مطالعه تجربی بیان Ki67، POU5F1 و zbtb16 در سلول های بیضه خوک و موش با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمیایی و RT-PCR

حسین عزیزی[1*]، امیررضا نیازی تبار[1]، عطیه محمدی[1]

۱) گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۰**

چکیده

مقدمه: سلول های بنیادی اسپرم ساز، بنیانگذار و نقطه شروع اسپرماتوژنز هستند و تنها سلول هـای بنیـادی در بـدن بـه شـمار مـی آینـد کـه می توانند از طریق گامت زایی اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعدی منتقل کنند؛ هدف از تحقیق حاضر، بررسی ماهیت پرتوانی سلول های بنیادی اسپرم ساز در شرایط in vitro و in vivo است.

مواد و روش ها: سلول های اسپرم ساز از بیضه خوک و موش با استفاده از روش هضم آنزیمی استخراج شده و در محیط حاوی FGF، EGF و GDNF و سلول های تغذیه کننده STO کشت داده شدند. سپس برای بررسی ایمنوسیتوشیمیایی و RT-PCR کلونی های حاصله از مارکرهای Ki67، POU5F1 و ZBTB16 استفاده شد.

یافته های پژوهش: ماهیت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی حاصـــــله پس از جداسازی و کشت، به وسیله معیار هایی نظیر رشد خوشه ای کلنی ها در محیط کشت، بیان مارکر Ki67 طی بررسی ایمنوسیتوشیمیایی که بیانگر قابلیت تکثیر است و شاخص های مورفولوژیکی مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره، ثابت شد. هم چنین آنالیز مقایسه بیان مارکر های POU5F1 و ZBTB16 در سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی اسپرم ساز و سلول های سرتولی موجود در لوله اسپرم ساز موش با استفاده از روش RT-PCR را در نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: طی این پژوهش بیان مارکر های Ki6، POU5F1 و ZBTB16 در لوله اسـپرم سـاز و ویژگی های سـیتولوژیک سلول های بنیادی اسپرم ساز مورد مطالعه قرار گرفت به طوری که یافته های حاصل می تواند در تحقیقات پیشرفته حوزه بیولوژی تولید مثل مفید باشد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی پرتوان، سلول های بنیادی موش، سیتولوژی، پروتئین Pou5f1، zbtb16

* نویسنده مسئول: گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

Email: h.azizi@ausmt.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

مقدمه

سلول های بنیادی اسپـرم ساز(Spermatogonial Stem Cells, SSCs)، از جمله سلول های بنیادی به شمار می روند که علی رغم انتقال اطلاعات ژنتیکی از نسلی به نسل بعد، توانایی خود ترمیمی(Self-renrwal) و همین طور ایفای نقش ضروری برای انجام صحیح مراحل اسپرماتوژنز و متعاقباً پتانسیل تولید مثلی جنس مذکر در پستانداران را دارند(۱). سلـــول های بنیادی اسپرم ساز شامل دو گروه اند؛ گروه اول که عموماً با نام گونوسیت(Gonocytes) شناخته می شوند در واقع همان سلول های جنسی اولیه در مراحل اسپرماتوژنز هستند که از مرکز لوله اسپرم ساز به بخش اپی تلیوم آن مهاجرت کرده و به گروه دوم یعنی اسپرماتوگونیای تمایز نیافته، تبدیل می شوند؛ اسپرماتوگونیای تمایز نیافته معمولاً در ناحیه پایه ای یا بازال لوله اسپرم ساز یافت می شوند و طی مراحلی به اسپرماتوگونیای تمایز یافتـــه، تبـــدیل می شوند(۲). در حقیقت، اسپرماتوزنز مجموعه مراحلی بر پایه سلول های بنیادی پرتوان است که شامل سه مرحله اصلی تقسیمات میتوزی اسپرماتوگونیا، تقسیمات میوزی اسپرماتوسیـــت و در نهـــایت اسپرمیوژنز که اسپرماتید کروی و هاپلوئید را به اسپرماتوزوا تبدیل می کند، است در نتیجه شناخت مراحل اسپرماتوژنز و فاکـــتورهای شیمیایی و فیزیکی دخیل در آن، برای غلبه بر اختلالات تولیدمثلی بسیار حائز اهمیت است(۳). منشا سلول های بنیادی اسپرم ساز، سلول های اپی بلاست جنینی هستند و با توجه به ماهیت این دسته از سلول های بنیادی، کلنی های مشتق شده از آن ها قابلیت تولید هر سه نوع لایه زایای جنینی یعنی اکتودرم، مزودرم و آندودرم را دارند(۴). نخســـتین بار در سال ۲۰۰۴، پس از کشت سلول های بنیادی اسپرم ساز حاصله از موش های تازه متولد شده، نظریه خاصیت پرتوانی این سلول ها، مطرح شد. تحقیقات پس از آن نیز موفق به تمایز سلول های بنیادی اسپرم ساز به انواع مختلف سلول شدند. امروزه با توجه به خاصیت پرتوانی این سلول ها، تولید سلول های جنینی(Embryonic cells, ECs) پس از کشـــت در شرایـــط in vitro به عنوان منبع تولید سلول، در پژوهش های تحقیقی و بالینی در راستای استراتژی های سلول درمانی(Cell Therapy) بسیار مورد توجه است(۵،۶).

