Review Article

A Review on the Effective Factors in Differentiation of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Germ Cells and Infertility Treatment

Tooba Mirzapour[1*], Abolfazl Bayrami[1], Zeinab Abdollahi[2]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- M.Sc., Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 5619913131, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*
Email: dr.tooba72@gmail.com

Received: 05/Jun/2016, Accepted: 27/Nov/2016

Abstract

Currently, fertility and survival of future generations is emphasized in societies. Hence, male infertility is a major concern for community health worldwide. In Europe, 14% of young couples have infertility problems. Iranian couples have an infertility rate above World average, at approximately 20.2%. Hormonal factors, genetics, and psychological problems cause 40%-50% of infertility in men. Since there are increasing numbers of cancer patients in industrialized societies and anti-cancer treatments highly eliminate germ cells, hence, cancer treatments reduce male fertility. Recognition of primordial germ cells, to understand their migration process and understanding effective factors in their differentiation can open new avenues for primary studies that follow production of germ cells from other cell sources such as mesenchymal stem cells (MSCs). Therefore, finding a way to distinguish germ cells from MSCs, as well as their preservation and proliferation in a culture system can provide the base for spermatogenesis in an in vitro culture. Isolation and differentiation of germ cells from different cell sources such as umbilical cord using morphogens (bone morphogenetic protein and retinoic acid) is an efficient method for infertility research. We investigate some of the effective factors in differentiation of umbilical cord MSCs to germ cells.

Keywords: Mesenchymal stem cells, BMP4, Germ cells

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 1-17

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

مقاله مروری

مروری بر عوامل مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلول‌های زایا و درمان ناباروری

طوبا میرزاپور[1*]، ابوالفضل بایرامی[1]، زینب عبدالهی[2]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، اردبیل، کدپستی: ۵۶۱۹۹۱۳۱۳۱، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
Email: dr.tooba72@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۵/۰۳/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۷

چکیده

امروزه باروری و بقای نسل در جوامع بسیار مورد توجه قرار گرفته و ناباروری به‌عنوان یک نگرش عمده سلامت اجتماع در سراسر جهان مطرح است. در اروپا ۱٤ درصد زوج‌های جوان از مشکل ناباروری رنج می‌برند. در میان زوج‌های ایرانی میزان ناباروری بالاتر از استانداردهای جهانی و حدود ۲۰/۲ درصد است. بر اساس آمار ٤۰-۵۰ درصد ناباروری‌ها در کشور به علت وجود مشکلات ژنتیکی، هورمونی و جسمی و روانی در مردان است. از طرفی بیماری سرطان به‌طور پیشرونده‌ای در جوامع صنعتی کنونی در حال افزایش است و درمان‌های ضد سرطان به میزان زیادی سلول‌های زایا را از بین می‌برد؛ بنابراین به دنبال درمان سرطان، باروری کاهش می‌یابد. شناخت سلول‌های زایای بدوی، آشنایی با مراحل مهاجرت آن‌ها و نیز شناخت عوامل مؤثر در تمایز آن‌ها می‌تواند راه را برای مطالعات اولیه که در آن به دنبال تولید سلول‌های زایا از منابع سلولی دیگر مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند هموار کند. از این‌رو یافتن راهی برای تمایز سلول‌های زایا از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نگهداری آن‌ها در محیط کشت و تکثیر آن‌ها می‌تواند زمینه‌ای برای ظهور اسپرم‌زایی در شرایط برون تنی (In vitro) فراهم کند. استخراج و تمایز سلول‌های زایا از منابع سلولی گوناگون از جمله بند ناف در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از ریخت‌زاها مانند پروتئین شکل دهنده استخوان نوع ٤ و رتینوئیک اسید روشی کارآمد برای انجام تحقیقات ناباروری است. در مقاله حاضر برخی ازعوامل مؤثر در تمایز سلول‌های مزانشیمی بند ناف به سلول‌های زایا بررسی شد.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پروتئین شکل دهنده استخوان نوع ٤، سلول‌های زایا

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۱-۱۷

مقدمه

در عصر حاضر ناباروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن به‌عنوان یکی از مسایل مهم زندگی اجتماعی مطرح است. در اروپا ۱٤ درصد زوج‌های در سن باروری از این مشکل رنج می‌برند [۱]. در میان زوج‌های ایرانی مطابق با اخبار موجود در رسانه‌های ملی کشور میزان ناباروری بالاتر از استانداردهای جهانی و حدود ۲۰/۲ درصد است. بر اساس آمار ٤۰-۵۰ درصد ناباروری‌ها در کشور به علت وجود مشکلاتی در مردان است که انواع اختلالات اعم از ژنتیکی، هورمونی و مشکلات جسمی و روانی می‌تواند علتی برای ناباروری باشد [۲]. شایع‌ترین عامل ناباروری در مردان کمبود تعداد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

اسپرم‌هاست که در بیشتر موارد به علت عوامل ناشناخته‌ای اتفاق می‌افتد. با توجه به اهمیت موضوع و مشکلات جانبی این نقیصه تلاش‌های زیادی برای درمان این عارضه صورت گرفته‌است که در این میان با پیشرفت دانش سلول‌های بنیادی در طول چند دهۀ اخیر، استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی به‌عنوان یکی از روش‌های مطرح درمانی برای رفع این نارسایی مورد توجه است [۱، ۳، ٤]. برای نیل به این هدف تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های زایا تحت شرایط خاص محیط کشت و اضافه کردن عوامل رشدی مناسب می‌تواند مؤثر باشد.

سلول‌های بنیادی

واژه سلول بنیادی، نخستین بار در سال ۱۹۰۸ توسط یک بافت‌شناس روسی به نام الکساندر ماکسیموف مطرح شد [۵]. منشأ این نامگذاری، مشاهده باز تولید سلول‌های خونی در بدن انسان توسط دسته دیگری از سلول‌ها بود و از آن‌جا که برخی سلول‌ها به‌عنوان منشأ دیگر سلول‌های بدن پنداشته می‌شدند، بنابراین سلول بنیادی یا سلول ساقه‌ای نام گرفتند [٦].

سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ در رده‌های زیر قرار می‌گیرند: سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells)، سلول‌های زایای جنینی (Embryonic germ cells)، سلول‌های بنیادی مشابه جرم پر توان (Multipotent germ line stem cells)، سلول‌های کارسینومای جنینی (Embryonic carsinoma cells)، سلول‌های بنیادی بزرگسال (Adult stem cells) و سلول‌های پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells) [۵، ۷، ۸]. سلول‌های مشتق از توده سلولی اولیه (Inner cell mass) که تقریباً در روز چهارم پس از لقاح تشکیل می‌شوند و نیز سلول‌های مشتق از جنین بین روزهای پنج تا هفت پس از لقاح، در گروه سلول‌های بنیادی جنینی قرار دارند. همچنین سلول‌هایی که از گنادهای جنینی به‌دست می‌آیند به‌عنوان سلول‌های زاینده جنینی گفته می‌شوند. سلول‌های بنیادی مشابه جرم پر توان از نظر ریخت‌شناسی و بیان نشانگرهای سطحی بسیار شبیه سلول‌های بنیادی جنینی هستند ولی از لحاظ اپی ژنتیکی با آن اختلاف دارند. خاستگاه این سلول‌ها در بدن ناشناخته شده است و به‌نظر می‌رسد در اندام بیضه درصد زیادی از آن‌ها یافت می‌شوند. سلول‌های تمایز نیافتۀ مشتق از تراتو کارسینوما (Teratocarcinoma) نیز پرتوان هستند و به‌عنوان سلول‌های کارسینومای جنینی شناخته می‌شوند. این سلول‌ها قادر به تشکیل کلونی هستند و با تمایز می‌توانند مشتقات سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم، اندودرم) را به‌وجود آورند. سلول‌های بنیادی بزرگسال دارای پتانسیل تمایزی کمتر نسبت به گروه‌های قبلی بوده و توانایی آن‌ها در تولید انواع سلول‌ها تنها محدود به یک لایه زایا مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells) یا فقط یک رده سلولی خاص مانند سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Heamatopoitic stem cells) هستند [۱، ۵، ۸]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می‌شوند که دارای دو خاصیت عمده هستند؛ اول این که توان تکثیر و تولید سلول‌های مثل خود برای مدت زمان طولانی (خودتجدیدی) در آن‌ها بالاست؛ دوم این‌که پتانسیل تمایز به انواع سلول‌های عملکردی را دارند [۳]. به‌دلیل این‌که باعث پاسخ ایمنی نمی‌شوند، برای ترمیم بافتی مناسب هستند [۹].

