودرم خارج جنینی شده و نهایتاً سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی خاص و بیان ژن‌های مخصوص می‌شود<sup>[10]</sup>. موش‌های جهش‌یافته‌ای که دارای ژن‌های هموزیگوس -/smad1 و -/smad5 هستند، در اختصاصی شدن سلول‌های زایای بدوی شده نقص دارند و آلانتوئیس در آنها شکل نمی‌گیرد. القای بیان فاکتور BMP-4 سبب بیان ژن FRAGILS در طی تکوین طبیعی در سلول‌های زایای بدوی و مزودرم خارج جنینی می‌شود. موتانت‌های فاقد FRAGILS در این سلول‌ها دچار نقص می‌شوند.

در مراحل ابتدایی گاسترولاسیون در روز ۶:۲۵ تکوین جنینی تقریباً ۶ لایه از سلول‌هایی که پیش‌ساز سلول‌های زایای بدوی هستند، ژن *blimp1* را بیان می‌کنند. ژن‌هایی مانند *SRY* (Sex-determining region Y)، *box2*، فاکتور رونویسی *Nanog* و فاکتور رونویسی *Oct4* نیز موجب حفظ چندتوانی سلول‌های زایای بدوی می‌شوند. به ویژه در اکثر مطالعات از ژن *Oct4* به عنوان مارکر شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی *As* نام برده شده است<sup>[11]</sup>. براساس واکنش مثبت فسفاتاز قلیایی، مشخص شده است که در موش روز ۸-۷/۸ تکوین جنینی سلول‌های زایای بدوی، به سرعت به سمت آلانتوئیس و آندودرم جنینی حرکت می‌کنند، بعد از آن در روز ۹:۰۰ تکوین جنینی به روده خلفی رسیده و در روز ۹:۵ از روده خلفی به دیواره بدن مهاجرت می‌کنند. این سلول‌ها در روز ۱۳ تکوین جنینی به ستیغ‌های تناسلی می‌رسند. فرآیندهای تکثیر و آپوپتوز نیز طی مهاجرت اتفاق می‌افتد که براساس رسپتورهای واقع بر سطح سلول‌های زایای بدوی و لیگاندهای ترشح شده از سلول‌های سوماتیک اطراف است. تعداد این سلول‌ها در روز ۷:۲۵ تکوین جنینی حدود ۲۰ تا ۶۰ عدد است. بعد از تولد و طی مهاجرت به تکثیرشان ادامه داده، هر ۱۶ ساعت یک‌بار تکثیر می‌شوند در نهایت تعدادشان از حدود ۱۰۰ سلول در روز ۸/۵ به ۲۵۰۰۰ سلول در روز ۱۳/۵ می‌رسد<sup>[12]</sup>. سلول‌های زایا اگر طی مهاجرت اشتباهی به مکان دیگری بروند توسط فرآیند آپوپتوز حذف می‌شوند<sup>[13]</sup>.

شمینتر و راسل در سال ۱۹۵۷ طی مطالعات اولیه خود روی سلول‌های زایای بدوی نشان دادند که مسیر SCF/Kit نقش اصلی را در تولید این سلول‌ها دارد. این نتایج بعداً توسط ناکین *آل* نیز تایید شد. طبق این نتایج فاکتور سلول بنیادی (SCF) در سطح سلول‌های سوماتیک محیطی بیان می‌شود اما بیان C-Kit به طور عمده در خود سلول‌های زایای بدوی دیده می‌شود<sup>[14]</sup>. طی مطالعات هیبریداسیونی مشخص شده که C-Kit قبل و بعد از مهاجرت سلول‌های زایای بدوی به ستیغ‌های تناسلی، بیان می‌شود<sup>[15]</sup>.

### فرآیند اسپرماتوژنز

اسپرماتوژنز فرآیندی است که طی آن روزانه میلیون‌ها اسپرم بالغ در لوله‌های منی‌ساز بیضه تشکیل می‌شود<sup>[1]</sup>. لوله‌های منی‌ساز در پستانداران از سلول‌های سرتولی و رده‌های مختلف سلول‌های زاینده تشکیل شده‌اند و توسط سلول‌های میوئیدی دورلوله‌ای در بر گرفته می‌شوند. سلول‌های سرتولی در قاعده لوله قرار گرفته اما زوائد سیتوپلاسمی آنها تا مجرای لوله کشیده می‌شود و حجمی حدود ۲۰-۱۷٪ از لوله‌های منی‌ساز را شامل می‌شوند<sup>[2, 3]</sup>. هر سلول

تکثیر به سمت مرحله VII می‌رود. یک مکانیزم فیذبکی بین A4، B و AS، Apr، Aal اسپرماتوگونی‌ها وجود دارد. زمانی که تعداد A4-B اسپرماتوگونی حدود ۵۰٪ کمتر از بیضه طبیعی باشد<sup>[17]</sup>، فعالیت تکثیر AS، Apr و Aal اسپرماتوگونی به سمت مرحله VII می‌رود. تمایز از AS، Apr و Aal اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوآ حدوداً ۳۵ روز طول می‌کشد<sup>[18]</sup> (جدول ۱).

A1 و B اسپرماتوگونی در یک دوره زمانی مشخص تقسیم می‌شوند، به طور مثال A1 اسپرماتوگونی در مرحله 1X و A2 اسپرماتوگونی در مرحله VI تقسیم می‌شوند و اگر نتوانند طی آن دوره خاص تقسیم شوند، وارد آپوپتوز می‌شوند. طی ۵ تقسیم بعدی A3، A4، B اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه ایجاد می‌شود. زمانی که تعداد A4 و B اسپرماتوگونی‌ها کم باشند؛ دوره

جدول ۱) مسیر اسپرماتوژنز در اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز موش<sup>[16]</sup>

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Epithelial Stage
13	14	14	15	15	15	16	16					Spermatids
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Spermatids
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	D	Meiotic Division	Spermatocytes
					Pre L	Pre L	Pre L	L	Z	Z	P	Spermatocytes
A4 A3→m	In In→m	In	B In→m	B	↑ B→m							
						A1	A2 A1-m	A2	A3 A2-m	A3		Differentiating Spermatogonia
A-al ↑	A-al ↑	A-al ↑	A-al	A-al	A-al	A-al↑	A-al↑	(A-al)	(A-al)	A-al	A-al	
A-pr ↑↓	A-pr ↑↓	A-pr ↑↓	A-pr	A-pr	A-pr	A-pr	A-pr	↑ A-pr	↑ A-pr	↑ A-pr	↑ A-pr	Undifferentiated Spermatogonia
A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	A-s	↑↓ A-s	↑↓ A-s	↑↓ A-s	↑↓ A-s	

اسپرماتوگونی را حمایت می‌کنند<sup>[21, 22]</sup>. در واقع، ارتباط بین سلول‌های ژرمینال و سلول‌های سرتولی در تکامل بیضه و اسپرماتوژنز الزامی است و تولید اسپرم‌های سالم را تضمین می‌کند. در پی شکل‌گیری بیضه، سلول‌های زایا و سرتولی به سرعت تکثیر می‌شوند.