سلول های بنیادی اسپرم ساز(SSCs) در یک محیط تخصص یافته ای به نام کنام(Niche) قرار دارند که از طریق متعادل ساختن خودترمیمی(Self-renewal) و تمایز(Differentiation) سلول های بنیادی، هموئوستاز مایع لوله اسپرم ساز را تنظیم می کنند. کنام سلول های بنیادی از سلول ها، اجزای ماتریکس خارج سلولی و هم چنین فاکتورهای محـــلول موضـــعی تشکیل شده که سرنوشت نهایی سلول را تنظـــیم می کنند. اساس ساختاری کنام سلول های بنیادی در بیضه پستانداران از اجزای پایه ای(Basal compartment) لوله هـــای اسپرم ساز ساخته شده که شامـــل سلول های سرتولی (Sertolo Cells, SCs)، ســـلول های میوئید(Myoid Cells) و سلول های لیدیگ(Leydig Cells) می باشد.

سلول های سرتولی(Sertoli Cells, SCs)، یکی از سلول های ضروری برای طی روند صحیح مراحل تولیدمثلی به شـــمار مـــی روند(۷)؛ این سلول های سوماتیکی که برای اولین بار در قرن ۱۹، توسط انریکو سرتولی توصیف شدند، مسئولیت انجام فرآیندهای شیمیایی و حمـــایت های فـــیزیکی را طی مراحل اسپرماتوژنز بر عهده دارند(۸)؛ به طور مثال این سلول ها مسئول تولید و حفظ سد خونی-بیضه ای(Blood Testes Barreir, BTB) هـــستند؛ این سد یکی از مهم ترین سد های بیولوژیکی بدن محسوب می شود که با جداکردن لوله اسپرم ساز به دو بخش پایه ای (Basal Section) و لومنی(Lumen section) و کنترل عبور و مرور مولکول ها و یون ها، باعث ایجاد و حفظ شرایط پایدار در مایع لوله اسپرم ساز می شود(۹)؛ یکی دیگر از وظایف بسیار مهم سلول های سرتولی، تبدیل مقدار زیادی از گلوکز جذب شده به لاکتات برای تغذیه یکسری از سلول های جنسی که طی مراحلی از اسپرماتوژنز قدرت استفاده از گلوکز را به عنوان منبع انرژی ندارند، گزارش شده است(۱۰،۱۱). سلول های سرتولی به همراه سلول های میوئید، اجزای پایه ای غشا را ترشـــح می کنند که سلـــــول هـــای بنیادی اسپرم ساز(SSCs) از طریق مولکول های چســـبنده به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

یکدیگر متصل می شوند.

از دیگر سلول های سوماتیکی مهم لوله اسپرم ساز، می توان به سلول های لیدیگ(Leydig Cell) اشاره کرد؛ این سلول ها با بیان گیرنده هورمون لوتئیزه کننده (LH) و تولید هورمون تستوسترون در پاسخ به اتصال LH به گیرنده موجود بر سطح سلول لیدیگ، نقش بسیار مهمی در پیشبرد صحیح فرآیندهای تولیدمثلی ایفا می کنند(۱۲). هر گروه از سلول های لوله اسپرم ساز، با توجه به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مختص خود، مارکرهای ویژه ای را بیان می کنند که از این تفاوت بیان، می توان برای تشخیص سلول ها از یکدیگر و همین طور انجام پژوهش های اختصاصی روی هر سلول بهره برد؛ مارکرهای POU5F1، GFRa، c-Kit و zbtb16 مثال هایی از مارکرهای شناسایی شده برای سلول های جنسی از جمله سلول های بنیادی اسپرم ساز در مراحل مختلف هستند(۱۳). POU5F1 به عنوان یک فاکتور تنظیم کننده اصلی در پرتوانی سلول های بنیادی مطرح است که در سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells ,ESC) بیان می شود. بسته به میزان بیان، وظایف مختلفی برای آن در نظر گرفته شده است به عنوان مثال با همکاری دو فاکتور تنظیم کننده دیگر، SOX2 و Nanog، خودترمیمی (Self-renewal) و پرتوانی سلول های بنیادی جنینی را کنترل می کند.

مارکر GFRa در سطح پایینی از بیان، سلول های بنیادی اسپرم ساز(SSCs) را به سمت تمایز پیش می برد در حالی که در سطح بیان بالا، موجب خودترمیمی(Self-renewal) می شود.

مارکر C-Kit نیز تنها در سلول های بنیادی تمایز یافته بیان شده و در سلول های تمایز نیافته بیانی از آن مشاهده نشده است.

Zbtb16 به عنوان مارکری در نظر گرفته می شود که می تواند هم به عنوان فاکتور سرکوب کننده و هم فعال کننده عمل نموده و هم چنین در خودترمیمی (Self-renewal) سلول های اسپرماتوگونی نقش دارد. هم چنین بیان آن در سلول های تمایزنیافته مشاهده شده است.