سلول‌های پرتوان القایی که در سال ۲۰۰۷ کشف شدند، از برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های پوست و القای آن‌ها به سلول‌های بنیادی پرتوان حکایت می‌کرد [۸ ۵]. این سلول‌ها آینده روشنی برای ترمیم‌های بافتی و درمان انواع ناباروری دارند.

منابع استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مهم‌ترین منبع برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان است که برای اولین بار توسط فریدن اشتاین (Friedenstein) و پتراکوآ (Petrakova) در سال ۱۹٦٦ شناسایی شد [۱۰]. به‌دلیل این‌که با افزایش سن، هم فرکانس و هم پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کاهش می‌یابد، پیدا کردن منابع دیگر ضروری به‌نظر می‌رسد. اخیراً علاوه بر مغز استخوان این سلول‌ها از منابعی مثل بافت

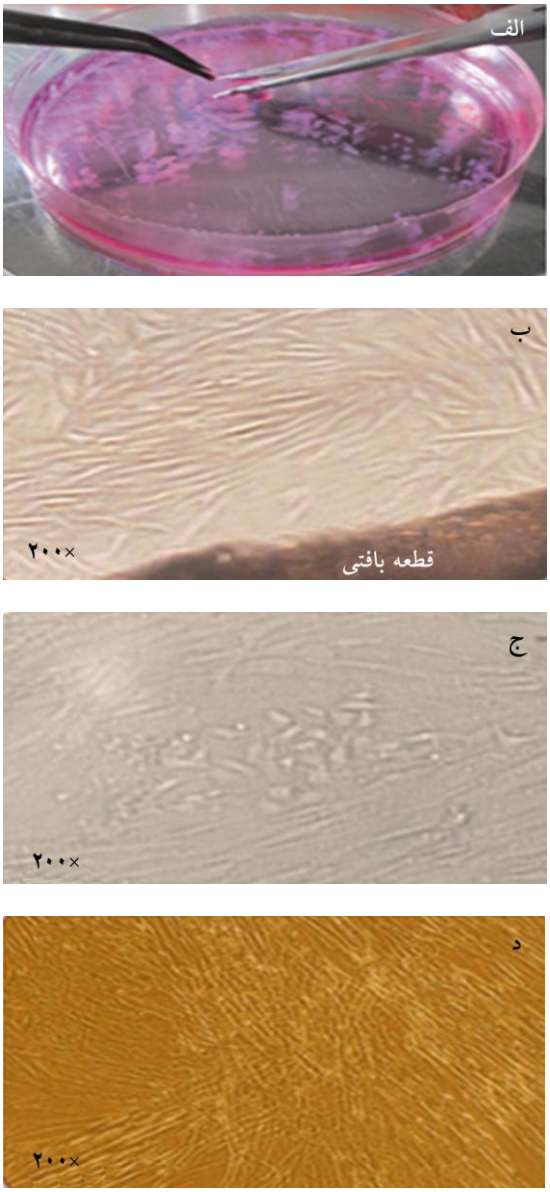
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

پریوست (Periosteum) استخوان ترابکولار، بافت چربی، پرده سینوویال، عضلهٔ اسکلتی، دندان شیری، خون، بافت‌های جفت و بند ناف جداسازی شده‌اند. از این میان، سلول‌های مزانشیمی بند ناف به‌دلیل چندین ویژگی خاص مورد توجه قرار گرفته‌اند که از جمله می‌توان به‌دسترسی آسان [۱۱]، جدا شدن به‌صورت غیر تهاجمی در هنگام زایمان، نداشتن موانع اخلاقی و معنوی برای جداسازی [۱۲]، استخراج سلول با حجم زیاد، رشد سریع با سرعت تکثیر بالا، گسترش به‌صورت کلونی، داشتن خواص شبه جنینی، منفی بودن نسبت به CD34 و CD45 و مثبت بودن نسبت به CD44، CD105، CD29 و CD59، ظرفیت خودتجدیدی نسبت به سلول‌های بنیادی بالغ و نیز جلوگیری از پس زدن ایمونولوژیکی [۸، ۱۱، ۱۳] اشاره نمود. بنابراین امروزه بند ناف انسان به‌عنوان یک منبع بسیار مناسبت از سلول‌های بنیادی توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است [٤]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژلهٔ وارتون بند ناف انسان دارای خاصیت پرتوانی با تکثیر نامحدود هستند که تحت شرایط مناسبی می‌توانند به مشتقات هر سه لایه جنینی مثل: سلول‌های عصبی (نورون‌ها)، کندروسیت‌ها، کاردیومیوسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها، سلول‌های استخوانی، سلول‌های ماهیچهٔ اسکلتی و همچنین اخیراً سلول‌های مشابه سلول‌های زایا (Germ-like cell) متمایز شوند [١٤]. جمعیت‌های مختلفی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بند ناف شناسایی‌شده‌اند: اولین دسته در ژلهٔ وارتون (Wharton's jelly) تشخیص داده شدند که بین ناحیهٔ زیر آمنیون و ناحیه اطراف رگ‌ها واقع شده‌اند، دومین دسته، از بافت‌های احاطه کننده رگ‌های بند ناف از ناحیهٔ اطراف عروقی جداسازی شدند، سومین دسته از زیر ناحیه اندوتلیوم سیاهرگ بند ناف و چهارمین دسته ازخون بند ناف جداسازی شده‌اند [١٥].

روش‌های مختلف استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ماهیت متفاوت سلول‌ها سبب شده یک دستورالعمل واحد برای جداسازی همه انواع سلول‌ها موجود نباشد. ابتدایی‌ترین روش در جداسازی و تکثیر آزمایشگاهی سلول‌ها، روش قطعه قطعه کردن است. این روش بافت را از نظر اندازه به‌قدری کوچک می‌کند که گازها و مواد غذایی آزادانه به سلول‌ها برسند [۱۳]. موفقیت این روش بستگی به تکثیر سلول‌های بنیادی حاشیه‌ای و قدرت پخش شدن آن‌ها در ظرف کشت سلول در زمان مورد نظر دارد. بسیاری از مواقع سلول‌های بنیادی موجود در قطعه بافتی پس از قرار گرفتن در محیط کشت دچار شوک شده و تکثیر آن‌ها متوقف می‌شود. در این مواقع زمان زیادی لازم است تا سلول‌ها با محیط جدید سازش یافته و تکثیر آن‌ها از سر گرفته شود [١٦]. روش معمول دیگر، استفاده از سیستم آنزیمی معین برای جدا کردن سلول‌هاست. نوع آنزیم به‌کار رفته بر هضم و بهره‌وری و زیستایی آن‌ها اثر می‌گذارد [١٧]. کلاژنازهای تجاری که از کلستریدیوم هیستولیتیکوم (*Clostridium histolyticum*) به‌دست می‌آیند، اغلب در روش آنزیمی برای هضم بافتی استفاده می‌شوند [١٨]. علاوه بر این؛ آنزیم تریپسین همراه یا بدون EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) نیز به‌طور قابل ملاحظه‌ای به‌عنوان آنزیم تجزیه کننده استفاده می‌شود [١٩]. در این روش مدت زمان تیمار نمونه با آنزیم باید تحت کنترل باشد؛ زیرا زمان زیاد، باعث هضم ماتریکس خارج سلولی و اجزای سلول شده و از چسبندگی سلول‌های جداسازی شده بعد از کشت جلوگیری می‌کند. در واقع زمان تیمار نمونه با آنزیم باید در کمترین حد ممکن نگه داشته شود [٢٠]. بنابراین برای استخراج سلول‌های مزانشیمی از بند ناف انسان روش‌های مختلفی وجود دارد: روش قطعه قطعه کردن، روش کلاژناز- تریپسین، روش کلاژناز- هیالورونیداز- تریپسین و روش تریپسین- EDTA [٢١]. سلول‌های مزانشیمی با موفقیت از هر چهار روش استخراج می‌شوند، هرچند از نظر درصد زیستایی و کلونی‌سازی تفاوت‌هایی با هم دارند. با توجه به مقالات روش اول کارآمدتر بوده است [٣، ٦، ٢١].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]



