Original Article

Production of embryonic stem like-cells from neonatal mouse testis after exposure to low-intensity ultrasound

Arian Azimi[1], Zohreh Mazaheri[2*], Mansoureh Movahedin[3]

1- M.Sc., Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: z_mazaheri @modares.ac.ir

Received: 22/Feb/2017, Accepted: 19/Sep/2017

Abstract

Objective: Pluripotent stem cells derived from testis are a new, unlimited source for cell therapy in regenerative medicine. Recently, studies show that spermatogonial stem cells can form embryonic stem-like cells (ES-like cells) in vitro. New procedures such as low intensity ultrasound (LIUS) can have positive effects on cell growth and differentiation. However, the effect of LIUS stimulation on ES-like cells has not been explored. In this study we investigate the effects of LIUS on colonization of ES-like cells.

Methods: Initially, we isolated SSCs from neonatal mice. The spermatogonial and Sertoli cells were cultured together in DMEM/F12 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and leukemia inhibitory factor (LIF). ES-like cells were stimulated by LIUS at intensity doses of 200 millwatt/square centimeter (mW/cm^2) over 5 days. Characteristics of the isolated cells were confirmed by immunocytochemistry with Sox2 and SSEA-1 protein for ES-like cells. We also investigated colonization features in the ES-like cells.

Results: After 21 days, we observed there was a significant increase in diameter and number of colonies in the 200 mW/cm^2 group compared to the control group ($p \leq 0.05$). Pluripotency proteins, ES-like cell marker Sox2, and SSEA-1 expressed in the ES-like cells.

Conclusion: LIUS treatment can be an efficient, cost-effective method to improve colonization of ES-like cells during culture.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Embryonic stem-like cells, Low intensity ultrasound (LIUS), Neonatal mouse

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017), No.3, Pages: 49-60

مقاله اصیل

ایجاد سلول‌های بنیادی شبه جنینی از بیضه موش نوزاد پس از تابش امواج فراصوت با شدت پایین

آرین عظیمی[1]، زهره مظاهری[2*]، منصوره موحدین[3]

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
Email: z_mazaheri @modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۰۴ پذیرش مقاله: ۹۶/۰۶/۲۸

چکیده

هدف: سلول های بنیادی پرتوان مشتق شده از بافت بیضه، یک منبع بسیار غنی و جدیدی برای سلول درمانی در پزشکی بازساختی هستند. مطالعات اخیر نشانگر آن است که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی می‌توانند به سلول‌های بنیادی شبه جنینی تغییر یابند. استفاده از امواج فراصوت با شدت پایین، آثار مثبتی روی رشد و تمایز سلول‌ها دارد. هدف از این مطالعه تأثیر امواج فراصوت روی کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی است.

مواد و روش‌ها: ابتدا، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از بیضه نوزاد موش جدا شدند. بعد از کشت دادن این سلول‌ها در محیط DMEM/F12، حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی و عامل مهارکننده لوسمی، توسط امواج فرا صوت با شدت ۲۰۰ (میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع) به‌مدت ۵ روز تحت تابش قرار گرفتند. سلول‌های بنیادی شبه جنینی توسط نشانگرهای Sox2 و SSEA-1 تأیید شده و مشخصه‌های کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی ارزیابی شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که افزایش معنی‌داری در قطر و تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی شبه جنینی در گروه تابش نسبت به گروه کنترل وجود دارد ($P\leq ۰/۰۵$). نشانگرهای پروتئینی پرتوانی سلول‌های بنیادی شبه جنینی از قبیل Sox2 و SSEA-1 بیان شدند.