امروزه برای جداسازی SSC ها از روش های متفاوتی استفاده می کنند؛ یکی از این روش ها استفاده از ماتریکس خارج سلولی(,Extracellular matrix ECM) مانند Laminin و Collagen است؛ یعنی به طور مثال SSC ها مارکر های سطح سلولی اینتگرین CD49 و CD29 را بیان می کنند، که این مارکر ها به Laminin متصل می شوند و یا تمایل زیاد سلول های سوماتیکی بیضه مانند سلول های سرتولی، سلول های لیدیگ و فیبروبلاست ها، برای اتصال به Collagen، روش دیگری برای جداسازی سلول های جنسی از سلول های سوماتیکی لوله اسپرم ساز است(۱۴،۱۵). از روش های دیگری که برای جداسازی SSC ها مورد استفاده قرار می گیرد می توان به -Magnetic Activated Cell Sorting و -Fluorescence Activated Cell Sorting یا به اختصار MACS و FACS اشاره کرد. لازم به ذکر است که مکانیسم های دقیق مولکولی مرتبط با تقسیم، بازسازی مجدد(-Self renewal)، آپوپتوز و تمایز SSC ها به طور دقیق شناسایی نشده است، اما تحقیقات گسترده روی SSC ها نشان داده است که محیط کشت های متفاوت، غلظت های متفاوتی از (FBS (Fetal bovine serum، انواع سلول های تغذیه کننده می توانند تاثیرات به سزایی بر مراحل Self-renewal، تقسیم و همین طور تمایز SSC ها در شرایط آزمایشگاهی داشته باشند(۱۶). با توجه به گزارشات مذکور و اهمیت سلول های اسپرماتوگونی به عنوان منبع زایای سلول های پرتوان و همین طور با توجه به قابلیت کشت پذیری آن ها در شرایط in vitro و تاثیر نوع و غلظت های متفاوت ترکیبات موجود در محیط کشت بر تکثیر آن ها، تحقیقات گسترده ای برای دستیابی به محیط کشت مطلوب، ضروری به نظر می رسد. بنا بر این هدف از تحقیق حاضر، استخراج سلول های اسپرماتوگونی از بیضه خوک و بررسی ایمنوسیتوشیمیایی و میکروسکوپی سلول های حاصل از تکثیر آن پس از کشت در محیط کشت اختصاصی بوده است(۱۷،۱۸).

مواد و روش ها

هضم آنزیمی بافت بیضه: طی این آزمایش، از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

خوک و موش به عنوان مدل های بیولوژیکی استفاده شد. بیضه مدل های بیولوژیک(خوک و موش) بعد از جداسازی از حیوان، در محلول نمکی بافر فسفات یا PBS; Phosphate-buffered saline, Invitrogen) Co., USA) قرار داده شد. سپس لوله های اسپرم ساز بیضه از کپسول بیضه جدا شده و به قطعات کوچک تر تقسیم شدند. بافت خرد شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محلول بافری HBSS (Hank's buffered salt solution, PAA Laboratories GmbH Co. USA) که حاوی Ca^{2+} و Mg^{2+} است، به همراه آنزیم های هضم کننده کلاژناز تیپ IV (۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر)، DNAse (۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر) و دیسپاز(۰/۸ میلی گرم/میلی لیتر) قرار داده شد. عملکرد آنزیم های هضم کننده در سرم جنین گاوی یا FBS ۱۰ درصد متوقف شده و سپس محلول حاصل برای به دست آوردن سوسپانسیون تک سلولی به آرامی پیپتاژ شد. بعد از سانتریفیوژ و حذف محلول بالایی، نمونه ها با محلول DMEM/F12 (DMEM/Nutrient Mixture F-12) شسته شده و پس از عبور از فیلتر نایلونی ۷۰ میکرونی به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف شد و سلول های باقی مانده، در محیط کشت مخصوص سلول های اسپرماتوگونیا کشت داده شدند.

محیط کشت سلول های اسپرماتوگونیا: سلول های جدا شده در محیط کشتی شامل، StemPro-34 medium، ۱ درصد مکمل N2 (Invitrogen, USA)، ۶ میلی گرم/میلی لیتر D-گلوکز (Sigma Aldrich, USA)، ۵ میکروگرم/میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (Sigma Aldrich, USA)، ۱ درصد L-گلوتامین (PAA, USA)، ۰/۱ درصد β-mercaptoethanol (Invitrogen, USA)، ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین(PAA, USA)، ۱ درصد ویتامین های MEM (PAA, USA)، ۱ درصد آمینواسیدهای غیرضروری(PAA, USA)، ۳۰ نانوگرم/میلی لیتر استرادیول(Sigma Aldrich, USA)، ۶۰ نانوگرم/میلی لیتر پروژسترون (Sigma Aldrich, USA)، ۲۰ نانوگرم/میلی لیتر EGF (Sigma Aldrich, USA)، ۱۰ نانوگرم/میلی لیتر FGF (Sigma Aldrich, USA)، ۸ نانوگرم/میلی لیتر GDNF (Sigma Aldrich, USA)، ۱۰۰ واحد/میلی لیتر LIF (Millipore, USA)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر آسکوربیک اسید(Sigma Aldrich, USA)، ۳۰ میکروگرم/میلی لیتر پیرویک اسید (Sigma Aldrich, USA)، 1 میکرولیتر/میلی لیتر DL-لاکتیک اسید (Sigma Aldrich, USA) و کشت داده شدند.