شکل ۱ استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف به‌روش قطعه بافتی؛ (الف) مراحل اولیه جدا کردن بافت، (ب) تکثیر سلول‌ها از قطعه جدا شده ژله وارتون پس از گذشت ۱۰ روز، (ج) برداشت قطعه بافتی، جدا کردن سلول‌ها از کف ظرف و کشت آن‌ها در ظروف جداگانه پس از گذشت ۱۰ روز، (د) پس از گذشت ۱۵ روز

حفظ، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به‌منظور استفاده بهینه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی لازم است جداسازی و تکثیر آن‌ها بدون از دست دادن بنیادینگی آن‌ها صورت گیرد و حالت چندتوانی و نیز ظرفیت تکثیر در حالت غیرتمایزی آن‌ها حفظ شود [۲۲]. مطالعات اخیر بر طراحی شرایط کشت مناسب مانند اضافه کردن مواد مختلف مانند عوامل رشد به محیط کشت و نیز طراحی داربست‌های زیست تخریب‌پذیر و عوامل فعال کنندهٔ زیستی در رشد و تمایز سلول‌های بنیادی تمرکز کرده‌اند [۲۳-۲۵]. برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های زایا در شرایط آزمایشگاه، شناخت محیط رشد این سلول‌ها و نیز شناسایی عوامل مؤثر بر تمایز آن‌ها ضروری است. همان‌طوری که می‌دانیم سلول‌های زایا در یک ماتریکس ویژه در تماس مستقیم با سلول‌های سرتولی هستند [۲۶]. این ماده زمینه یا ماتریکس خارج سلولی دارای پروتئین‌هایی مثل کلاژن [۶، ۲۷]، فیبرونکتین (Fibronectin) [۲۸] و ژلاتین [۹] است. اخیراً در برخی مطالعات شواهدی مبنی بر این موضوع که ماتریکس‌های خارج سلولی از جمله فیبرونکتین و لامینین (Laminin) می‌توانند به‌عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول‌های بنیادی استفاده شوند و خاصیت خودنوزایی در این سلول‌ها را تقویت نماید، مطرح شده است [۲۹]. علاوه بر این؛ دیده شده است که استفاده از محیط کشت پوشیده با لامینین سبب افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاه در موش و انسان می‌شود [۱۰، ۱۱، ۲۹].

بقا تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به میزان زیادی تحت تأثیرسلول‌های سرتولی قرار دارد. در واقع کنترل تبادلات درون سلولی و تولید پروتئین‌های مهم توسط سلول‌های سرتولی صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها در رشد سلول، تمایز آن و همچنین تقسیمات سلولی به‌وسیله مکانیسم‌های پاراکرین و اندوکرین نقش دارد [۱۲]. حفاظت ساختاری بافت پوششی زایشی و آزادسازی اسپرم به داخل لومن لوله‌های منی‌ساز پس از کامل شدن فرآیند اسپرم‌زایی نیز توسط سلول‌های سرتولی انجام می‌شود [۱۳]. حرکت اسپرماتوگونی نوع B از موقعیت غشایی به سمت لومن نیز بر عهده سلول‌های سرتولی است. این سلول‌ها با شکستن و شکل

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

دادن مجدد ارتباطات سلولی در اطراف سلول‌های زایا این کار را انجام می‌دهند [۳۰]. میزان تولید اسپرماتوزوا به‌وسیله این حرکات کنترل می‌شود و این مراحل در فضای بین سد خونی- بیضه‌ای و غشای پایینی سلول زایا انجام می‌گیرد [۱٤]. گزارش‌های بسیاری نشان دهنده این است که پتانسیل تولید سلول‌های اسپرم در حیوانات بالغ به تعداد سلول‌های سرتولی در بیضه وابسته است [۱٦]. سیتوکاین‌ها و هورمون‌های رشد متعددی توسط سلول‌های سرتولی تولید می‌شود.

سیتوکاین‌ها هورمون‌هایی هستند که مراحل اسپرم‌زایی را کنترل می‌کنند. این هورمون‌ها در بیضه توسط سلول‌های سرتولی تولید می‌شوند و با اتصال به گیرنده‌های خود در فرآیند رشد دخالت دارند. بنابراین طراحی سیستم‌های کشتی که بتواند در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) رشد و تمایز سلول‌های زایا را کنترل کند منوط به شناسایی سایتوکاین‌ها و هورمون‌های رشد تولید شده توسط سلول‌های سرتولی است [۲۵]. فاکتورهای رشد، دارای عملکردهای متفاوتی هستند و می‌توانند اتصالات سلولی، رشد یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، تمایز و مهاجرت سلولی، رگ‌زایی‌های جدید و غیره را تنظیم کنند. در واقع، قادر به انجام کارهای بسیار متفاوتی بسته به زمینه بیوشیمیایی سلول و نیز بیومکانیکی که درون آن قرار می‌گیرند، هستند. فاکتورهای رشد یا به‌صورت خارجی اضافه می‌شوند یا با القای خود سلول‌ها در پاسخ به فشارهای شیمیایی یا فیزیکی ساخته می‌شوند. در کارهای مربوط به مهندسی بافت نیز عوامل رشد در کل مراحل تکثیر و تمایز سلولی استفاده می‌شوند [۲۷].

تلاش برای جداسازی و کشت سلول‌های بیضه‌ای طی سال‌های ۱۹۷۰ آغاز شده است. دو نوع سیستم کشت در روند تکوین اسپرم در محیط آزمایشگاه استفاده می‌شود که عبارتند از: کشت اندام بیضه و کشت تعلیق سلول‌های جدا شده. اگرچه کشت اندام بیضه ظاهراً جذاب‌تر به‌نظر می‌رسد، اما به‌دلیل ساختار پیچیده بیضه و شرایط فیزیولوژیکی، فراهم آوردن شرایطی که بتواند بر روی سلول‌های مشخصی اثر کند مشکل است. در نتیجه کشت سلول‌های زایای جدا شده، بیشتر استفاده می‌شود [۳۲].