تحقیقات زیادی نیز نشان داده‌اند که هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی موجب تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود. در سال ۲۰۰۹ کروجی و همکاران نشان دادند که هم‌کشتی کوتاه‌مدت سلول بنیادی اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی منجر به افزایش تعداد و قطر کلنی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود<sup>[22]</sup>. محمدی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ مشخص کردند هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی در مقایسه با هم‌کشتی این سلول‌ها با سلول‌های فیبروبلاستی (به‌عنوان لایه بستری)، میزان کلنی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی را افزایش می‌دهد<sup>[23]</sup>. مطالعات شینوها<sup>را</sup> و همکاران نیز نشان داد سلول‌های سرتولی که در مجاورت اسپرماتوگونی‌ها قرار دارند فاکتورهای رشد لازم را برای رشد و تنظیم رشد آنها ترشح کرده و منجر به تکثیر و افزایش بقا در این سلول‌ها می‌شوند<sup>[24]</sup>. فاکتورهای زیادی توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود که شامل EGF، FGF2، LIF، RA، BMP، SCF، GDNF و ActivinA هستند<sup>[23]</sup>. میرزاپور و همکاران نیز نشان دادند که محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی موجب افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌شود<sup>[25]</sup>. تحقیقات دیگر آنها نشان داد که طی هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی شخص بیمار و شخص سالم، در ریزمحیط حاصل از سلول‌های سرتولی شخص بیمار پس از گذشت سه هفته از کشت، کلونی‌هایی با تعداد و قطر بیشتر مشاهده می‌شود. همچنین نسبت بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های جرم برخلاف ژن پرتوانی (Nanog) در گروه هم‌کشتی با سرتولی شخص سالم بیشتر است. پس از پیوند زونگراف سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی به موش مدل آزاوسپرمی، این

## تنظیم‌کننده‌های اسپرماتوژنز

### نقش سلول‌های سرتولی و فاکتورهای مترشحه آن بر اسپرماتوژنز

هر مرحله از اسپرماتوژنز توسط ترکیبات ریزمحیط (nich) بیضه کنترل می‌شود. ریزمحیط عمدتاً ترکیبی از سلول‌های سوماتیک است که در آن سلول‌های سرتولی تولیدکننده فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و رگ‌های خونی حضور دارند. ترکیبات کلیدی nich عمدتاً توسط سلول‌های سرتولی تولید می‌شود که حمایت ساختاری، ایمونولوژیکی و غذایی سلول‌های اسپرماتوگونی را بر عهده دارند<sup>[19, 20]</sup>. سلول‌های سرتولی اولین بار در سال ۱۸۶۵ توسط یک دانشمند ایتالیایی کشف شد<sup>[21]</sup>. این سلول‌ها در غشای پایه لوله‌های منی‌ساز قرار داشته و حجمی حدود ۱۷ تا ۲۰٪ لوله‌های منی‌ساز را شامل می‌شوند. نقش کلیدی سلول‌های سرتولی در تنظیم رشد سلول‌های زایا از طریق اتصالات محکمی است که به هم داشته و باعث ایجاد سد خونی-بیضه ای می‌شوند. سد خونی-بیضه‌ای دارای سه عملکرد اصلی است که شامل موارد ذکر شده است: ۱) به‌عنوان سد آناتومیکی عمل کرده و ورود مولکول‌ها و سلول‌های زایا از ناحیه قاعده به لومن لوله‌های منی‌ساز را محدود می‌کند که در واقع ارتباطشان را با عروق خونی و اندوتلیال لنفاتیکی مسدود می‌کند، ۲) به‌عنوان سد ایمونولوژیکی عمل کرده و اسپرماتوسیت و اسپرماتیدها را از سیستم ایمنی جدا می‌کند. اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها در دوران بلوغ ظاهر می‌شوند که قبل از آن به‌عنوان سلول‌های خودی مطرح بودند و حال به‌عنوان سلول خارجی می‌باشند که توسط سد خونی-بیضه محفوظ می‌ماند و در مجرای اپیدیدیم ذخیره می‌شوند، ۳) به‌عنوان سد فیزیولوژیکی عمل کرده و شامل ترانسپورت‌ها و کانال‌هایی هستند که ریزمحیط لازم برای رشد سلول‌های زایا به اسپرم را فراهم می‌آورد. زمانی که سد خونی-بیضه فاقد عملکرد شود در این حالت تمایز سلول‌های زایا متوقف می‌شود<sup>[21]</sup>. سلول‌های سرتولی توسعه جمعیت اسپرماتوگونی‌ها را نیز محدود می‌کنند. از آنجایی که تعداد سلول‌های سرتولی اندازه بیضه را تعیین می‌کند، فرض بر این است که هر سلول سرتولی یک تعداد تعیین‌شده‌ای از سلول‌های زایا و

به تجمع اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته شود و برعکس خاموش کردن ژن *GDNF* منجر به تخلیه اسپرماتوگونی‌ها می‌شود که نشان‌دهنده این است که *GDNF* یک فاکتور ضروری برای خودنوزایی و حفظ SSCs در شرایط "درون شیشه" است [19].

### اثرات پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMPs)

پروتئین مورفوژنتیک استخوان گروهی از سیتوکین‌ها از سوپرخانواده  $TGF\beta$  است که باعث فعال‌سازی مسیر SMAD می‌شود. طی مطالعاتی که کاترین/ایتمون و همکاران انجام دادند مشخص شد که *SMAD1, 5, 8* در طول تمایز اسپرماتوگونی نقش دارد. *SMAD6* در اسپرماتوسیت‌ها و *SMAD7* در اسپرماتیدها مشاهده می‌شود [34]. مطالعات نشان داده است که ۵۰٪ موش‌هایی که فاقد *BMP8* هستند بیضه کوچک دارند و اسپرماتوگونی‌ها در آنها دچار آپوپتوز می‌شوند [35]. همچنین مطالعات دیگر نشان داده است که موش‌های ترانسژنیک *BMP8-/-* و *BMP4-/-* فاقد اسپرماتوگونی هستند. همچنین *BMP4, 8* باعث القای اختصاصی شدن سلول‌های زایای بدوی از اپی‌بلاست می‌شود. پس *BMP* در تمایز و تکثیر سلول‌های زایای بدوی نقش اساسی دارد [36]. در تحقیقات دیگری، شیماساکی و همکاران مشاهده کردند که *BMP4* شکل‌گیری جرم‌سل ابتدایی را در اپی‌بلاست افزایش می‌دهد [37]. مطالعات نشان دادند که *BMP4* به‌وسیله سلول‌های سرتولی بعد تولد تولید می‌شود و بیان *C-Kit* را در سلول‌های اسپرماتوگونی تحریک می‌کند [38]. در حالی که در مطالعه دیگر نشان دادند که *BMP4* به‌طور غالب در اسپرماتوگونی بیان می‌شود و *RA* نیز بیان *BMP4* را در خطوط جرم‌سل بیان می‌کنند [39]. هو و همکاران نشان دادند که *mRNA* مربوط به *BMP4* در اسپرماتوسیت‌ها و سلول‌های سرتولی بیان می‌شوند. *BMP4* پاسخ‌های سلولی را به‌وسیله اتصال و فعال‌سازی به گیرنده‌های غشایی پیچیده هتروتترامریک نوع ۱، *ALK1*، *ALK2* و *(BMPRII) (ALK3 ALK6)* ایجاد می‌کند. بعد آزادسازی رسپتور، انتقال پیام پروتئین‌های *BMP4* و *BMP8b* به ترتیب در کنترل پروتئین‌های *SMAD1* و *SMAD5* درگیر هستند. در موش، جهش در ژن *BMP4* موجب ناباروری یا کم‌باروری در جنس نر می‌شود. *BMP4*‌ها برای قرارگیری و حفظ گنادهای تناسلی لازم هستند [40].