لایه تغذیه کننده STO: این سلول ها به صورت تجاری خریداری شد و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO2، کشت داده شد. در نهایت تقسیم سلول های STO، با اشعه گاما(γ-irradiation) و یا Mitomycin C (۱۰ میلی گرم/میلی لیتر)، متوقف شد.

رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی: برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی(ICC)، از پلیت های ۲۴ خانه استفاده شد. برای فیکس کردن سلول های کشت داده شده از paraformaldehyde ۴ درصد استفاده شد، سپس این سلول ها با FBS و Tween۲۰، شست و شو داده شدند. برای نفوذپذیر کردن یا permeabilized سلول ها از Triton ۱ درصد حل شده در PBS، استفاده شده و سلول ها با آنتی بادی های اولیه به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شدند سپس این روند برای آنتی بادی های ثانویه نشاندار نیز تکرار شد. برای رنگ آمیزی هسته از DAPI(۰/۲ میکروگرم/میلی لیتر) استفاده شد و بعد سلول ها با Poly vinyl alcohol (Mowiol®) فیکس گردیدند. از میکروسکوپ فلورسنس(Olympus, BX51, Japan) و کونفوکال (Zeiss LSM 700) برای بررسی سلول های نشان دار شده استفاده شد.

بررسی ها با میکروسکوپ الکترونی: کلنی ها پس از شست و شو با PBS، با بافر Glutaraldehyde ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت و سپس در تترا اکسید سمیوم آبی به مدت ۹۰ دقیقه، تثبیت شدند. برای آبگیری از نمونه ها، از روش افزایش درصد اتانول(۲۹،۳۰) و سپس از دستگاه خشک کننده هوا برای خشک کردن نمونه ها استفاده شد. در نهایت، سطح نمونه ها را با لایه نازکی از طلا پوشانده شده و با میکروسکوپ الکترونی نگاره

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

(VEGA\TESCAN, Czech Republic) به بررسی آن ها پرداخته شد.

مراحل و محتوای آزمایش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل با کد Ir.ausmt.rec.1398.03.07 مورد تایید قرار گرفت.

یافته های پژوهش

مورفولوژی: کلنی های حاصله، ۲ روز پس از کشت روی محیط کشت اختصاصی حاوی فاکتورهای رشد و سلول های تغذیه کننده، شروع به رشد کرده و پس از ۱۵ روز کلنی ها نوعی از تکثیر خوشه ای را نشان می دهند(شکل شماره ۱).

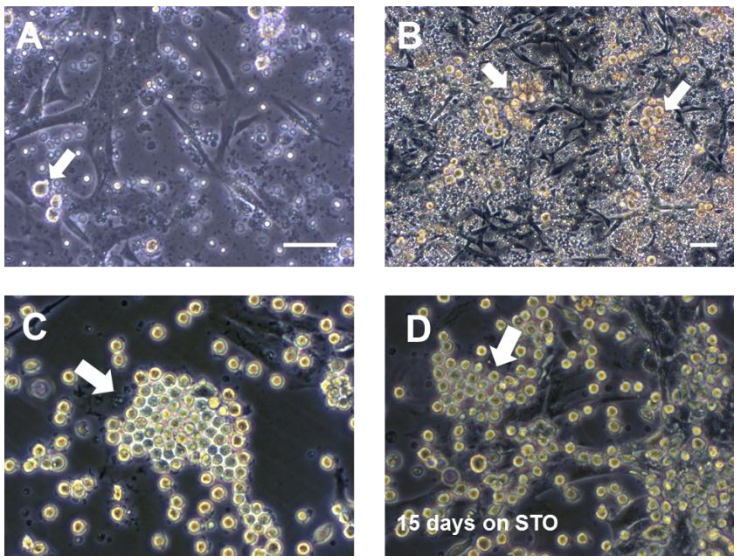
آنالیز ایمنوسیتوشیمیایی: بررسی سلول های استخراج و کشت داده شده از بیضه خوک برای بیان مارکر سطح سلولی Ki67، مشخص ساخت که گروهی از این سلول ها مارکر مذکور را بیان می کنند(شکل شماره ۲).

هم چنین بررسی بیان مارکر POU5F1 در سلول های لوله اسپرم ساز موش و خوک بیان ضعیف این مارکر را در خوک و موش نشان داد.

بررسی میکروسکوپ الکترونی: پس از طی مراحل آماده سازی نمونه، بررسی سلول ها با میکروسکوپ الکترونی، هسته کوچک و متمایل به سمت دیواره سلولی و سیتوپلاسم بزرگ را نشان داد(نسبت نوکلئوپلاسمی پایین). در عین پراکنده بودن دستگاه گلژی در سراسر سیتوپلاسم تجمع در سطوح پایه ای(Basal)، جانبی (Lateral) و پایه ای-جانبی(Basolateral) نیز دیده شد(شکل شماره ۳).