از طرفی؛ با وجود اضافه کردن عوامل رشد و سایتوکاین‌ها به محیط کشت، بدون سرم و لایه تغذیه کننده، سلول‌های زایا نمی‌توانند بیش از یک هفته زنده بمانند [۱۷] و تعداد سلول‌ها کاهش می‌یابد. در صورتی که در محیط کشت دارای سرم و لایه تغذیه کننده، حداقل بعضی از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بین نمی‌روند و می‌توانند بعد از پیوند، در بیضه موش گیرنده ایجاد اسپرم کنند [۱۸]. در این محیط‌ها استفاده از محیط سرم‌دار (Fetal calf serum: FCS) یا (Fetal bovine serum: FBS) از ۱-۲۰ درصد و عموماً ۱۰ درصد سرم در دمای ۳۲ یا ۳۷ و ۵ درصد CO_2 توصیه شده است [۱۹، ۲۰، ۲۲، ۲٤]. به‌علاوه سیستم‌های هم‌کشتی نیز سلول‌های زایا را در محیط کشت حمایت می‌کند. بنابراین ناگانو (Nagano) و همکاران اسپرماتوگونی‌ها را در محیط کشتی که حاوی ۱۰ درصد سرم و چندین مکمل دیگر بود روی سلول‌های STO (SIM Thioguanine/Ouabain resistant mouse fibroblast cell line) (رده سلولی مشتق از فیبروبلاست) کشت دادند و مشاهده نمودند که سلول‌های اسپرماتوگونی مدت زیادی زنده می‌مانند [۱۹]. آن‌ها توانستند سلول‌های جدا شده از موش بالغ را افزون بر چهار ماه در محیط کشت سرم‌دار زنده نگه دارند. آن‌ها همچنین نشان دادند که تنها سلول‌های کشت شده روی لایه تغذیه کننده قادر به تشکیل کلونی در بیضه موش گیرنده تیمار شده با بوسولفان است [٤]. عده‌ای دیگر از پژوهشگران توانستند اسپرماتوگونی نوع A را در حضور سرم و هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی به‌مدت یک ماه زنده نگه دارند [۳۰].

انتخاب محیط کشت و عوامل مناسب القایی، تأثیر زیادی بر رشد و عملکرد سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاه دارد. تاکنون سیستم‌های کشت متعددی در راستای ارتقای مطالعات ناباروری ابداع شده است [۱۵]. هرچند، نتایج زیادی از تولید سلول‌های زایای بدوی عملکردی در محیط In vitro در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

دست نیست، اما این مطالعات نشان دهنده تلاش‌هایی در زمینه تولید و تشخیص این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه است. با وجود تحقیقات انجام شده، مطالعات گسترده‌تر برای شناسایی شرایط صحیح کشت و به‌دنبال آن اضافه کردن مکمل های تغذیه‌ای می‌تواند در تکامل سلول‌های زایا مؤثر باشد. این سلول‌ها برای انجام تحقیقات و درمان ناباروری بسیار با ارزش هستند [۲۱، ۲۶].

سلول‌های بنیادی که از منابع مختلف استخراج می‌شوند می‌توانند منبع بالقوه جدیدی از سلول‌های زایای نر و ماده برای باروری فراهم کنند. برای استفاده از این سلول‌ها به‌عنوان منشأ سلول های زایا در ابتدا باید ریزمحیط سلول‌های زایا، فاکتورهای اولیه‌ای که بر تمایز سلول‌های زایای بدوی (Primordial Germ Cells) تأثیرگذار هستند، شناسایی شوند. به عبارت دیگر؛ شناسایی دقیق مواد ریخت‌زا، عملکرد آن‌ها، زمان ظهور آن‌ها در مراحل اولیه جنینی و گیرنده‌هایی که این ریخت‌زاها قادر به اتصال به آن‌ها هستند ضروری است [۱، ۲۷].

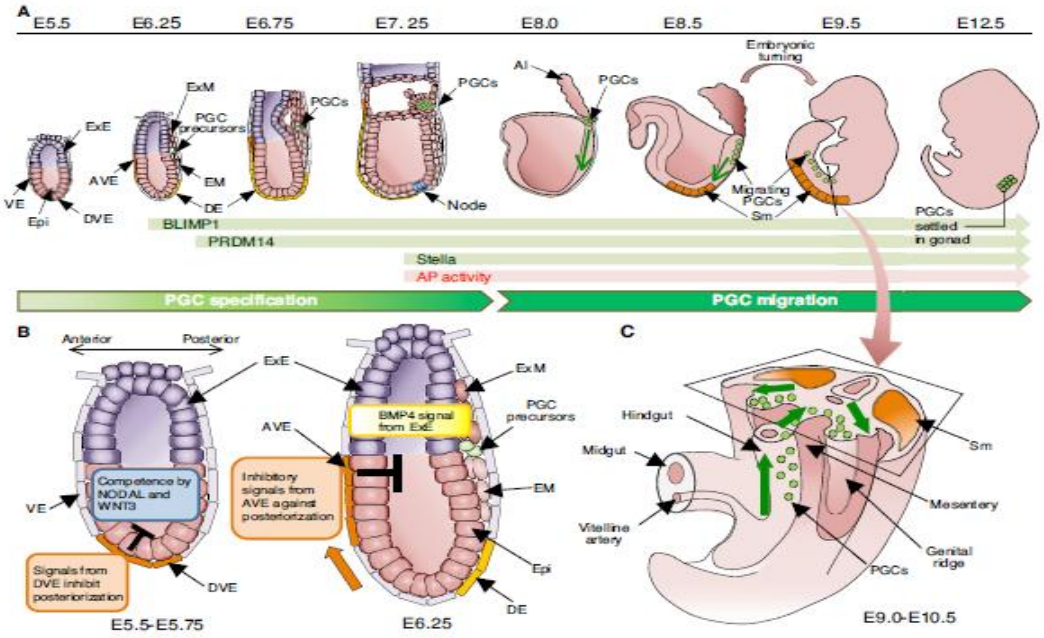
چرخه تکامل سلول زایای بدوی در داخل بدن در دوران جنینی

سلول‌های زایای بدوی جمعیت سلولی بسیار تخصص یافته‌ای هستند که پیش‌ماده جنینی گامت‌ها در حیوانات بالغ به حساب می‌آیند. این سلول‌ها تک توان (Unipotent) بوده و سرانجام به اسپرم و تخمک تمایز می‌یابند. سلول‌های زایای بدوی در شرایط درون بدن از سلول‌های اپی‌بلاست خلفی با ضخامت یک یا دو لایه سلول نزدیک اکتودرم خارج جنینی بعد از گاسترولاسیون (Gastrulation) به‌وجود می‌آیند. اپی‌بلاست از توده سلولی بلاستوسیت مشتق شده و پیش‌ساز تمامی سلول‌های تشکیل‌دهنده جنین است. سلول‌های زایای که بدوی برای اولین بار در مزودرم خارج جنینی در روز ۷.۲۵ در موش آشکار می‌شوند [۳۳]، در پایه آلانتوییس (Allantois) متمرکز شده و تعداد آن‌ها به‌حدود ۱۰-۱۰۰ سلول می‌رسد و توسط رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و OCT-4 (Octamer-binding Transcription factor 4)، TNAP (Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase) قابل تشخیص هستند.

در موجودات پست‌تر سلول‌های زاینده به‌واسطهٔ بخش‌بندی سیتوپلاسم اووسیت به‌وجود می‌آیند ولی در پستانداران هیچ پلاسم زایایی وجود ندارد و سلول های زایای بدوی در حین تکوین جنین، توسط سلول های دیگر القا می‌شوند. مطالعات جنین‌شناسی نشان داده است که سلول‌های پروکسیمال (Proximal) اپی‌بلاست هم در سلول های زایای بدوی و هم مزودرم خارج جنینی یافت می‌شوند. مطالعات تام (Tam) و ژو (Zhou) در سال ۱۹۹۶ نشان داد که اگر سلول‌های اپی‌بلاستی ناحیه دیستال (Distal) که از نورواکتودرم مشتق می‌شود به ناحیه پروکسیمال که از اکتودرم خارج جنینی مشتق می‌شود، پیوند زده شود سلول‌های زایای بدوی تشکیل خواهند شد. ولی اگر سلول‌های اپی‌بلاستی ناحیه پروکسیمال به ناحیه دیستال پیوند بخورد قادر به تشکیل سلول‌های زایای بدوی نخواهند بود. این نتایج نشان می‌دهد که ناحیه اتصالی نزدیک به اکتودرم خارج جنینی، قادر به تشکیل سلول‌های زایای بدوی خواهد بود. در آزمایش‌های دیگری که طی آن سلول‌های اپی‌بلاستی روزهای ۵:۵ و۶:۷۵ تکوین جنینی روی لایه تغذیه کننده کشت شدند، نتایج نشان داد اگر لایه تغذیه کننده بستری از اکتودرم خارج جنینی باشد، سلول های زایای بدوی شکل می‌گیرند؛ اما اگر لایه تغذیه کننده از این نوع نباشد سلول های اپی‌بلاستی قادر به تولید سلول های زایای بدوی نخواهند بود. [۳۳، ۳۴]