نتیجه‌گیری: امواج فرا صوت با شدت پایین می‌تواند روش مناسب و کم هزینه‌ای در بهبود بخشیدن کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی در زمان کشت باشد.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های بنیادی شبه جنینی، امواج فرا صوت، موش نوزاد

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحات: ۴۹-۶۰

مقدمه

طی دو دهه گذشته، بسیاری از محققین، فرآیندهایی را مطرح کردند تا به کمک آن بتوانند سلول‌های بنیادی پرتوان را به انواع سلول‌های تخصصی تبدیل کرده تا جایگزین سلول‌های از دست رفته یا آسیب‌دیده بدن شوند [۱]. از جمله سلول‌های بنیادی که برای درمان و مسایل تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial

stem cells) هستند. فرآیند اسپرم‌زایی با تمایز در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی آغاز شده و با انجام تقسیم میتوز در آن‌ها، و تقسیم میوزی همراه با تغییر ریخت شناسی که در اسپرماتوسیت ها (Spermatocytes) صورت می پذیرد، در نهایت منجر به تولید اسپرماتوزآ (Spermatozoa) می‌شود. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیای قرار گرفته روی غشای پایه لوله های منی‌ساز، مسئول روند اسپرم‌زایی هستند [۲]. در شرایط درون بدن (In vivo)، تجدیدپذیری و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توسط عوامل خارجی، یعنی محیط سوماتیک یا با برنامه ژنتیکی داخلی در سلول‌های زایا (Germinal cells) تنظیم می‌شود. سلول‌های سرتولی (Sertoli cells)، تنها سلول‌های سوماتیکی هستند که در لوله‌های منی ساز (Seminiferous tubules) حضور دارند. این سلول ها با حمایت از سلول‌های زایا و همچنین ترشح سیتوکینین هایی (Cytokinins) از قبیل عوامل حمایتی ایمنی، عوامل رشد و تغذیه‌ای نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۳-۵]. اسپرماتوگونی از جمله سلول‌های پرتوانی (Pluripotent) است که در زمان جنینی از گونوسیت‌ها (Gonocytes) مشتق می‌شوند، سپس به داخل لوله‌های منی ساز مهاجرت می‌کنند. مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، علاوه بر تمایز به اسپرم، می‌توانند در محیط کشت‌های ویژه، به سلول بنیادی شبه رویانی نیز تمایز پیدا کنند [۶-۱۰]. بعضی از محققین از جمله، کاناتسو (Kanatsu) و همکارانش در سال ۲۰۰٤، جز اولین کسانی بودند که موفق شدند، سلول‌های بنیادی شبه جنینی (Embryonic stem like cells) را از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی جدا کرده و از اصطلاح سلول‌های بنیادی رده زایای پرتوان (Multipotent germ line stem cells) استفاده نمایند [٦]. امروزه مطالعات جدیدی مبنی بر استفاده از القاگرهای زیستی، مانند امواج فرا صوت با شدت پایین در شرایط آزمایشگاهی، برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی انجام پذیرفته است [۱۱-۱٤]. امواج فرا صوت با شدت پایین، یک موج با فشارصوتی خاصی هستند که توانایی تولید تحریک مکانیکی موضعی برای هدایت فعالیت گیرنده‌های کششی سلول‌های غشا، کانال‌های یونی و اینتگرین‌ها (Integrins) (پیام‌های خارج سلولی) را دارند. علاوه بر اهداف تشخیصی امواج فرا صوتی، در سال ۱۹۲۷ استفاده درمانی از این امواج توسط وود (Wood) مطرح و مطالعات روی توانایی‌های درمانی آن آغاز شد [۱۵]. امواج فرا صوت، نوع خاصی از امواج صوتی با فرکانس بسیار بالا (۲ تا ۲۰ کیلو هرتز) و خارج از محدوده شنوایی انسان است. این‌گونه امواج هنگام عبور از بافت‌های زیستی، طیفی از اثر بخشی خود را ایجاد می نماید [۱٦]. در گذشته امواج فرا صوت عموماً به‌صورت بالینی و به‌عنوان یک ابزار تشخیصی استفاده می‌شد، ولی امروزه مشخص شده که این امواج فواید درمانی نیز دارد. امواج فرا صوت می توانند باعث تسهیل انتقال و تحویل دارو یا ترمیم بافت های آسیب‌دیده شود. همچنین به‌دلیل غیر تهاجمی بودن و عوارض جانبی کمی که دارد، خود را از دیگر درمان‌های فیزیکی متمایز ساخته‌اند [۱۷]. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیر امواج فرا صوت با شدت پایین، روی القای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و تغییر آن به سلول‌های بنیادی شبه جنینی صورت نگرفته است. لذا با توجه به نقش مهم سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های بنیادی شبه جنینی، در این مطالعه سعی بر آن شده است تا تأثیر امواج فرا صوت با شدت پایین روی بقا و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی

در این مطالعه، دو گروه شامل کنترل (بدون تابش امواج فراصوت) و آزمایش (گروه تابش امواج فراصوت پیوسته) در نظر گرفته شدند. در گروه آزمایشی، از محیط کشت ۱۵ درصد سرم حاوی سلول‌های بنیادی شبه جنینی، تحت تابش امواج فراصوت پیوسته ۱ مگاهرتز، با شدت ۲۰۰ میلی‌وات بر

سانتی‌متر مربع و زمان تابش ۲۰۰ ثانیه استفاده شد. جمعیت‌های سلولی در این مرحله به‌مدت ۲۱ روز کشت داده شدند و در روز هفتم و چهاردهم و بیست و یکم از نظر میزان متغیرهای کلونی‌زایی بررسی شد. در این تحقیق، جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی نوزاد موش، به‌منظور ایجاد سیستم هم‌کشتی آن‌ها با سلول‌های سرتولی، انجام پذیرفت. برای هر بار جداسازی، ۱۵ سر موش نوزاد نر ۳ تا ۵ روزه برای برداشتن بیضه به آزمایشگاه منتقل شدند. بیضه نوزاد موش‌ها در محیط کشت حاوی آنزیم‌های کلاژناز ٤ و سپس در تریپسین برای هضم آنزیمی به‌طور مکانیکی قطعه قطعه شد.

سپس سوسپانسیون سلولی، اسپرماتوگونی و سرتولی در محیط کشت مخصوص [DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagles Medium/F12)، FBS (Fetal bovine serum) ۱۵ درصد، ۱۰۰ واحد LIF (Leukemia Inhibitors Factor)، ۱ درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری، بتا مرکاپتواتانول یک میلی‌مولار و پنی سیلین/ استرپتومایسین ۱ درصد (Penicillin/streptomycin)] کشت داده شدند [۱۸]. امواج فراصوت پیوسته با شدت ۲۰۰ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع در مدت ۵ روز به این سلول‌ها تابیده شد. در پایان به‌منظور تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی شبه جنینی از طریق ایمونوسیتوشیمی از برخی پروتئین‌های Sox2، SSEA-1 استفاده شد.

جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه نوزاد موش، طی دو مرحله هضم آنزیمی و مکانیکی جدا شدند. موش‌های نر و ماده نژاد NMRI (National Medical research institute) از مؤسسه رازی خریداری و در حیوانخانه دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نگهداری شدند. موش‌های نوزاد ۳ تا ۵ روزه برای جداسازی سلول‌ها، استفاده شدند. تمام روش‌های مورد استفاده در این مطالعه طبق موازین کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس طبق شماره نامه ۷۷۱۳/د۵۲ انجام گرفت. تمامی مواد مصرف شده در این مطالعه از شرکت (Sigma، آلمان) تهیه شد.