Fluidigm Real-time PCR analysis: مقایسه بیان مارکر POU5F1 و zbtb16 در دو گونه از سلول های جنسی یعنی سلول های بنیادی جنینی موش (Mouse Embryonic Stem Cells, mESCs) و سلول های بنیادی اسپرم ساز(Spermatogonial Stem Cells, SSCs) هم چنین یکی از مهم ترین سلول های سوماتیکی لوله اسپرم ساز یعنی سلول های سرتولی(Sertoli Cells, SCs) انجام شد. نتایج مقایسه بیان این دو مارکر در سلول های بنیادی جنینی موش، سلول های بنیادی اسپرم ساز و هم چنین سلول های سرتولی بیان معنی داری را در هیچ کدام نشان نداد و به ترتیب در mESC بیشتر از SSCs و بیشتر از SCs (mESC>SSCs>SCs)(شکل شماره a-۵).

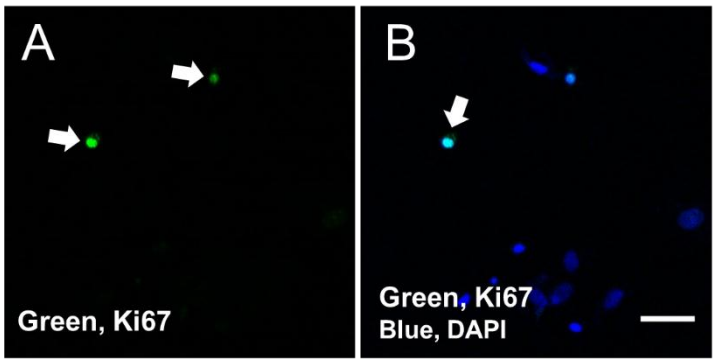
بررسی بیان مارکر zbtb16 در سلول هایی که از بیضه موش استخراج و سپس کشت داده شد نشان داد که، بیان این مارکر در سلول های بنیادی اسپرم ساز (SSCs) نسبت به سایر سلول های موجود در مطالعه، معنی دار(Significant) است(شکل شماره b-5).



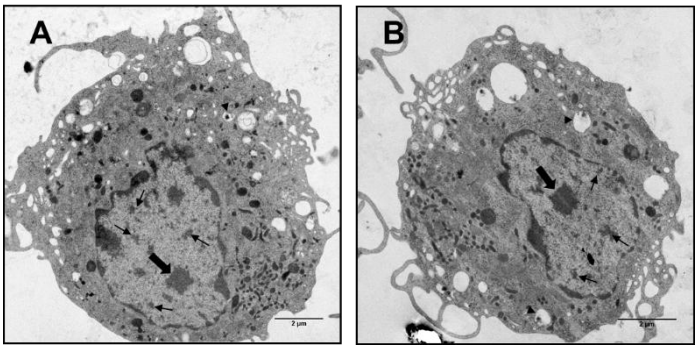
شکل شماره ۱. بررسی تقسیم و تمایز سلول ها در محیط کشت اختصاصی(میکروسکوپ زمینه روشن). حدود دو روز بعد از هضم آنزیمی، سلول ها در سطح پلیت پخش شدند(A). حدود ده روز بعد از پلیت کردن، تعدادی از سلول های در حال رشد مشاهده شدند(B). شکل خوشه ای کلنی حدود ده روز پس از جداسازی و کشت(C). حدود پانزده روز بعد از پلیت کردن(D).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

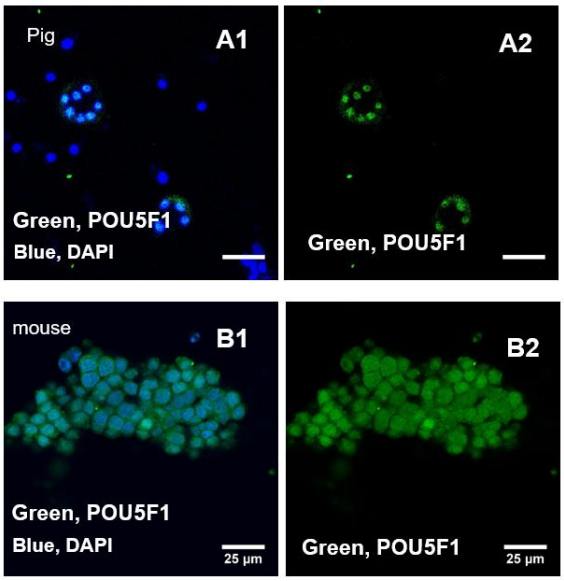
[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]



شکل شماره ۲. بررسی ایمنوسیتوشیمیایی سلول ها پس از کشت. بررسی ها نشان داد که بعضی از این سلول ها، آنتی بادی مونوکلونال Ki67 را که مارکری تخصصی است و بیان آن به معنای توانایی تقسیم سلولی است، بیان می کنند(A). هم پوشانی DAPI (آبی) و Ki67 (سبز)، (B).