چرخه تکامل سلول زایا شامل سه مرحله اختصاصی شدن، مهاجرت و تکثیر و تکامل وابسته به جنس قبل و بعد از تولد می‌باشد [۳۵]. ظهور ویژگی‌های خاص در هر منطقه از اپی‌بلاست کمی قبل از شروع گاسترولاسیون منجر به اختصاصی شدن مناطق می‌شود به‌طوری که سلول‌هایی که به‌طور مستقیم در مجاورت اکتودرم خارج جنینی قرار دارند توانایی شرکت در رده سلول زایا را دارند [۳۶].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]



شکل ۲ مراحل مختلف اختصاصی شدن سلول زایا [۳۵]

اختصاصی شدن سلول‌های زایا

فرآیند اختصاصی شدن در اپی‌بلاست تحت القای عواملی است که توسط سلول‌های خارج جنینی ترشح می‌شوند. از جمله این عوامل Bmp4 از خانواده TGFβ (β-Transforming Growth Factor) است که توسط مزودرم خارج رویانی تولید شده و به گیرنده خود روی سلول زایا متصل می‌شود [۳۷]. BMPها (Bone Morphogenetic Proteins) به‌عنوان تنها عضو ابرخانواده TGFβ که درخودنوزایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز دخیلند شناخته می‌شوند [۳۸]. ابرخانواده TGFβ با داشتن ۳۳ لیگاند در انسان شناخته می‌شود و شامل اکتیوین/اینهیبین (Activin/Inhibin)، پروتئین ریخت‌زای استخوانی BMP، GDF (Growth Differentiation Factors) و خانوادهٔ شبه نودال (Nodal) است. این لیگاندها توانایی هدایت فرآیندهای چندگانهٔ سلولی شامل رشد، تمایز، مهاجرت و مرگ را دارد [۴۰]. بدین ترتیب، لیگاندهای TGFβ، رشد و ریخت‌زایی بافت‌های مختلف را کنترل می‌کند. این کنترل در غدد به بهترین شکل دیده می‌شود. به‌طوری که پیام‌های سلولی TGFβ برای تکوین بسیار ضروری و نیز برای عملکرد بیضه و تخمدان بسیار مهم است [۳۳].

تکثیر سلول‌ها، بقا و تمایز آن‌ها به سلول‌های سلول‌های زایای بدوی به دوزهای مختلف BMP4 که به‌وسیله بافت خارج جنینی ترشح می‌شود، وابسته است. قبل از هفته دوم، بیان BMP4 در بیضه به جز در منطقه شبکه بیضه (Rete Testis) که مقادیر بالای بیان را نشان می‌دهد، پایین است. بیان دوزهای مختلف BMP4 در مرحله پاکی‌تن (Pachytene) اسپرماتوسیت، هنگامی که این سلول‌ها در بیضه بعد از هفته دوم ظاهر شدند، قابل مشاهده است. علاوه بر این؛ BMP4 در مراحل تکوین، در همه جای اپی‌دیدیم بیان می‌شود [۳۰]. BMP4 توسط اکتودرم خارج جنینی قبل از گاسترولاسیون و طی آن تولید می‌شود و به گیرنده‌های R-Smad و Alk3 در سطح سلول‌های زایا متصل و سبب فعال شدن عوامل رونویسی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Blimp1 و ژن‌های خاص سلول زایا از جمله Fragilis در نزدیک اپی‌بلاست می‌شود. بیان Fragilis اولین مرحله در متعهد شدن سلول زایا است و بیان آن در سلول‌های زایای بدوی افزایش می‌یابد و منجر به القا بیان ژن‌های اختصاصی وابسته به سلول‌های زایای بدوی مثل DPP_3a (stella) و mvh (Mouse Vasa homolog gene) می‌شود. در واقع به‌دنبال بیان Fragilis جدایی سلول‌های زایا از پیش‌ساز آلانتوئیس رخ می‌دهد. این مطلب نشان می‌دهد بیان بالای ژن Fraglis و به‌دنبال آن بیان ژن‌های Stella در اختصاصی شدن سلول‌های زایای اولیه و متمایز شدن سلول‌های زایای بدوی از سلول‌های سوماتیک مجاور نقش دارد [٤١]. بیان Blimp1 که عامل رونویسی ضروری برای اختصاصی شدن سلول‌های زایای بدوی است به میزان اندکی در سلول‌های جلویی اپی‌بلاست در روزهای E6 آغاز می‌شود [٤٢]. عامل رونویسی Prmd14 نیز که برای اختصاصی شدن سلول زایا مورد نیاز است، بعد از بیان بالای Blimp1 تحریک کننده پیش‌ماده سلول‌های زایای بدوی است. طی اختصاصی شدن دودمان سلول زایا الگوی بیان ژن‌ها و حالت اپی ژنتیک سلول‌ها با فعالیت وابسته به Blimp1 و Prmd14 تغییر می‌کند [٤٣].

در مراحل ابتدایی گاسترولاسیون، در روز ٦:٢٥ تکوین جنینی، تقریباً ٦ لایه از سلول‌هایی که پیش‌ساز سلول‌های زایای بدوی هستند، ژن blimp1 را بیان می‌کنند. پروتئین bLIMP1 (B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1) یک بازدارندهٔ رونویسی است و برای اختصاصی شدن سلول‌های زایای بدوی لازم است. این پروتئین مانع رونویسی ژن‌های دخیل در سوماتیکی شدن می‌شود. ژن‌های زیادی مانند SRY(Sex-determining region Y) و box2 و عامل رونویسی Nanog و Oct4 باعث حفظ چندتوانی سلول‌های زایای بدوی می‌شوند. مخصوصاً در اکثر مطالعات، از ژن Oct4 به عنوان نشانگر شناسایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی As نام می‌برند [٤٤].

مطالعات حذف ژنی نشان داده‌اند که BMP (پروتئین شکل‌دهنده استخوان) که دارای انواع BMP4، BMP2، BMP8 است و نیز Smad1، Smad2، Smad5 برای تولید سلول‌های زایای بدوی ضروری هستند [٤٥، ٤٦]. مطالعه تمایز سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد که پیام سلولی Bmp با واسطه Smad در ایجاد دودمان سلولی قلبی، عصبی، خون‌ساز و کبدی شرکت می‌کنند. غیر فعال شدن این ژن‌ها منجر به شکست تشکیل سلول‌های زایای بدوی می‌شود [٤٧]. Bmp2 ارتباط نزدیکی با Bmp4 دارد و هر دو در وزیکول آندودرم بیان می‌شوند. غیر فعال کردن ژن Bmp2 به‌طور قابل توجهی تعداد سلول زایا را کاهش می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد که BMPها برای خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی غیر ضروری است ولی برای تعهد سلول‌های اجدادی ضرورت دارد[٤٨]. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که پیام‌های سلولی Smad در ایجاد تعادل بین خودنوزایی و تمایز سلول زایا با تعدیل بیان ژن‌های خاص سلول زایا (Dazl، Stra8 و Mvh) زمانی که سلول‌های بنیادی جنینی از مرحله خودنوزایی به مرحله زایا وارد می‌شوند ضروری است [٤٩]. بنابراین دو پروتئین BMP4 و BMP2 بر تعداد سلول‌های زایا اثر افزایشی دارند. بر طبق مطالعات گذشته ١٠٠ نانوگرم/ میلی‌لیتر از BMP4 باعث افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های سلول زایا می‌شود. بنابراین برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنین انسان به سلول زایا می‌تواند استفاده شود [٣٩].