### اثرات فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF)

فاکتور رشد فیبروبلاست که از طریق سلول‌های لاییدیک و سرتولی و بعضی اسپرماتوگونی‌ها تولید می‌شود در تکثیر اسپرماتوگونی نقش دارد. فاکتور *FGF2* وابسته به مسیر *MAPK1* است که از طریق افزایش بیان ژن‌های *ETV5* و *BCL2* موجب افزایش خودنوزایی می‌شود [41]. سلول‌های سرتولی منبع عمده‌ای از لاکتات هستند و چندین مکانیزم را تنظیم می‌کنند. سلول‌های سرتولی لاکتات ابتدایی را از گلوکز تولید می‌کنند، قسمتی از گلوکز از فضای خارج سلولی و از طریق انتقال‌دهنده گلوکز *GLUTs* وارد سرتولی می‌شود. لاکتات‌دهیدروژناز (*LDH*) نقش مهمی برای فراهم‌کردن لاکتات برای اسپرماتوگونی‌ها و تکامل آنها دارد [22]. بعد از ۱۲ ساعت تیمار سلول سرتولی با *FGF2* نشان داده شد که سطح *mRNA GLUTs* افزایش می‌یابد. همچنین طی مطالعات هوانگ و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان داده شد که *FGF* در تنظیم *mRNA* لاکتات‌دهیدروژناز نیز نقش دارد. طی مطالعات جیلارد و همکاران در سال ۱۹۸۷ نیز

سلول‌ها روی قاعده لوله‌های منی‌ساز موش مستقر شدند که این مساله ماهیت آنها را تایید کرد [26]. بازم و همکاران اثرات انواع مختلف سلول‌های سرتولی را بر حفظ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بالغین در شرایط "درون شیشه" را بررسی نمودند. آنها اثرات سلول‌های سرتولی بالغین، سلول‌های سرتولی جنینی و یک رده سلولی سرتولی (*4MT*) را به‌عنوان لایه‌های تغذیه‌کننده روی بیان ژن‌های SSCs مقایسه نمودند. نتایج یافته‌های آنها نشان داد که سلول‌های سرتولی جنینی برای کشت SSCs در شرایط آزمایشگاهی مفید هستند و می‌توانند خودنوزایی سلول‌های بنیادی را بهبود بخشند [27].

### اثرات GDNF

فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از رده سلولی گلیال یک فاکتور نوروتروفیکی است که به‌وسیله سلول‌های گلیال در مغز و دیگر اندام‌ها مثل تخمدان و بیضه (از سلول‌های سرتولی) تولید می‌شود. گزارشات نشان داده *GDNF* یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رشد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که باعث تکثیر اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته در هر دو حالت "درون محیط زنده" و "درون شیشه" می‌شود. طبق آزمایشات تادوکورو و همکاران در سال ۲۰۰۱، *FSH* باعث تنظیم بیان *GDNF* و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود و تستوسترون نیز در بیان *GDNF* تاثیر ندارد [28]. در سال ۲۰۰۰ نیز منی و همکاران مشخص کردند بیان بیش از اندازه *GDNF* موجب نازایی و تومور بیضه در دوران بلوغ می‌شود [20]. طی آزمایشات آنیانیبوگیو در سال ۲۰۰۵ نیز بیان رسپتور *GFR1A* در این سلول‌ها تایید شد و از آنتی‌بادی *GFR1A* برای خالص‌سازی اسپرماتوگونی با روش *MACS* استفاده شد، طی این جداسازی حدود ۹۰٪ سلول‌های اسپرماتوگونی نوع *A* خالص‌سازی شدند [26]. نتایج کار در روجی-هوکین و همکاران منجر به بیان این فرضیه شد که تمایز اسپرماتوگونی به اسپرماتوسیت یا اسپرماتید از طریق تنظیم بیان *GDNF* است. همچنین مسیرهایی که توسط *GDNF* فعال می‌شود؛ شامل مسیرهای سیگنالینگ *Src*، *RAS* و *notch* است [29]. در حالی که در موش‌های بیان‌کننده ژن *GDNF*، اسپرماتوگونی‌های نوع *Apr* و *Aal* مشاهده شد [28]. تحقیقات دیگر نشان دادند که قراردادن سلول‌های اسپرماتوگونی تحت شرایط کشت با مدیوم حاوی *GDNF*، باعث شکل‌گیری کلنی‌های سلول‌های زاینده می‌شود که پیوند این سلول‌ها موجب بازسازی اسپرماتوژنز در بیضه‌های موش‌های عقیم می‌شود [30]. لیگاند *GDNF* در سلول‌های سرتولی بیان می‌شود در حالی که رسپتورهای *C-Ret* و *CFRα 1* در اسپرماتوگونی بیان می‌شود. *GDNF* خود موجب فعال‌سازی مسیر *mapK* و *PI3K/AKT* می‌شود [31]. همچنین *وتالی* و همکاران با استفاده از *DNA* میکروآری گزارش کردند که *GDNF* بیان برخی ژن‌ها را تنظیم می‌کند، به‌طوری که بیان برخی ژن‌ها تحت تاثیر *GDNF* افزایش و بیان برخی ژن‌ها کاهش می‌یابد. به‌طور کلی حدوداً بیان ۷۹ ژن تحت تاثیر *GDNF* تقریباً دوبرابر افزایش می‌یابد که بیشترین تاثیر را در افزایش بیان سه ژن *Lim1* و *Etv5* دارد [32]. از طرفی تحقیقات مبین‌ونگ و همکاران نیز نشان داد که توقف در *G2/M* موجب توقف در چرخه سلولی در مسیر *ERK1/2* سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود. بنابراین *GDNF* برای تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی لازم است [33]. در یک مطالعه نشان داده شده که بیان بیش از حد *GDNF* می‌تواند منجر