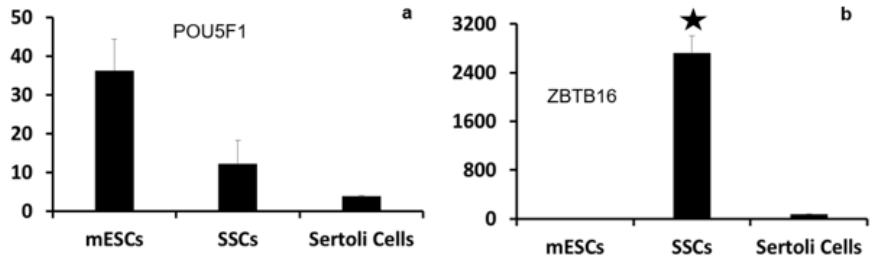
شکل شـــماره ۳. میکروگراف الکترونی سلول های کشت داده شده، ویژگی های متعددی از سلول های مورد بررسی را نشان داد. در هسته سلول های مورد بررسی، هستک های متراکم و هتروکروماتین(فلش بزرگ) و هم چنین نقاط پراکنده هتروکروماتینی(فلش کوچک) مشاهده شد. اجسام مولتی وستیکولار(Multivesticular bodies, MVM) نیز در سیتوپلاسم این سلول ها و در نزدیکی دستگاه گلژی مشاهده شد(سر فلش). در اغلب موارد مشاهده شده دستگاه گلژی در سطوح پایه ای(Basal)، جانبی(Lateral) و پایه ای-جانبی(Basolateral) دیده شد اما در کـــل می توانند سراسر سیتوپلاسم پراکنده باشد. هم چنین میکروگراف های الکترونی نسبت نوکلئوپلاسمی(هسته به سیتوپلاسم) پایین را نشان دادند(A, B).



شکل شماره ۴. بررسی ایمونوسیتوشیمیایی سلول های لوله اسپرم ساز. بیان مارکر POU5F1 توسط سلول های لوله اسپرم ساز خوک(A2) و تصویر هم پوشان(merge) بیان POU5F1 و DAPI در خوک(A1). و موش(A2-B2). همپوشانی POU5F1 (ســـبز) و DAPI(آبـــــی)(A1-B1).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]



شکل شماره ۵. آنالیز RT-PCR در موش.a : بررسی بیان POU5F1 در سلول های بنیادی جنینی(mESCs)، سلول های بنیادی اسپرم ساز(SSCs) و سلول های سرتولی(SCs). b: آنالیز بیان مارکر zbtb16 در سلول های mESCs، SSCs و SCs.

بحث و نتیجه گیری

مشاهدات انجام شده نشان داد که سلول های مورد بررسی، ویژگی هایی مانند پتانسیل کشت داده شدن در حضور سلول های لایه تغذیه کننده STO، رشد و تکثیر خوشه ای در محیط کشت غنی از فاکتورهای رشد، قدرت تکثیر و ضریب نوکلئوپلاسمی(حجم هسته به سیتوپلاسم) پایین هستند. در واقع نتایج حاصل از ارزیابی میکروسکوپی سلول های اسپرماتوگونیای جداشده از بیضه خوک، ماهیت سلولی آن ها را مبنی بر احتمال اسپرماتوسیت اولیه بودن، تایید می کند(شکل شماره ۳).

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی، به عنوان بنیانگذار مراحل اسپرماتوژنز، جمعیت مولد بیضه شناخته شده و با قابلیت تکثیر خود، کلنی های سلولی را تحت شرایط in vitro تولید می کند؛ مارکر Ki67، نوعی نشانگر سطح سلولی است که بیان آن توسط سلول ها، قابلیت تکثیرپذیری آن ها را ثابت می کند در همین راستا، بررسی ایمنوسیتوشیمیایی سلول های کشت داده شده بیضه خوک طی پژوهش حاضر، پس از رنگ آمیزی هسته با DAPI و هم پوشانی(Merge) تصویر حاصل از آن با تصویرKi67 مشخص می سازد که گروهی از این سلول ها این مارکر را بیان می کنند(شکل شماره ۲).

در تحقیق حاضر، کلنی های حاصل از تقسیمات سلولی، پس از ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از کشت در محیط کشت اختصاصی حاوی فاکتورهای رشد و سلول های تغذیه کننده STO، مشاهده شدند(شکل شماره ۱)؛ همان طور که اشاره شد، امروزه سلول های بنیادی اسپرماتوگونی برای دستیابی به مقادیر دلخواه سلول های پرتوان در شرایط خارج از بدن، در مرکز توجه مطالعات سلول های بنیادی قرار دارد(۱۹)؛ مطالعات انجام شده روی ویژگی های تومورزایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و هم چنین مطالعات گسترده در زمینه پیوند(Transplantation)، می توانند شواهدی محکم بر اثبات قدرت تمایز و در نتیجه پرتوان بودن این سلول ها باشند(۲۰،۲۱). علاوه بر این، بررسی غلظت های مختلف محیط کشت استفاده شده برای تولید کلونی های سلول های بنیادی اسپرماتوگونی از دیگر موضوعات حائز اهمیت در تحقیقات پایه بیولوژیک به شمار می رود(۲۲). به منظور کشت سلول های بیضه در شرایط آزمایشگاهی، دو روش پیشنهاد شده است: کشت اندام های بیضه و کشت سلول های بنیادی جدا شده. با توجه به موانعی نظیر سخت بودن فراهم کردن شرایط فیزیولوژیک بدن در محیط آزمایشگاهی و تنظیم کردن سیستم هورمونی، استفاده از روش دوم رایج تر است. یکی از رویکردهای جدید در حوزه بیولوژی تولیدمثل، کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی گونه های مختلف نظیر موش،خوک و میمون است.