مهاجرت

در این زمان سلول‌های زایای بدوی موجود در فضای خارج جنینی وارد بدن جنین شده و از اپیتلیوم کیسه زرده وارد آندودرم روده خلفی می‌شوند. سپس از طریق مزانتر پشتی در طی روزهای ١١/٥ بعد از جفت‌گیری وارد ستیغ تناسلی می‌شوند. طی مهاجرت تکثیر کرده و تعداد آن‌ها به حدود ٢٥٠٠-٥٠٠٠ سلول طی روزهای ١٢/٥ می‌رسد. این سلول‌ها در روز ١٣ تکوین جنینی به ستیغ‌های تناسلی می‌رسند. فرآیندهای تکثیر و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

(Apoptosis) نیز طی مهاجرت اتفاق می‌افتد که بر اساس گیرنده‌های واقع بر سطح سلول‌های زایای بدوی و لیگاندهای ترشح شده از سلول‌های سوماتیک اطراف است. طی مهاجرت اگر اشتباهی به مکان دیگری بروند توسط فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده حذف می‌شوند.

چندین پروتئین که توسط سلول‌های زایای بدوی بیان می‌شود، در مهاجرت و بقای آن‌ها نقش دارند. برای مثال کادهرین (CDH1) در کلونی‌زایی و مهاجرت به سمت ستیغ‌های تناسلی مؤثر است. BMPsها علاوه بر اختصاصی شدن سلول‌های زایای بدوی در مهاجرت آن‌ها نیز نقش دارند. از طرفی گلیکوپروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix: ECM) نیز در مهاجرت سلول‌های زایای بدوی از روده خلفی به سمت گنادها نقش دارند. محتویات ECM شامل کلاژن نوع دو و کلاژن نوع پنج و فیبرونکتین و لامینین است و در مهاجرت این سلول‌ها از طریق مکانیسم گرادیانی دخالت دارند. سلول‌های زایای بدوی به کلاژن نوع یک چسبندگی ندارند [۵۰].

تعدادی از گیرنده‌های سطحی سلول‌های زایای بدوی؛ اینتگرین‌هاست که ترکیبی از واحدهای هترودیمر α و β است که در اتصال این سلول‌ها به مولکول‌های مختلف ECM مخصوصاً فیبرونکتین نقش دارند. پس از پایان مهاجرت، این سلول ها شروع به بیان ژن Mvh می‌نمایند. Mvh شاخص سلول‌های زایای پس از مهاجرت است [۵۱].

عوامل مؤثردر مهاجرت و تکثیر سلول‌های زایای بدوی هنوز نامشخص است. در موش در عدم حضور c–kit یا لیگاند آن، عامل سلول بنیادی (SCF)، تقریباً هیچ سلول‌زایایی وارد گنادها نمی‌شود. در ستیغ تناسلی موش در روز ۱۰/۵ پس از جفت‌گیری عامل تبدیل‌کننده رشد ß1 (TGFß1) ترشح می‌شود که قادر به جذب سلول‌های زایای بدوی است. سلول‌های زایای بدوی طی مهاجرت با طیف وسیعی از سلول‌های سوماتیک در تماس هستند که سبب ایجاد تغییراتی در سلول‌های زایا می‌شود [۵۲]. مهاجرت سلول‌های زایای بدوی همراه با بیان ژن mvh (vasa) که شاخص ویژه سلول‌های زایای پس از مهاجرت است همراه است. سلول‌های زایای بدوی وارد غده شده و تکثیر آن‌ها متوقف می‌شود و تمایز خود را شروع می‌کنند [۵۳]

وقتی سلول‌های زایای بدوی در حال مهاجرت هستند، دیگر نشانگرهای سلول زایا مانند Stella و C–kit را بیان می‌کنند. وقتی به غده رسیدند نشانگرهای قبل از میوز Dazl Vaza، و پروتئین Scp1، Scp2، Scp3 را بیان می‌کنند. نشانگر سلول‌های میوز یافته ژن Dmc1 است. سلول‌های زایای زنانه وارد تقسیم میوز می‌شوند و در پروفاز میوز ۱ متوقف می‌شوند در حالی‌که سلول‌های زایای مردانه در میتوز متوقف می‌شوند و وارد میوز نمی‌شوند و این وضعیت تا زمان بلوغ ادامه دارد [۵۴].

تکامل وابسته به جنس در زمان قبل و بعد از تولد

زمانی که سلول‌های زایای بدوی به ستیغ‌های تناسلی می‌رسند تعدادشان به ۲۶۰۰۰ سلول می‌رسد. اطراف این سلول‌ها توسط سلول‌های سرتولی بیضه‌ها پوشیده می‌شود؛ در این حالت به آن‌ها گونوسیت می‌گویند. در روز ۱۶ تکوین جنینی چرخهٔ تقسیم سلولی در مراحل G0 یا G1 متوقف می‌شود و تکثیر بعد از تولد ادامه می‌یابد. در این حالت تغییراتی در بیان برخی پروتئین‌ها ایجاد می‌شود؛ مثلاً بیان (Protein Phosphatase 2A: PP2A) که باعث تکثیر گونوسیت‌ها می‌شود متوقف و واحدهای Activin A که باعث تکثیر سلول‌های زایای بدوی می‌شوند، مهار می‌شود [۵۵].

همزمان با قابل تشخیص شدن بیضه و تخمدان از نظر ریخت‌شناسی در روز ۱۳/۵ بعد از نزدیکی، سلول‌های زایای بدوی روند تکامل وابسته به جنس را شروع می‌نمایند. سرانجام حدود ۲۶۰۰۰ سلول‌های زایای بدوی به غده‌ها می‌رسند. بعد از تشخیص تخمدان و بیضه از نظر ریخت‌شناسی طی روزهای ۱۳/۵ بعد از نزدیکی، سلول‌های زایا تکامل وابسته به جنس

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

خود را شروع می‌کنند [۵۷]. در جنس مؤنث این سلول‌ها پس از وارد به تقسیم میوز، در پروفاز میوز یک متوقف می‌شوند و پس از بلوغ در پدیده تولید فولیکول به‌صورت دوره‌ای به‌کار گرفته می‌شوند. در حالی‌که در جنس نر در فاز G1 و G0 چرخه میتوزی متوقف و ادامه میتوز بعد از بلوغ دنبال می‌شود [۵۸]. دلیل این توقف و ادامه تقسیم در جنس نر و ماده به تولید رتینوئیک‌اسید (Retinoic acid: RA) وابسته است. این ماده در هر دو جنس در مزونفروز (Mesonephros) تولید می‌شود و در تنظیم تصمیم‌گیری سلول زایا برای ورود به میوز یا توقف در مرحله میتوز نقش دارد. در جنس نر به‌خاطر تولید آنزیم Cry 26 b1 توسط سلول‌های سوماتیک ستیغ تناسلی، تخریب RA شروع و در نتیجه مانع ورود سلول زایا به مرحله تقسیم میوز می‌شود ولی در جنس ماده این آنزیم بیان نمی‌شود؛ در نتیجه سلول‌های بدوی وارد تقسیم میوز می‌شوند. پس از این‌که سلول‌های زایای مردانه داخل ستیغ تناسلی قرار گرفتند توسط سلول‌های سوماتیک سرتولی احاطه می‌شوند و تبدیل به گونوسیت می‌شوند [۳۵]. بعد از تولد، گونوسیت‌ها به غشای پایه مهاجرت می‌کنند و به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تمایز می‌یابند. این سلول‌ها قابلیت تمایز به اسپرماتوزوا در فرآیند پیچیده اسپرماتوژنز را دارند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها سلول‌های بنیادی بالغ هستند که می‌توانند به نسل بعدی وارد شوند [۵۸]. مطالعاتی که توسط گیجسن (Geijsen) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ و نیرنیا (Nayernia) و همکاران در سال‌های ۲۰۰٤ و ۲۰۰٦ صورت گرفته، تأثیر مثبت RA در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های جنسی و تحریک و تکثیر سلول‌های زایای بدوی را نشان داده‌است [۵۹-٦۱].