برای هر بار جداسازی، ۱۵ سر نوزاد موش نر ۳ تا ۵ روزه نژاد NMRI، برای برداشتن بیضه استفاده قرار شد. بعد از کشتن حیوان، بیضه‌ها خارج و بعد از شست و شو در PBS (Phosphate buffered saline) به محیط کشت DMEM/F12 منتقل شدند. کپسول و بافت‌های اضافی مثل اپیدیدیم (Epididymis) برداشته شد و نمونه‌ها در محیط DMEM/F12 حاوی آنزیم (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز) به قطعات کوچک‌تری تقسیم شدند [۱۸-۲۰]. محیط کشت حاوی سلول و قطعات لوله‌های منی‌ساز به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس PBS بالای پلت خارج شد. در این مرحله پلت پیپتاژ شد و سوسپانسیون مورد نظر به‌مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. حاصل اولین مرحله هضم آنزیمی، قطعات لوله‌های منی‌ساز بود که برای هضم بیشتر وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شد. در این مرحله ۱ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین ۰/۱ درصد به پلت سلولی کف لوله فالکون اضافه شد. سپس به‌مدت ٦۰ ثانیه پیپتاژ شد تا اینکه سلول‌ها از یکدیگر جدا شوند. خنثی‌سازی توسط DMEM/F12 و ۱۵ درصد FBS و حاوی ۱۰۰ واحد LIF و ۱ میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانول (beta Mercaptoethanol) انجام گرفت. سوسپانسیون سلولی که اغلب حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی است، به‌صورت هم‌کشتی و بعد از شمارش سلولی با تعداد مساوی در ظروف ۳۵ میلی‌متری حاوی DMEM/F12 و ۱۵ درصد FBS، ۱۰۰ واحد LIF و ۱ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول کشت داده شد. هر ۲ روز یک بار، تعویض محیط کشت انجام می‌پذیرفت.

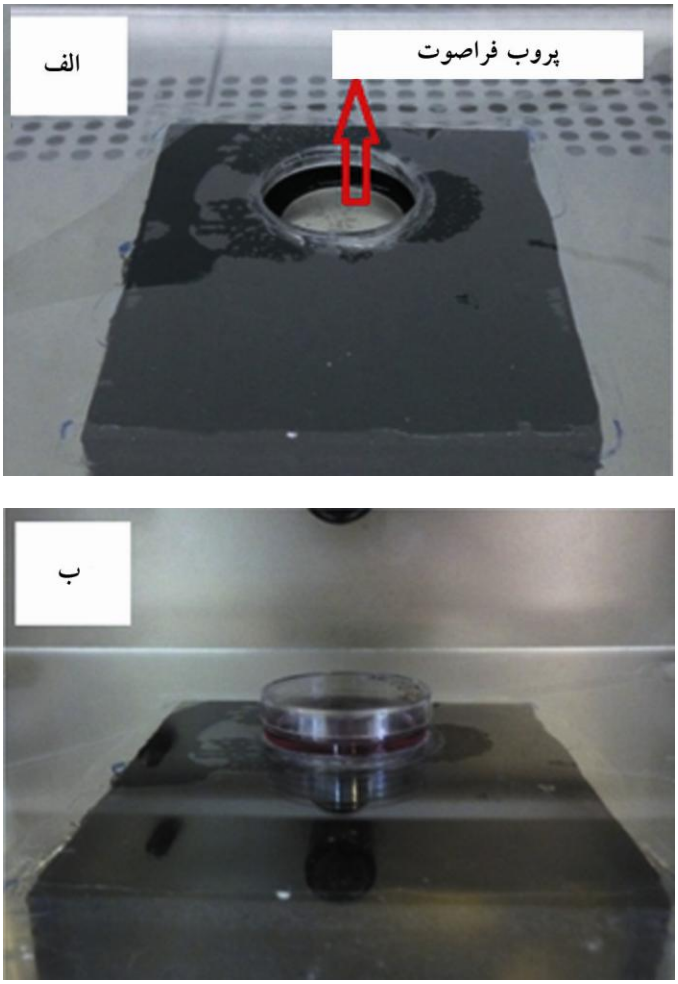
کشت و ارزیابی کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی

بعد از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی، ارزیابی کلونی‌های مشتق از سلول‌های شبه صورت پذیرفت. قبل از هر