هم چنین طی سال های متمادی، پیشنهاد روش های متفاوت برای استخراج و خالص سازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و بررسی آن ها، ذهن بسیاری از محققین حوزه بیولوژی تولیدمثل را درگیر خود کرده است(۲۳). در مطالعات انجام شده، طی ۱۵ سال گذشته روش های مختلفی مانند MACS و FACS، برای جداسازی SSC ها از بافت بیضه پیشنهاد شده است(۱۶،۲۴،۲۵)؛ به طور مثال تقریباً برای اولین بار

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

حدود ۱۰ سال پیش طی یک پژوهش از روش MACS برای جداسازی SSC ها از ۴ گروه سنی موش برای بررسی میزان بیان GFRA1 در این سلول ها انجام شد. استفاده از این روش ها در مطالعات دهه اخیر، برای دستیابی به نتایجی هم چون بیان مارکرهای مختلف توسط سلول های پرتوان جنسی و ویژگی های متعددی از SSC ها، بسیار مفید بوده است(۲۶،۲۷). به طور مثال اطلاعاتی مانند بیان مارکرهای MCAM، integrin (CD29)، GFRa1، GPR125، CDH1، Stra8 و عدم بیان مارکر C-Kit، MHC1، CD51، CD45 توسط SSC ها، پس از جداسازی این سلول ها به روش MACS و FACS بوده است. در همین راستا، بررسی ایمنوهیستوشیمیایی بیان مارکر POU5F1 در سلول های لوله اسپرم ساز خوک و موش انجام شد(شکل شماره ۴). هم چنین طی پژوهش حاضر، از بررسی سلول های استخراج شده از موش با RT-PCR برای آنالیز بیان دو مارکر zbtb16 و POU5F1 به منظور مقایسه بیان مارکر مذکور در سه نوع از سلول های حاصل از کشت استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی RT-PCR نشان داد که بیان zbtb16 در سلول های بنیادی اسپرم ساز(SSCs) برخلاف مارکر POU5F1 معنی دار بود. در مقابل بیان مارکر POU5F1 در سلول های بنیادی جنینی(mESCs) نسبت به بیان مارکر zbtb16 در سلول های مذکور بیشتر بوده است(شکل شماره ۵).

در واقع، ارائه اطلاعات حاصل از پژوهش هایی مانند این مقاله، برای دستیابی به روش های جداسازی و کشت خارج سلولی سلول های پرتوان جنسی و بررسی های سیتولوژیک سلول های موجود در بیضه، می تواند در رسیدن تحقیقات آینده به نتایجی مبنی بر درمان ناباروری و سایر اختلالات تولیدمثلی و یا کمک در روش های نوینی مانند کلونینگ، مهندسی بافت، دست کاری ژنتیکی، بیوایمپلنت، پیوندها و درمان های ترمیمی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری های علمی بین المللی(CISSC) وزارت علوم تحقیقات و فناوری و هم چنین توافق نامه همکاری (MOU) بین دانشگاه هایدلبرگ آلمان و دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل انجام شده است.

کد اخلاق: Ir.ausmt.rec.1398.03.07

References

1.Kanbar M, Michele F, Wyns C. Cryostorage of testicular tissue and retransplantation of spermatogonial stem cells in the infertile Male. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab2018; 4:124-9. doi. 10.1016/j.beem.2018.10.003.

2.Raymond K. Adhesion within the stem cell niches. Curr Opin Cell Biol2009;21: 623-9. doi. 10.1016/j.ceb.2009.05.004.

3.Wu X. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. Proce National Acad Sci2009. 106: 21672-21677. doi. 10.1073/pnas.0912432106.

4.Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in Mice monkeys and men. Stem Cell Res2018; 29: 207-14. doi. 10.1016/j.scr.2018.04.009.

5.Hayashi Y, Saitou M, Yamanaka S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. Fertil Steril 2012; 97: 1250-9. doi. 10.1016/j.fertnstert.2012.04.037.

6.Hermann BP. The mammalian spermatogenesis single cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids. Cell Rep 2018; 25: 1650-1667. e8.

7.Silber S. Histology of the testis and spermatogenesis. Fund Male Infertil 2018;2: 29-37. doi. 10.1016/j.celrep.2018.10.026.

8.Sharma S, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Localization of epithelial sodium channel ENaC and CFTR in the germinal epithelium of the testis sertoli cells and spermatozoa. J Mole Histol 2018; 49: 195-208. doi. 10.1007/s10735-018-9759-2.