مشخص شد که FGF موجب افزایش رسپتور FSH می‌شود، سپس FGF با همکاری FSH فعالیت‌های مربوطه را انجام می‌دهد [42]. فاکتورهای دیگر مثل فاکتور مهاری لوکمیا (LIF)، فاکتور رشد اپی‌تلیالی (EGF) و فاکتور سلول بنیادی (SCF) نیز در تنظیم اسپرماتوژنز نقش دارد. مخصوصاً SCF/Kit موجب القای سنتز DNA اسپرماتوگونیای نوع A می‌شود. عدم عملکرد ژن Stel (SI) که کدکننده SCF یا لوکوس W که کدکننده kit است، موجب نقص در تمایز می‌شود. در این موارد تکثیر نیز صورت می‌گیرد [43]. طی بررسی‌های صورت‌گرفته در تحقیقات ما نیز بیشترین تعداد کلنی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در سلول‌های تیمار شده با سلول‌های سرتولی به همراه غلظت‌های مختلف FGF و LIF در مقایسه با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تیمار شده با سلول‌های سرتولی به‌تنهایی، مشاهده شد و این نتایج نشان می‌دهد که FGF و LIF عامل موثری در تکثیر سلول‌های زایای بدوی هستند [44]. همچنین تحقیقات من‌ونگ و همکاران نیز نشان داد که FGF8 در تنظیم تعادل بین خودنوزایی و تمایز جرم‌سل‌ها نقش دارند [45].

**اثرات و مسیر سیگنالینگ هورمون‌های FSH و تستوسترون در رت**  
شروع و بقای اسپرم‌سازی از لحاظ هورمونی توسط FSH و تستوسترون صورت می‌گیرد. برخی تحقیقات نشان داده است که تستوسترون هورمون اصلی اسپرمیوژنز در پستانداران بوده و FSH چندان نقشی ندارد [45]. با تحقیقات آجین و همکاران مشخص شد که FSH نقش مهمی در این فرآیند داشته و سبب تراکم هسته، مهاجرت محیطی و برجستگی هسته در اسپرماتیدهای انسان می‌شود. تسریع تقسیمات هسته، تراکم و طول‌شدن اسپرماتید گرد، به FSH وابسته است [46]. همچنین در موش‌هایی که به‌صورت ترانس ژنیک در معرض ژن *FSH* انسانی قرار گرفتند و تستوسترون در آنها از طریق پوستی جذب شد؛ وزن بیضه در مقایسه با گروهی که فقط FSH دریافت کرده بودند حدود ۳۰٪ افزایش یافت. در این موش‌ها تکثیر سلول‌های سرتولی نیز افزایش یافته بود [47]. مطالعات *تایپانین* و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان داد که FSH در کنترل آپوپتوز موثر بوده و در حفظ اسپرمیوژنز نقش دارد [48]. مراحل VII-VIII در اسپرماتوژنز تحت تاثیر FSH بوده که مربوط به تکامل اسپرماتید و اسپرماتوسیت است [49]. FSH همچنین در تشکیل لوله‌های منی‌ساز بیضه و تعیین ضخامت و اندازه آنها تاثیر دارد. تستوسترون نیز در فرآیند اسپرماتوژنز و فیزیولوژی اسپرم و عملکرد آن ضروری است. تحقیقات *ایسارین تانابونیاوات* و همکاران نشان داد که غلظت ۱۰-۴/۵۱ نانومول بر لیتر نقش موثری در حرکت اسپرم در بیماران آستنو آرواسپرما دارد [50].

مسیر پیام‌رسانی تستوسترون و FSH در سلول‌های سرتولی در برخی مسیرها به‌صورت تعامل با هم صورت می‌گیرد [51]. مسیر سیگنالینگ تستوسترون از طریق دو مسیر کلاسیک و غیرکلاسیک صورت می‌گیرد. در مسیر کلاسیک، تستوسترون از غشای پلاسمایی عبور کرده و به آندروژن رسپتورهای (AR) موجود در سیتوپلاسم اتصال می‌یابد. AR درون سیتوپلاسم به پروتئین‌های شوک حرارتی اتصال دارد که با اتصال تستوسترون، دچار تغییر شکل و از پروتئین‌های شوک حرارتی جدا شده و به هسته رفته و به جایگاه اختصاصی DNA که عناصر پاسخ به آندروژن نام دارند، اتصال یافته و موجب بیان ژن و تغییر عملکرد سلول می‌شود [2].

مسیر غیرکلاسیک تستوسترون در نهایت موجب فسفریله‌شدن زیرواحد سرین ۱۳۳ از عامل رونویسی CREBP می‌شود.

فسفریله‌شدن این زیرواحد CREBP در حفظ و بقای اسپرماتوسیت‌ها بسیار مهم است و عدم فسفریلاسیون موجب مرگ اسپرماتوسیت و کاهش ۷۰٪ اسپرماتیدها می‌شود. فعال‌سازی مسیر غیرکلاسیک تستوسترون از طریق سه مسیر صورت می‌گیرد: مسیر اول مسیر غیرکلاسیک تستوسترون از طریق فعال‌سازی  $G_{\alpha s}$  است. اتصال تستوسترون به گیرنده موجب فعال‌سازی  $G_{\alpha s}$  و سپس فعال‌شدن آنزیم شدن آنزیم آدنیلات سیکلاز می‌شود. این آنزیم موجب تولید آدنوزین‌مونوفسفات حلقوی (cAMP) از ATP شده که منجر به فعال‌شدن پروتئین‌کیناز A (PKA) می‌شود. PKA هم خود به‌طور مستقیم موجب فسفریله‌شدن عامل رونویسی CREBP می‌شود و هم باعث فعال‌شدن Ras شده و سپس به‌ترتیب Raf، p90<sup>Ask</sup>، MEK و ERK فعال شده و در نهایت موجب فسفریلاسیون CREBP می‌شود. مسیر دوم، مسیر غیرکلاسیک تستوسترون از طریق فعال‌سازی  $G_{\alpha q}$  است. اتصال تستوسترون به گیرنده باعث فعال‌سازی  $G_{\alpha q}$  و سپس فعال‌شدن آنزیم فسفولیپاز C (PLC) می‌شود. این آنزیم موجب تبدیل فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴ و ۵ بیس‌فسفات (PIP2) به دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) و اینوزیتول ۱، ۴ و ۵ تری‌فسفات (IP3) می‌شود. دی‌آسیل‌گلیسرول نیز موجب خروج کلسیم از شبکه آندوپلاسمی شده و در نهایت کلسیم باعث فعال‌شدن Ras و فسفریله‌شدن CREBP می‌شود. مسیر سوم، مسیر غیرکلاسیک تستوسترون از طریق فعال‌سازی Src و با تعامل AR است [4، 7].

AR علاوه بر نقش خود در مسیر غیرکلاسیک تستوسترون در مسیر کلاسیک هم نقش دارد. اتصال تستوسترون به AR درون سیتوپلاسم موجب فسفریلاسیون Src می‌شود و Src نیز موجب فعال‌سازی Ras و فسفریله‌شدن CREBP می‌شود [3].