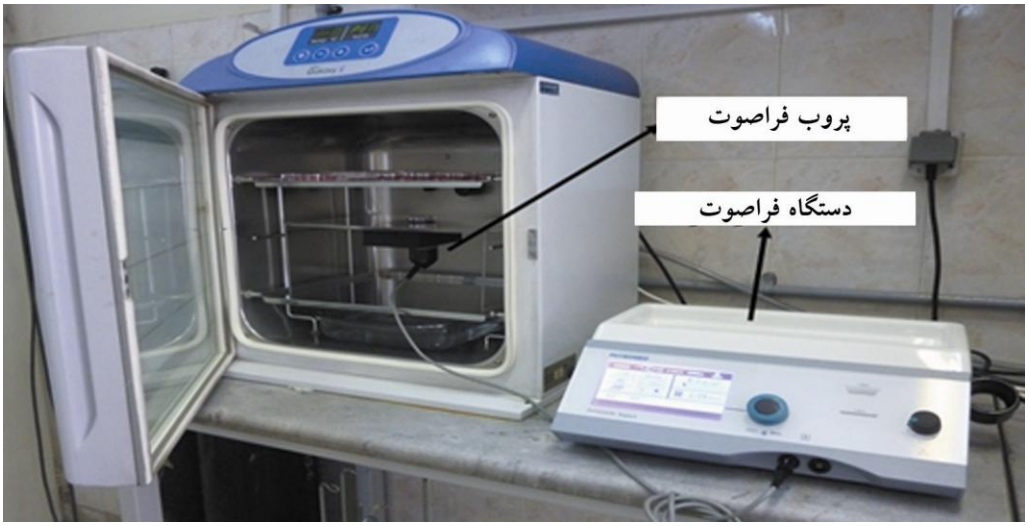
پاساژ سلولی که هر ۷ روز یک بار تکرار می‌شد، تعداد و قطر کلونی‌های آن به کمک میکروسکوپ معکوس (Ziess، آلمان) مجهز به عدسی چشمی مدرج (Ocular grid) به‌دست آمد. نتایج حاصل با تکرار حداقل ۳ بار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

تابش امواج پیوسته فراصوت

روش تابش‌دهی و پارامترهای اولیه بر اساس فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۲۰۰ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع، به‌مدت ۵ روز، انتخاب شدند [۲۰]. امواج فرا صوت پیوسته و به‌وسیله دستگاه فراصوت (Ultrasound machine) (PHYSIOMED، آلمان) از طریق یک مبدل (Transducer) با سطح مقطع ۳۵ میلی‌متر و ژل واسط (Coupling Gel) که بین مبدل و ظرف کشت قرار داشت، در فضای داخل انکوباتور ۳۲ درجه و CO_2 ۵ درصد، به سلول‌ها تابیده شد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱ (الف) روش تابش‌دهی امواج فراصوت روی سلول‌ها از ته ظرف کشت، نمای داخل انکوباتور، (ب) موقعیت مبدل و موقعیت پتری دیش روی مبدل [۲۰]



شکل ۲ روش تابش‌دهی امواج فرا صوت روی سلول‌ها، نمای خارج انکوباتور [۲۰]

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی شبه جنینی

برای تأیید کلونی‌های بنیادی شبه جنینی به‌دست آمده، از پروتئین‌های Sox2، SSEA-1 (Sigma، آمریکا) استفاده شد. ابتدا کلونی‌های کشت داده شده روی لام، دوبار و هر بار به‌مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات شستشو شدند. سپس برای ثبوت به‌مدت ۲۰ دقیقه در پارا فرمآلدیید ٤ درصد قرار گرفت. پس از شستشو در بافر فسفات به‌مدت ۵ دقیقه برای تسهیل نفوذ آنتی‌بادی به داخل سلول، از تریتون X-۱۰۰ (Triton x-100) ۲ درصد به‌مدت ۵ دقیقه استفاده شد. مهارسازی آن در سرم ۱۰ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس به کلونی‌ها، آنتی‌بادی اولیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال SSEA-1 (Rabbit polyclonal bs-1702R-Cy7) و Sox2 (ab97959) به رقت ۱:۵۰ اضافه شد و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از این مرحله و سه بار شستشو با بافر فسفات و هر بار به‌مدت ۵ دقیقه، روی نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با PE (Phycoerythrin) (Donkey to Rabbit IgG ab7007) به رقت ۱:۲۰۰ در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد. پس از ۳ بار شستشو با بافر فسفات هر بار به‌مدت ۵ دقیقه نمونه‌ها با گلیسرول فسفات چسبانده شد. از نمونه‌های رنگ شده به کمک میکروسکوپ فلورسنت تصویربرداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