9.Griswold MD. 50 years of spermatogenesis sertoli cells and their interactions with germ cells. Biol Rep 2018;99: 87-100. doi. 10.1093/biolre/ioy027.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

10.Gerber J, Heinrich J, Brehm R. Blood-testis barrier and sertoli cell function lessons from SCCx43KO Mice. Reproduction 2016; 151:15-27. doi. 10.1530/REP-15-0366.
11.Mateus I. Glucose and glutamine handling in the sertoli cells of transgenic rats overexpressing regucalcin: plasticity towards lactate production. Sci Rep2018; 8: 10321. doi. 10.1038/s41598-018-28668-4.
12.Culty M, Papadopoulos V, Zirkin B. Leydig cells fetal to aged testes. Enc Rep2018;2: 39. doi. 10.1016/b978-0-12-801238-3.64360-x.
13.Lee WY. Characterization of male germ cell markers in canine testis. Anim Rep Sci 2017; 182: 1-8. doi. 10.1016/j.anireprosci.2017.01.002.
14.Azizi H, Skutella T, Shahverdi A. Generation of mouse spermatogonial stem cell colonies in a non-adherent culture. Cell 2017; 19: 238. doi. 10.22074/cellj.2016.4184.
15.Michele F, Vermeulen M, Wyns C. Fertility restoration with spermatogonial stem cells. Curr Opin Endocrinol Diabete Obesit2017; 24: 424-31. doi. 10.1097/med.0000000000000370.
16.Guo J, Cairns BR. Isolation and enrichment of spermatogonial stem cells from human testis tissues. Curr Pro Stem Cell Biol 2019; 3:77. doi. 10.1002/cpsc.77.
17.Oatley JM, Oatley MJ. Feeder free method for culture of bovine and porcine spermatogonial Stem Cells 2016; 3:231-6. doi. 10.1016/j.scr.2013.08.008.
18.Luo J, Megee S, Dobrinski I. Asymmetric distribution of UCH-L1 in spermatogonia is associated with maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells. J Cell Physiol 2009; 220: 460-8. doi. 10.1002/jcp.21789.
19.Kokkinaki M. Age affects gene expression in mouse spermatogonial stem progenitor cells. Reproduction2010;139: 1011-20. doi. 10.1530/REP-09-0566.
20.Giassetti MI, Ciccarelli M, Oatley JM. Spermatogonial stem cell transplantation: insights and outlook for domestic animals. Annu Rev Anim Biosci2019; 7: 385-401. doi. 10.1146/annurev-animal-020518-115239.
21.Morimoto H. ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Life Sci Allia2019; 2:121-6. doi. 10.26508/lsa.201900374.
22.Zhou H. The testicular soma of Tsc22d3 knockout mice supports spermatogenesis and germline transmission from spermatogonial stem cell lines upon transplantation. Genesis 2019;2:23295. doi. 10.1002/dvg.23295.
23.Moraveji SF. Optimizing methods for human testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell isolation. J Cell Biochem 2019;120: 613-21. doi. 10.1002/jcb.27419.
24.Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. Biol Rep 2004;71: 722-31. doi. 10.1095/biolreprod.104.029207.
25.Valli H. Fluorescence and magnetic activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. Fertil Steril 2014; 102: 566-80. doi. 10.1016/j.fertnstert.2014.04.036.
26.Panda RP, Barman H, Mohapatra C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from Labeo rohita testis for in vitro propagation. Theriogenology2011; 76: 241-51. doi. 10.1016/j.theriogenology.2011.01.031.
27.Grisanti L. Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation. Stem cells 2009; 27: 3043-52. doi. 10.1002/stem.206.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]

Experimental Investigation of Ki67, POU5F1, and ZBTB16 Expression in the Pig and Mouse Testicular Cells using Immunocytochemistry and RT-PCR

Azizi H[1], NiaziTabar A[1], Mohammadi A[1]*

(Received: January 5, 2020 Accepted: May 30, 2020)

Abstract

Introduction: Spermatogonial Stem Cells (SSC) are the originators and beginning points of the spermatogenesis process. Moreover, they are considered the only stem cells in the body that could transfer genetic information to the next generation through gametogenesis. This study aimed to investigate the potency and power of SSC under in vitro and in vivo conditions.

Materials & Methods: Enzymatic digestion technique was utilized to extract the spermatogonial cells of the pig and mouse's testis. They were then cultured in an environment containing FGF, EGF, GDNF, and a feeder layer of STO. For immunocytochemistry and RT-PCR analysis, Ki67, POU5F1, and ZBTB16 markers were used to evaluate the resulted colonies. *Ethics code:* Ir.ausmt.rec.1398.03.07

Findings: The nature of the SSC resulted after separation and culture was proved through measures, such as cluster growth of the colonies in the culture medium, Ki67 marker expression in the immunocytochemistry review which showed the duplication ability, and the morphological criteria observed by an electron microscope. Moreover, the comparative expression of POU5F1 and ZBTB16 markers in the embryonic stem cells, SSC, and Sertoli cells within the seminiferous tubules of the mouse was analyzed by RT-PCR.

Discussions & Conclusions: This experimental study investigated the expression of Ki67, POU5F1, and ZBTB16 in the seminiferous tubules and special cytological features of SCC. The findings are beneficial for future advanced studies in reproductive biology fields.

Keywords: Cytology, Mouse embryonic stem cells, Pluripotent stem cells, Pou5f1 protein, Zbtb16

1. Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
**Corresponding author Email: h.azizi@ausmt.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.29252/sjimu.28.5.1]