مسیر سیگنالینگ هورمون FSH از طریق پنج مسیر صورت می‌گیرد. اتصال FSH به گیرنده مانند تستوسترون، باعث فعال‌سازی  $G_{\alpha s}$  و سپس فعال‌شدن آنزیم آدنیلات سیکلاز می‌شود. این آنزیم موجب تولید آدنوزین‌مونوفسفات حلقوی (cAMP) از ATP شده که منجر به فعال‌شدن پروتئین‌کیناز A (PKA)، فسفولیپاز A2 (PLA2) و فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳- کیناز (PI3) می‌شود. در مسیر اول، PKA موجب فعال‌شدن Ras شده و سپس به‌ترتیب موجب فعال‌شدن Raf، MEK، ERK و در نهایت موجب فسفریلاسیون CREBP می‌شود. این مسیر در ۱۵ روز بعد تولد فعال می‌شود و موجب تکثیر سلول‌های سرتولی می‌شود. در مسیر دوم، PKA خود مستقیماً موجب فسفریلاسیون CREBP می‌شود. در مسیر سوم، PLA2 فعال شده که باعث آزادسازی آراشیدونیک‌اسید و پروستاگلاندین E2 می‌شود که در فعالیت‌های سلولی ضروری است. در مسیر چهارم، PI3 کیناز فعال شده و باعث فعال‌شدن پروتئین‌کیناز B (PKB) می‌شود. PKB موجب فعال‌شدن گلیکوژن سنتتاز کیناز ۳ (GSK-3) شده که آن هم موجب بقای جرم‌سل‌ها می‌شود. در مسیر پنجم، نیز FSH موجب بازشدن کانال‌های کلسیمی غشای پلاسمایی شده و کلسیم سیتوپلاسم افزایش می‌یابد. کلسیم با اتصال به کالمودولین موجب فعال‌سازی CAM کیناز شده که آن هم باعث فسفریلاسیون CREBP می‌شود [4-6].

بنابراین آسیب DNA اسپرم یا ساختار کروماتین آن می‌تواند در هر مرحله از اسپرماتوژنز رخ دهد. در تخمک‌های لقاح‌یافته با اسپرم‌های دارای آسیب بالای DNA، میزان لانه‌گزینی و بارداری به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. در صورت وجود آسیب‌های زیاد،

مشاهده نمود. میکروسکوپ نوری توانایی کمی برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک و تمایز آن از نکروز دارد. میکروسکوپ فلورسانس دقت بیشتری داشته و از رنگ‌های هسته‌ای فلورسانس از قبیل هوخست-۳۳۲۵۸، DAPI، آکریدین‌ارنج می‌توان برای بررسی تغییرات هسته‌ای استفاده کرد. مطالعه با میکروسکوپ الکترونی تست استاندارد طلائی برای تمایز آپوپتوز از نکروز است [56]. سومین گام در بررسی آپوپتوز ارزیابی فراگمانتاسیون DNA است. برای این منظور روش‌های مختلفی وجود دارد. روش TUNEL اولین بار در سال ۱۹۹۲ توسط گاوریلی و همکاران معرفی شد. این روش بر مبنای اتصال اختصاصی داکسی‌نوکلئوتیدیل‌ترانسفراز انتهای (TdT) به انتهای OH-۳ موجود در DNA قطعه‌قطعه شده است. این آنزیم سبب قراردادن نوکلئوتیدهای نشان‌دار در محل شکست DNA می‌شود. با استفاده از آویدین نشاندار با پراکسیداز که به بیوتین متصل می‌شود، می‌توان سلول‌های نشان‌دار را با میکروسکوپ نوری، فلورسانس، فلوسیتومتری یا ایمونوهیستوشیمی شناسایی کرد [57]. روش چهارم بررسی الگوی نردبانی DNA در فرآیند آپوپتوز است. همان‌طوری که می‌دانیم طی فرآیند آپوپتوز شکست بین نوکلئوزومی توسط اندونوکلئازها رخ می‌دهد که منجر به ایجاد قطعات ۱۸۰ تا ۲۰۰ جفت‌بازی می‌شود. در این روش DNA از سلول یا هموزن بافتی استخراج و سپس در ژل آگارز الکتروفورز می‌شود. در فرآیند آپوپتوز الگوی نردبانی DNA مشاهده می‌شود. در نکروز شکست تصادفی DNA اتفاق می‌افتد و در ژل آگارز به صورت اسمیر دیده می‌شود [58]. در روش پنجم با بررسی فعالیت کاسپازها می‌توان مسیرهای داخلی یا خارجی آپوپتوز را مشخص نمود [59].

#### مولکول‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز

Bcl-2 یک پروتئین غشایی است که اساساً در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد. در پستانداران ۱۹ عضو از خانواده Bcl-2 شناسایی شده است که با توجه به فعالیت و ساختار به سه دسته تقسیم می‌شوند: (۱) اعضای ضدآپوپتوز که شامل حداقل دو موتیف حفاظت‌شده Bcl-2، Bcl-XL هستند، (۲) اعضای پروآپوپتوز که شامل چهار دسته حفاظت‌شده شامل Bax، Bak و غیره هستند، (۳) پروتئین‌های Bin، Bad [60].

دومین دسته مولکول‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز کاسپازها هستند. این مولکول‌ها جزء خانواده سیستئین‌پروتئین‌ها بوده که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نمایند. به دنبال فعال شدن، این آنزیم‌ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک ایجاد می‌نمایند. این واکنش آبخاری با فعال شدن کاسپازهای آغازگر شروع شده و پیام از طریق فعال شدن کاسپازهای اجرایی منتقل می‌شود. چیزی که در آپوپتوز بیشتر حائز اهمیت است تقسیم‌بندی کاسپازها به دو گروه کاسپازهای آغازگر (کاسپازهای ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲) با پرودمین طویل و کاسپازهای اجرایی (کاسپاز ۳، ۶ و ۷) با پرودمین کوتاه می‌باشند [60]. سومین دسته مولکول‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز مولکول‌های p۵۳ هستند. این مولکول مهارکننده چرخه تکثیر سلولی است و آن را محافظ ژنوم می‌نامند. این مولکول با ایجاد وقفه در مرحله G۲ موجب مهار چرخه سلولی شده با القای آپوپتوز از ایجاد تومور جلوگیری می‌کند. تخریب DNA عامل اصلی فعالیت این مولکول است. پس از آسیب DNA بسیاری از سلول‌ها وارد توقف پایدار (مرحله G۲) در چرخه سلولی می‌شوند. بوئر و همکاران

احتمال کاهش رشد جنین وجود داشته و اگر میزان نقص‌ها کمتر باشد، می‌تواند نقایص بعد از تولد را به همراه داشته باشد. یکی از علل آسیب به DNA اسپرم فرار از آپوپتوز است به این صورت که وجود مارکرهای آپوپتوز در مایع منی نشان‌دهنده تولید اسپرم غیرطبیعی است که از فرآیند آپوپتوز فرار کرده و منجر به بیان نشانگرهای آپوپتوز شده است [51].