RA یک مولکول کوچک قطبی و از مشتقات ویتامین A (رتینول) است که علاوه بر نقش آن در فرآیندهای گوناگون به‌طور واضح در تنظیم عملکردهای بیضه‌ای به‌خصوص در تمایز سلول‌های زایا مورد نیاز است. گیرنده RA در هر دو سلول‌های سرتولی و زایا به‌وسیله لیگاند RA تحریک می‌شود [٦۲]. این مولکول نمی‌تواند مستقیماً به ژن‌ها متصل شود بلکه برای تنظیم بیان ژن‌ها باید به یک گروه از عوامل رونویسی که گیرنده‌های هسته‌ای RA (Retinoic Acid Receptor: RAR) نام دارد متصل شوند. رتینوییدها در سلول هدف، دارای دو نوع رسپتور به نام گیرنده‌های x رتینوییـد (RXRS) و گیرنده‌های اسید رتینوییک (RARS) است. این دو گیرنده از خانواده گیرنده‌های هورمونی استروئیدی- تیروئیدی است. گیرنده‌های RA (RAR) و گیرنده‌های X رتینوید (RXR) در سه نوع (γ,β,α) یافت می‌شود [٦۳]

RA می‌تواند هم به‌عنوان یک عامل ایجاد ناهنجاری و هم به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان داخلی عمل کند. در نتیجه به آسانی از بین بافت‌ها منتشر می‌شود و به‌وسیله اتصال به گیرنده‌های RA در داخل هسته (RARs) عمل می‌کند [٦٤]. از آن جایی که Stra8 ژن هدف RA است، بیان Stra8 در فقدان RA مهار می‌شود. به محض افزودن RA بیان Stra8 تحریک و بیان Oct-4 متوقف می‌شود [٦۵]. اما RA یک عامل چند منظوره است و تکوین و تمایز سلول‌های عصبی، قلبی و بسیاری از بافت‌های دیگر را نیز القا می‌کند. این‌که چه غلظتی از RA سلول‌های بنیادی را به سمت تمایز به سلول‌های مشابه زایا پیش می‌برد نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد [٦٦].

نیرنیا و همکاران در سال ۲۰۰٦ سلول‌های بنیادی جنینی که با Stra8 ترانسفکت شده بود را تحت تیمار RA قرار دادند و آن‌ها را به سلول‌هایی که برای Prm1 مثبت بودند (نشانگر پس از میوز) تمایز دادند. سپس این سلول‌ها را به سلول تخم تزریق و آن‌ها را به مادران گیرنده منتقل کرد و توانست نوزادانی تولید کند. از طرفی تولید سلول‌های زایا از سلول‌های کارسینومای جنینی و سلول‌های مشتق از مغز استخوان تحت تیمار RA هم گزارش شده است [٦۰، ٦۱]. در مطالعه دیگر توسط هووآ (Hua) در سال ۲۰۰۹ توانایی تمایز سلول‌های زایا از سلول‌های بنیادی مغز استخوان تحت تأثیر دوزهای مختلف RA و عصاره بیضه‌ای گزارش شده است. آن‌ها نشان دادند جمعیت کوچکی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

استخوان می‌توانند به سلول‌های مشابه زایای مردانه تمایز یابند. این سلول‌ها نشانگرهای سلول‌های زایای اولیه یعنی oct-4، Nanog و Vasa را بیان می‌کنند و نشانگرهای ویژه سلول زایا در مراحل مختلف تمایزی مثل Dazl، Stra-8، Integrin-ß1، ACR و Prm1 نیز در آن‌ها دیده می‌شود [٦٧].

در محیط داخل بدن سلول‌های زایای اولیه در میان ریزمحیط لوله‌های منی‌ساز (Nich) دو مسیر در پیش رو دارند: آن‌ها می‌توانند روند خود تجدیدی را برای تولید سلول‌های بنیادی جدید و حفظ ذخیره سلول بنیادی از سر بگیرند یا به مرحله پیشرفته‌تر سلول زایا تمایز یابند. سرنوشت این سلول‌ها توسط عوامل پاراکرین و اندوکرین بالقوه‌ای که توسط خود سلول‌های زایا یا سلول‌های سوماتیک اطراف تولید می‌شود قابل تنظیم است.

سلول‌های سرتولی تنها سلول‌های سوماتیکی هستند که به سمت لومن لوله سمینی‌فروس (Seminíferos) قرار می‌گیرند و یک ساختار حمایتی و ایمونولوژیکی برای سلول‌های زایا فراهم می‌کنند و نقش مهمی در تعهد دودمان سلول زایا و تمایز آن‌ها بازی می‌کنند. بدون حمایت فیزیکی و متابولیسمی سلول سرتولی، تمایز سلول زایا و میوز و تغییر شکل به اسپرم صورت نخواهد گرفت [٦٦]. از این‌رو بهتر است در روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول زایا این سلول‌ها روی بستر سلول‌های سرتولی کشت شوند تا از عوامل مترشحه توسط این سلول‌ها بهره‌مند شوند [٥٩].

بحث

استفاده از یک عامل تمایز در راستای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به سلول‌های زایا برای درمان ناباروری امری لازم و ضروری است. امروزه مطالعات زیادی برای بررسی اثر تمایزی عوامل مختلف در تولید سلول‌های زایا از سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت گرفته است. به عبارت دیگر؛ برای به‌دست آوردن سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی، دست‌کاری ژنتیکی عوامل رونویسی یا استفاده از مولکول‌های پیام‌رسان مؤثر شناخته شده‌است [١٥] شناخت سلول‌های اولیه زایا، آشنایی با مراحل مهاجرت آن‌ها و نیز شناخت عوامل مؤثر در تمایز آن‌ها می‌تواند راه را برای مطالعات اولیه که در آن به‌دنبال تولید سلول‌های زایا از منابع سلولی دیگر مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند هموار کند.

سلول‌های زایای بدوی مسئول ادامه حیات و تکامل گونه هستند. از آن جایی که فرآیند اختصاصی شدن اپی‌بلاست تحت اثر القایی عوامل ترشح شده توسط سلول‌های خارج رویانی رخ می‌دهد، بنابراین بررسی اثر این عوامل در تمایز سلول‌های زایا، راه‌کار مؤثری به‌منظور تولید این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. استفاده از BMP و RA ریزمحیطی فراهم می‌کند که می‌تواند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به سمت سلول‌های زایای بدوی تمایز دهد و آن‌ها را به‌عنوان یک منبع سلولی جدید برای تولید سلول‌های زایا معرفی کند. این سلول‌ها با بهبود روش‌های پیوند می‌توانند به بیضه افراد نابارور پیوند زده شوند [٦٨] و در درمان ناباروری افراد مبتلا به آزواسپرمیای انسدادی (Obstructive azoospermia) که در آن‌ها بافت بیضه فاقد سلول‌های زایای بدوی است یا درصد خیلی پایینی از این سلول‌ها را دارند، مؤثر شود.

منابع

[1] Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. Nature 2006; 439(7073): 216-9.

[2] Fong CY, Subramanian A, Gauthaman K, Venugopal J, Biswas A, Ramakrishna S, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment. Stem Cell Rev 2012; 8(1): 195-209.

[3] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica 2006; 91(8): 1017-26.

[4] Mirzapour T, Movahedin M, Koruji M, Nowroozi MR. Xenotransplantation assessment: morphometric study of human spermatogonial stem cells in recipient mouse testes. Andrologia 2015; 47(6): 626-33.

[5] Kumar R, Sharma A, Pattnaik AK, Varadwaj PK. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. J Nat Sci Biol Med 2010; 1(1): 43-52.

[6] Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 95(5): 209-14.

[7] Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. Science 2002; 297(5580): 392-5.