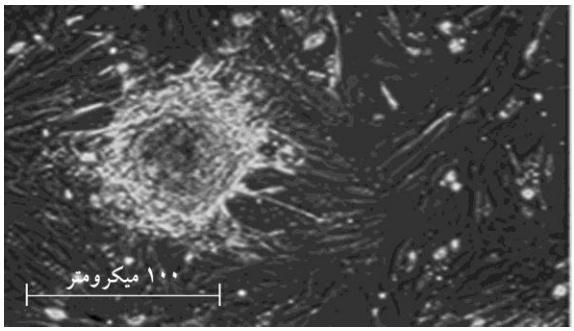
تمام مقادیر بر حسب Mean±SE ارایه شده است. اطلاعات به‌دست آمده از بررسی قطر و تعداد کلونی سلول‌ها توسط Student T-test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one way Analysis of variance: ANOVA) و آزمون توکی (TUKEY) مقایسه شد. سطح معنی‌داری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

القای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به سلول‌های بنیادی شبه جنینی

نتایج مشاهده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که به‌مدت ۲۱ روز برای دستیابی به سلول‌های بنیادی شبه جنینی تحت القا قرار گرفته بودند به این صورت بود که طی این القا،

کلونی‌های ایجاد شده برخلاف کلونی‌های اسپرماتوگونی، حاشیه مشخصی داشتند. اکثراً آن‌ها دارای شکلی کروی یا بیضی، کوچک و به هم فشرده بودند. این حالت تا روز ۲۱ کاملاً مشهود بود (شکل ۳).

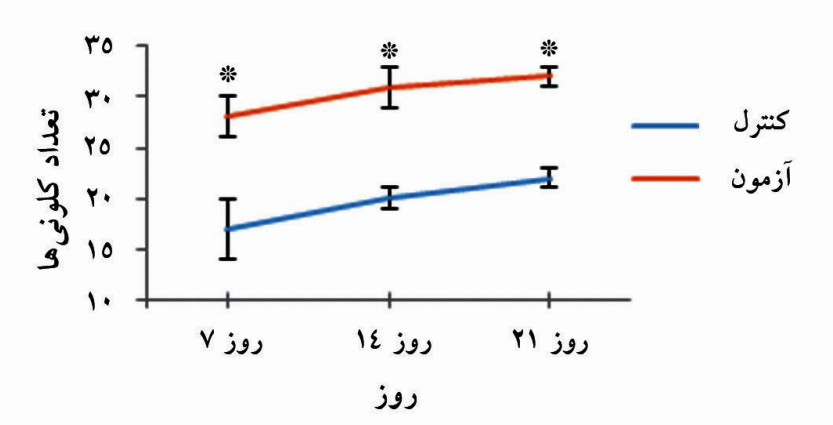


شکل ۳ ریخت شناسی یک کلونی به‌دست آمده از کشت سلول‌های بنیادی شبه جنینی و سرتولی در روز ۲۱