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب‌دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و همئوستاز بافتی ضروری است. هر گونه اختلال در روند آپوپتوز، موجب بیماری، رشد سلول‌های سرطانی یا اختلالات خودایمنی می‌شود [52]. در سلول آپوپتوزی اجسام آپوپتوزی که شامل قسمتی از سیتوپلاسم، هسته و ریبوزوم در وزیکول‌های پلاسمایی است مشاهده می‌شود. این وزیکول‌ها خیلی سریع توسط فاگوسیت‌ها مثل ماکروفاژها یا سلول‌های اپیتلیال مجاور شناسایی و هضم می‌شوند؛ بدون این که پاسخ التهابی ایجاد کنند. در آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی طی تحریکات خاصی اتفاق می‌افتد. در حالی که نکروز مرگ پاتولوژیک سلول بوده و طی آسیب‌های شدید به سلول از قبیل هیپوکسی، هیپرترمی و سموم خارجی، این نوع مرگ سلولی رخ می‌دهد. آپوپتوز فرآیند فعالی بوده و به انرژی وابسته است. در این فرآیند تراکم کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته مشاهده می‌شود [53].

#### عوامل موثر در آپوپتوز سلول‌های زایای بدوی

**مواد سمی:** تحقیقات نشان داده است که برخی مواد شیمیایی موجب افزایش آپوپتوز می‌شود. به‌عنوان مثال اتان‌دی‌متان‌سولفانات موجب کاهش سطح تستوسترون و کاهش تعداد سلول‌های زایا شده است. نیتروبنزن موجب آپوپتوز سلول‌ها در گونوسیت‌های جنینی و بیضه بالغ شده، اتانول نیز موجب تجزیه و تخریب سرتولی‌ها و سلول‌های زایا شده است. همچنین داروی بوسولفان منجر به آسیب سلول‌های زایا و لاییدیک می‌شود.

**هورمون‌ها:** هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در بقای سلول‌های زایا نقش دارند که هر دو حالت افزایش و کاهش این هورمون‌ها باعث القای آپوپتوز می‌شود.

**دما:** جایگاه بیضه موجب شده دمایش پایین‌تر از دمای بدن باشد بنابراین افزایش دما باعث آپوپتوز سلول‌های زایا می‌شود. مطالعات نشان داده که هر دو مسیرهای آپوپتوزی داخلی و خارجی در آپوپتوز ناشی از افزایش دما فعال هستند [54].

#### روش‌های علمی سنجش آپوپتوز سلول‌های زایا

مهم‌ترین نکته‌ای که می‌بایست در نظر گرفته شود انتخاب درست تکنیک سنجش آپوپتوز بر مبنای نوع مطالعه (روی سلول یا بافت)، القاکننده مورد نظر، مکانیزم مورد بررسی و سازگاری حساسیت و اختصاصی بودن نتایج بر مبنای تعداد سلول یا غلظت آنالیت مورد سنجش است. بررسی سیتوتوکسیته اولیه گام در بررسی آپوپتوز است. با این روش میزان مرگ سلولی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این روش قادر به تمایز آپوپتوز از نکروز نیست اما درصد سلول‌های زنده یا مرده نسبت به شاهد به دست می‌آید. دو روش متداول بررسی سیتوتوکسیته به روش MTT و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو است [55]. دومین گام برای سنجش آپوپتوز بررسی‌های مورفولوژیک شامل ارزیابی چروک شدن سلول، تراکم کروماتین، قطعه‌قطعه شدن هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک است. با میکروسکوپ نوری می‌توان تراکم کروماتین و اجسام آپوپتوتیک را

سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی از قبیل کاسپاز ۳ و ۷ می‌شود، مجموعه پروتئین Apaf-1، سیتوکروم C و پروکاسپاز ۹ را آپوپتوزوم می‌نامند [63].

خانواده Bax در آپوپتوز سلول‌های زایا حایز اهمیت است به طوری که بیان کم BCL-2 و بیان بالای Bax باعث افزایش مرگ آنها می‌شود. پروتئین‌های ضدآپوپتوزی Bcl-x با اتصال به Bim به فعالیت آن را مهار می‌کند. باز پروتئین دیگری مثل Bad می‌تواند با اتصال به Bcl-x مهار را از روی Bim بردارد و به بردارنده مهار موسوم است. پروتئین p۵۳ باعث افزایش بیان Bax و در نهایت باعث افزایش آپوپتوز می‌شود. مسیر خارجی آپوپتوز در بیضه توسط پروتئین‌های Fas-L کنترل می‌شود. تحقیقات نشان داده است موش‌هایی که فاقد مسیر Fas-L هستند، افزایش قابل توجهی در وزن بیضه دارند. همچنین بیان بیش از اندازه این پروتئین، موجب هیپواسپرماتوگونی و سندروم سرتولی در بیضه شده است [64].

گراتادی و همکاران ثابت کردند لیگاند الفاکندنده آپوپتوز، فاکتور رشد نکروزی نوع آلفا (TNF $\alpha$ ) است که رسپتورهایش در انواع اسپرماتوگونی‌ها متفاوت است [65]. همچنین بعضی از اعضای خانواده BCL2 مثل Bax، Bak، Bim در حالتی که DNA آسیب‌دیده باشد منجر به آپوپتوز می‌شوند [66]. طی مطالعات پتر-لیزار و همکاران پروتئین P63 که از مارکرهای اختصاصی اسپرماتوسیت اولیه است و در مراحل VII-XI دیده می‌شود موجب افزایش تعداد گونوسیت‌ها و کاهش آپوپتوز می‌شود [67]. از طرفی تحقیقات کنتا و فوجیموتو و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که مرگ سلول‌های اسپرماتوگونی با وسیله بالا بودن غلظت پرولاکتین پلاسما (PRL) و به دنبال انتقال حیوان به دماهای پایین اتفاق می‌افتد. چندین گزارش نیز در مورد القای آپوپتوز توسط خانواده کاسپاز وجود دارد. بیان کاسپاز ۳ منجر به آپوپتوز می‌شود [68]. همچنین مطالعات پس و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان داد که SCF و LIF دو فاکتوری هستند که موجب کاهش آپوپتوز سلول‌های زایا بدوی می‌شوند. آنها با جداسازی سلول‌های زایای بدوی در روزهای ۱۷/۵ و ۱۲/۵ از مسیر مهاجرت و کشت این سلول‌ها مشاهده کردند که سریعاً آپوپتوز رخ می‌دهد اما تحت تاثیر ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF، و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر LIF در کشت در کشت طی ۱۶ تا ۱۸ ساعت، تعداد سلول‌های زایای بدوی ۴۰٪ تا ۳۹٪ افزایش یافته مقدار آپوپتوز کاهش می‌یابد [69].

از آنجایی که مطالعه حاضر یک مطالعه مروری بود بنابراین در دسترسی به فایل کلی برخی از منابع مشکلاتی وجود داشت که مجبور به مکاتبه با نویسندگان مقاله و دریافت مقاله از طریق ایمیل مولفین مسئول شدیم. پیشنهاد می‌شود در آینده مسیرهای آپوپتوزی از نگاه مولکولی و مسیرهای مولکولی نکروز مورد بررسی قرار گیرند.