[8] Mirzapour T, Tengku Ibrahim TA, Movahedin M, Haron AW, Siraj SS, Koruji M, Nowroozi MR, Rafieian SH. Stem Cells research and its applications: A review. J applied Sci 2011; 11(1); 163-73.

[9] Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, Zhang J. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation. Biomaterials 2006; 27(7): 1095-103.

[10] Tavakolifar F, Shahverdi A, Pirouz M, Shakeri M, Koruji M, Baharvand H. The effect of laminin and gelatin extracellular matrix on short-term cultivation of neonate mouse spermatogonial stem cells. Journal of Iranian Anatomical Sciences 2010; 8: 37-48.

[11] Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, Hovingh S, de Reijke TM, de la Rosette JJ, van der Veen F, de Rooij DG, Repping S, van Pelt AM. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA; 302(19): 2127-34.

[12] Wahab-Wahlgren A, Martinelle N, Holst M, Jahnukainen K, Parvinen M, Söder O. EGF stimulates rat spermatogonial DNA synthesis in seminiferous tubule segments in vitro. Mol Cell Endocrinol 2003; 201(1-2): 39-46.

[13] Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Hahnel AC. Dose-response of RAG2-/-/gammac-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. Reproduction 2003; 126(2): 205-16.

[14] de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl 2000; 21(6): 776-98.

[15] Huang P, Lin LM, Wu XY, Tang QL, Feng XY, Lin GY, Lin X, Wang HW, Huang TH, Ma L. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. J Cell Biochem 2010; 109(4): 747-54.

[16] Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

DM, Robertson DM, Wreford NG. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. Biol Reprod 1996; 54(1): 36-44.

[17] Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod 1999; 61(1): 225-30.

[18] Nagano M, Brinster RL. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. APMIS 1998; 106(1): 47-55.

[19] Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell 1998; 30(4): 389-97.

[20] Nagano MC. Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. Biol Reprod 2003; 69(2): 701-7.

[21] Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, Samani FS, Torshizi Z, Nematollahi-Mahani SN. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2012; 48(2): 75-83.

[22] Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. J Androl 2003; 24(5): 661-9.

[23] Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, Pirhajati V, Shirinbayan P, Koruji M. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. Int J Nanomedicine 2013; 8: 4563-76.

[24] Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, McLean DJ. Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2004; 70(3): 625-31.

[25] Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, Rafieian SH. 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.

[26] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2009; 45(5-6): 281-9.

[27] Pabbruwe MB, Esfandiari E, Kafienah W, Tarlton JF, Hollander AP. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. Biomaterials 2009; 30(26): 4277-86.

[28] Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. J Biomed Mater Res A 2006; 78(4): 781-91.

[29] Yuan Z, Hou R, Wu J. Generation of mice by transplantation of an adult spermatogonial cell line after cryopreservation. Cell Prolif

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

2009; 42(2): 123-31.

[30] Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res C Embryo Today 2009; 87(1): 27-34.

[31] van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. J Androl 2001; 22(4): 696-704.

[32] Nowroozi MR, Ahmadi H, Rafiian S, Mirzapour T, Movahedin M. In vitro colonization of human spermatogonia stem cells: effect of patient's clinical characteristics and testicular histologic findings. Urology 2011; 78(5): 1075-81.

[33] Kimura T, Nakano T. Induction of pluripotency in primordial germ cells. Histol Histopathol 2011; 26(5): 643-50.

[34] Tremblay KD, Dunn NR, Robertson EJ. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. Development 2001; 128(18): 3609-21.

[35] Nagano MC. In vitro gamete derivation from pluripotent stem cells: progress and perspective. Biol Reprod 2007; 76(4): 546-51.

[36] Anderson R, Copeland TK, Schöler H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. Mech Dev 2000; 91(1-2): 61-8.

[37] Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. Development 2012; 139(1): 15-31.

[38] de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction 2001; 121(3): 347-54.

[39] Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. J Biochem 2010; 147(1): 35-51.

[40] von Schönfeldt V, Wistuba J, Schlatt S. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. Cytogenet Genome Res 2004; 105(2-4): 235-9.

[41] Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. Nature 2002; 418(6895): 293-300.

[42] Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature 2005; 436(7048): 207-13.

[43] Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y, Saitou M. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nat Genet 2008; 40(8): 1016-22.

[44] Ewen KA, Koopman P. Mouse germ cell development: from specification to sex determination. Mol Cell Endocrinol 2010; 323(1): 76-93.

[45] Fei T, Xia K, Li Z, Zhou B, Zhu S, Chen H, Zhang J, Chen Z, Xiao H, Han JD, Chen YG. Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. Genome Res 2010; 20(1): 36-44.

[46] Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(14): 7858-62.

[47] Loebel DA, Watson CM, De Young RA, Tam PP. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Dev Biol 2003; 264(1): 1-14.

[48] Zhao GQ, Garbers DL. Male germ cell specification and differentiation. Dev Cell 2002; 2(5): 537-47.

[49] Cheng L, Gearing DP, White LS, Compton DL, Schooley K, Donovan PJ. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. Development 1994; 120(11): 3145-53.

[50] Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AM, Vormer TL. Molecular control of rodent spermatogenesis. Biochim Biophys Acta 2012; 1822(12): 1838-50.

[51] De Felici M, Dolci S, Pesce M. Cellular and molecular aspects of mouse primordial germ cell migration and proliferation in culture. Int J Dev Biol 1992; 36(2): 205-13.

[52] Readhead C, Müller-Tidow C. Genes associated with the development of the male germ line. Reprod Biomed Online 2002; 4 Suppl 1: 52-7.

[53] Maatouk DM, Resnick JL. Continuing primordial germ cell differentiation in the mouse embryo is a cell-intrinsic program sensitive to DNA methylation. Dev Biol 2003; 258(1): 201-8.

[54] Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. Curr Opin Genet Dev 2003; 13(5): 463-71.

[55] Moreno SG, Attali M, Allemand I, Messiaen S, Fouchet P, Coffigny H, Romeo PH, Habert R. TGFbeta signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. Dev Biol 2010; 342(1): 74-84.

[56] Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. Physiol Rev 2007; 87(1): 1-28.

[57] Sorrentino E, Nazzicone V, Farini D, Campagnolo L, De Felici M. Comparative transcript profiles of cell cycle-related genes in mouse primordial germ cells, embryonic stem cells and embryonic germ cells. Gene Expr Patterns 2007; 7(6): 714-21.

[58] Ning L, Goossens E, Geens M, Saen DV, Tournaye H. Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. Middle East Fertility Society Journal 2012; 17(1): 1-7

[59] Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature 2003; 427:148-54.

[60] Nayernia K, Li M, Jaroszynski L, Khusainov R, Wulf G, Schwandt I, Korabiowska M, Michelmann HW, Meinhardt A, Engel W. Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. Hum Mol Genet 2004; 13(14): 1451-60.

[61] Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. Dev Cell 2006; 11(1): 125-32.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[62] Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(8): 2474-9.

[63] Hollingshead HE, Killins RL, Borland MG, Girroir EE, Billin AN, Willson TM, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. Carcinogenesis 2007; 28(12): 2641-9.

[64] Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2006; 46: 451-80.

[65] Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. Nat Genet 2006; 38(12): 1430-4.

[66] Tavakolifar F, Shahverdi A, Pirouz M, Shakeri M, Koruji M, Baharvand H. Comparison of neonatal and adult mice-derived sertoli cells in support of expansion of mouse spermatogonial stem cells in vitro. Int J Fertil Steril 2012; 5(4): 217-24.

[67] Hua J, Pan S, Yang C, Dong W, Dou Z, Sidhu KS. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. Reprod Biomed Online 2009; 19(1): 99-105.

[68] Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Haron AW, Makoolati Z, Nowroozi MR. Effect of donor cells concentration on colonization of human spermatogonial stem cells in recipient mouse testes. Journal of Biological Sciences 2010; 10: 730-8.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]