### نتیجه‌گیری

اختلالاتی که در مراحل پیدایش، تکثیر، تمایز سلول‌های زایای بدوی یا اسپرماتوگونی‌ها ایجاد می‌شوند، می‌تواند منجر به نقص یا عدم باروری شود. با شناخت مسیرهای تولید این سلول‌ها و نیز عوامل موثر در ایجاد نقص و اختلال مسیر می‌توان به شیوه‌های مختلف اختلالات را شناسایی نمود و سپس به دنبال یک تکنیک درمانی موثر براساس ژن‌درمانی یا پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بود تا در جهت بهبود و درمان ناباروری قدم برداشت.

در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که این توقف تنها در حضور p۵۳ اتفاق می‌افتد، p۵۳ سبب بیان پروتئین p۲۱ می‌شود. p۲۱ یک مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین است. در صورت اختلال در ژن‌های p۵۳ و p۲۱ به دنبال آسیب‌های سلولی، سلول‌های معیوب به چرخه سلولی ادامه می‌دهند. بنابراین p۵۳ و p۲۱ در حقیقت نقاط کنترل G۲ هستند [61].

### مسیرهای آپوپتوز

آپوپتوز در سلول‌های زایا از دو مسیر اصلی خارجی (رسپتوری) و داخلی (میتوکندریایی) صورت می‌گیرد. همچنین مسیرهای دیگر شامل مسیر پرفورین/گرانزیم A و B و مسیر p۵۳ نیز در بیضه منجر به آپوپتوز می‌شود.

مسیر خارجی آپوپتوز توسط رسپتورها صورت می‌گیرد. رسپتورهای مرگ، رسپتورهای سطحی سلول هستند که پیام را از طریق لیگاندهای مخصوص انتقال می‌دهند و آبشار کاسپازی را فعال می‌کنند. مهمترین رسپتورهای مرگ، خانواده رسپتوری فاکتور رشد نکروز توموری (TNF) هستند. وقتی این رسپتورها به لیگاند خود مثل TNF $\alpha$ ، لیمفوتوکسین، FasL متصل می‌شوند، مرگ سلولی رخ می‌دهد. در واقع اتصال لیگاند TNF- $\alpha$  به رسپتور خود موجب اتصال بعضی مولکول‌های داخل سلولی به رسپتور شده و در نهایت از طریق یک سری واکنش‌ها رسپتور به پروکاسپاز ۸ متصل می‌شود. تجزیه و تبدیل پروکاسپاز ۸ به فرم فعال آن باعث راه‌اندازی آبشار کاسپازی می‌شود. در مرحله بعد، کاسپاز اجرایی ۳ فعال و به نوبه خود موجب فعال‌سازی سایر کاسپازهای اجرایی و پیشرفت چرخه آپوپتوز می‌شود [62].

مولکول‌های خانواده Bcl-۲ مسیر داخلی یا میتوکندریایی آپوپتوز را کنترل می‌کنند. سایر اعضای این خانواده فعالیت Bax و Bak را القا می‌کنند و سبب القای نفوذپذیری غشای میتوکندریایی و خروج سیتوکروم C از میتوکندری می‌شوند. محل استقرار Bax و Bak قبل از ارسال پیام مرگ متفاوت است. Bak به غشای رتیکیلولاندوپلاسمی متصل است، در حالی که Bax به صورت منومر در سیتوزول حضور دارد. پیام آپوپتوز آنها را روی غشای میتوکندری به هم نزدیک می‌کند.

آپوپتوز فرآیندی است که به صورت دائم، در مراحل ابتدایی تکوین بیضه و در بلوغ صورت می‌گیرد و در ایجاد تعادل بین تکثیر و مرگ سلول‌های موجود در لوله‌های منی‌ساز از اهمیت خاصی برخوردار است. پروتئین Bim به عنوان فعال‌کننده آپوپتوز در سلول‌های زایا پروتئین‌های کانالی Bax و Bak را در غشای خارجی میتوکندری به هم نزدیک می‌کند و با الیگومریزاسیون آنها منافذی در غشای خارجی میتوکندری ایجاد می‌شوند که باعث رهاسازی سیتوکروم C از این کانال می‌شود. Apaf-1 در حالت عادی در سلول به صورت بدون اثر و غیرفعال حضور داشته و در پروسه آپوپتوز به سبب رهایی سیتوکروم C از میتوکندری فعال می‌شود. وزن مولکولی این پروتئین ۱۳۰ کیلودالتون بوده و در ناحیه انتهای آمینی دارای دوین CARD و در انتهای کربوکسیلی دارای چندین بخش تکراری از موتیف WD-40 است. برای فعال شدن پروتئین Apaf-1 ایجاد میان‌کنش بین این پروتئین و سیتوکروم C ضروری است. با مکانیزمی که به درستی مشخص نیست سیتوکروم C و dATP/ATP باعث الیگومر شدن Apaf-1 می‌شوند. توالی CARD و پروکاسپاز ۹ با نسبت یک‌به‌یک به ناحیه CARD در Apaf-1 متصل گشته و سبب فعال شدن کاسپاز ۹ و کاسپاز ۹ فعال



14- Mintz B, Russell ES. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool*. 1957;134(2):207-37.

15- Orr-Urtreger A, Avivi A, Zimmer Y, Givol D, Yarden Y, Lonai P. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development*. 1990;109(4):911-23.

16- Baker M. Stem cells from testis [Internet]. London: Nature Reports Stem Cells. 2007 [cited 2014 May 15]. Available from: <https://www.nature.com/stemcells/2007/0710/071004/full/stemcells.2007.97.html>

17- De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2001;121(3):347-54.

18- Sugimoto R, Nabeshima Y, Yoshida S. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech Dev*. 2012;128(11-12):610-24.

19- Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. *Cell Prolif*. 1971;4(4):313-34.

20- Creemers LB, Meng X, Den Ouden K, Van Pelt AM, Izadyar F, Santoro M, et al. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol reprod*. 2002;66(6):1579-84.

21- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer Science & Business Media; 2010. pp. 11-59.

22- Koruji M. Autograft of fresh and freezeed spermatogonial cells of adult mouse after coculture with Sertoli cells and treatment with GDNF, SCF and GM-CSF cytokines to the azoospermic mice with gamma-ray [Dissertation]. Tehran: Tarbiat Modares University; 2007. [Persian]

23- Mohammadi SM, Movahedin M, Koruji SM. A comparison between the colony formation of adult mouse spermatogonial stem cells in co cultures with sertoli and STO (mouse embryonic fibroblast cell line). *Yakhteh Med J*. 2010;12(2):231-40. [Persian]

24- 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(4):985-91.

25- Mirzapour A, Beheshty MH, Vafayan M. The response of sandwich panels with rigid polyurethane foam cores under flexural loading. *Iran polym j*. 2005;14(12):1082-8.

26- Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, et al. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod*. 2005;73(5):1011-6

27- Baazm M, Mashayekhi FJ, Babaie S, Bayat P, Beyer C, Zendedel A. Effects of different Sertoli cell types on the maintenance of adult spermatogonial stem cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim*. 2017 Sep 1;53(8):752-8.

28- Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev*. 2002;113(1):29-39.

29- De Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998 Dec;396(6710):474-7.

**تشکر و قدردانی:** از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست دانشگاه محقق اردبیلی که در تهیه بعضی منابع ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

**تاییدیه اخلاقی:** از آنجایی که مقاله مورد نظر یک مقاله مروری بود به نامه کمیته اخلاق نیازی نیست.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** مریم سالم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ طوبا میرزاپور (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ ابوالفضل بابرامی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ منصوره موحدین (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

**منابع مالی:** منابع مالی خاصی برای مقاله مورد نظر وجود نداشت و بیشتر با همکاری مولفین انجام شد.

## منابع

- 1- Dadoune JP. New insights into male gametogenesis: What about the spermatogonial stem cell niche?. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2007;45(3):141-7.
- 2- Russell LD. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. *Sertoli Cell*. 1993.
- 3- Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat*. 1990;188(1):21-30
- 4- Weber JE, Russell LD, Wong V, Peterson RN. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Developmental Dynamics*. 1983;167(2):163-79.
- 5- Grootegoed JA, Siep M, Baarends WM. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000;14(3):331-43.
- 6- Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*. 1998;30(4):389-97.
- 7- De Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(6):694-701.
- 8- Lawson KA, Ray Dunn N, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*. 1999;13(4):424-36.
- 9- Tam PP, Zhou SX. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol*. 1996;178(1):124-32.
- 10- Surani MA, Ancelin K, Hajkova P, Lange UC, Payer B, Western P, et al. Mechanism of mouse germ cell specification: A genetic program regulating epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2004;69:1-9.
- 11- Ewen KA, Koopman P. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;323(1):76-93.
- 12- Jan SZ, Hamer G, Repping S, De Rooij DG, Van Pelt AM, Vormer TL. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1822(12):1838-50.
- 13- Lawson KA, Hage WJ. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp*. 1994;182:68-84.

- 45- Wang M, Zhang C, Huang C, Cheng S, He N, Wang Y, Ahmed MF, Zhao R, Jin J, Zuo Q, Zhang Y. Regulation of fibroblast growth factor 8 (FGF8) in chicken embryonic stem cells differentiation into spermatogonial stem cells. *J Cell Biochem*. 2018 Feb;119(2):2396-407.
- 46- Ajeen AR, Movahedin M, Rezzazadeh Valojerdi M, Kazemnejad A. The effects of rFSH and testosterone on in vitro maturation of mouse round spermatid in co-culture with vero cells. *J Reprod Infertil*. 2003;4(4):295-305. [Persian]
- 47- Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*. 2003;144(2):509-17.
- 48- Tapanainen P, Knip M. Evaluation of growth hormone secretion and treatment. *Ann Med*. 1992;24(4):237-47.
- 49- Verhoeven G, Cailleau J. Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. *Endocrinology*. 1988;122(4):1541-50.
- 50- Thanaboonyawat I, Makemaharn O, Petyim S, Laokirkkiat P, Choavaratana R. The correlation of cumulus mucification patterns with oocyte maturation rate in vitro in FSH+ LH-primed IVM cycles: a prospective study. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(3):681-6.
- 51- Nasr Esfahani MH, Tavalae M, Deemeh MR. Origins and evaluation of DNA damage in infertile individual. *J Iran Anat Sci*. 2008;6(24):489-500. [Persian]
- 52- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997;88(3):347-54.
- 53- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001;92(1):57-70.
- 54- Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: Regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365(1546):1501-15.
- 55- Recasens V, Rubio-Martinez A, Lucia J, Giralt M, Solano V. Implementation of haemovigilance system focusing in donors collection. *Hematol J*. 2006;91(s1):204.
- 56- White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. In: Giordano A, Romano G, editors. *Cell cycle control and dysregulation protocols, methods in molecular biology™*. 285th Volume. New York City: Humana Press; 2004. pp. 105-11.
- 57- Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*. 1995;7(1):61-4.
- 58- Hatori M, Klatte KJ, Teixeira CC, Shapiro IM. End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: Evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 1995;10(12):1960-8.
- 59- Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods*. 2002;265(1-2):97-110.
- 60- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 1999;144(2):281-92.
- 61- Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.
- 30- Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(40):14302-7.
- 31- Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod*. 2007;76(1):130-41.
- 32- Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25842-51.
- 33- Wang M, Guo Y, Wang M, Zhou T, Xue Y, Du G, et al. The Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)-responsive phosphoprotein landscape identifies raptor phosphorylation required for spermatogonial progenitor cell proliferation. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(6):982-97.
- 34- Itman C, Loveland KL. SMAD expression in the testis: An insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev Dyn*. 2008;237(1):97-111.
- 35- Zhao GQ, Deng K, Labosky PA, Liaw L, Hogan BL. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev*. 1996;10(13):1657-69.
- 36- Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol*. 2000;14(7):1053-63.
- 37- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*. 2004;25(1):72-101.
- 38- Hajian Monfared M, Minaee B, Rastegar T, Khrazinejad E, Barbarestani M. Sertoli cell condition medium can induce germ like cells from bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(11):1186-92.
- 39- Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4563-76.
- 40- Hu Q, Ueno N, Behringer RR. Restriction of BMP4 activity domains in the developing neural tube of the mouse embryo. *EMBO rep*. 2004;5(7):734-9.
- 41- Han IS, Sylvester SR, Kim KH, Schelling ME, Venkateswaran S, Blanckaert VD, et al. Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate Sertoli cell function. *Mol Endocrinol*. 1993;7(7):889-97.
- 42- Huang J, Mohammadi M, Rodrigues GA, Schlessinger J. Reduced activation of RAF-1 and MAP kinase by a fibroblast growth factor receptor mutant deficient in stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J Biol Chem*. 1995;270(10):5065-72.
- 43- Feng LX, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25572-6.
- 44- Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:41-55.

- 66- Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, et al. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet.* 1998;18(3):251-6.
- 67- Petre-Lazar B, Livera G, Moreno SG, Trautmann E, Duquenne C, Hanoux V, Habert R, Coffigny H. The role of p63 in germ cell apoptosis in the developing testis. *J cell physiol.* 2007;210(1):87-98.
- 68- Fujimoto K, Yamamoto T, Kitano T, Abé S. Promotion of cathepsin L activity in newt spermatogonial apoptosis induced by prolactin. *FEBS Lett.* 2002;521(1-3):43-6.
- 69- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development.* 1993;118(4):1089-94.
- 62- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995;3(6):673-82.
- 63- Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ.* 2001;322(7301):1538-9.
- 64- Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. *Cell.* 1993;74(5):777-9.
- 65- Grataroli R, Vindrieux D, Selva J, Felsenheld C, Ruffion A, Decaussin M, et al. Characterization of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(2):123-8.