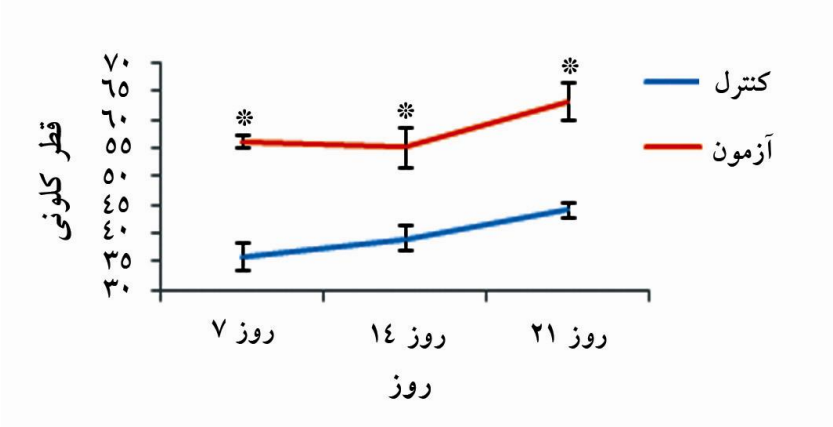
ارزیابی کمی کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی

نتایج حاصل از بررسی روند کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی در محیط کشت نشان داد که این سلول‌ها ابتدا تجمعات سلولی را شکل داده و در ادامه کلونی را ایجاد کرده‌اند. در این میان امواج فراصوت با پارامترهای ذکر شده باعث افزایش تعداد و قطر کلونی‌های سلو ل‌های بنیادی شبه جنینی شد (شکل ٤ و ٥).

نتایج تجزیه و تحلیل آماری بین گروهی، نشان داد که تعداد و قطر کلونی سلول‌های بنیادی شبه جنینی در گروه تابش امواج فرا صوت پیوسته نسبت به گروه کنترل، در ۲۱ روز زمان کشت، افزایش معنی‌داری پیدا کرده است ($P\leq$۰/۰۵). درحالی که بین نتایج درون گروهی در هفته‌های اول تا سوم و در دو گروه تابش امواج و بدون امواج نسبت به هم، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P\geq$۰/۰۵).



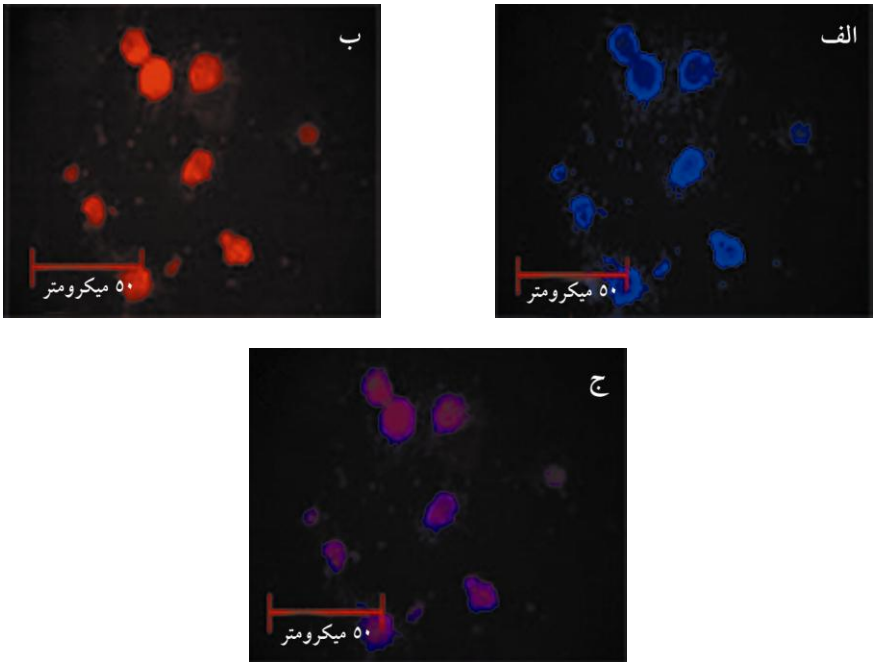
شکل ٤ مقایسه روند تغییرات میانگین تعداد کلونی در دو گروه تابش و بدون تابش امواج، *: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد [±SE (± میانگین استاندارد)، n=۳، $P\leq$۰/۰۵].



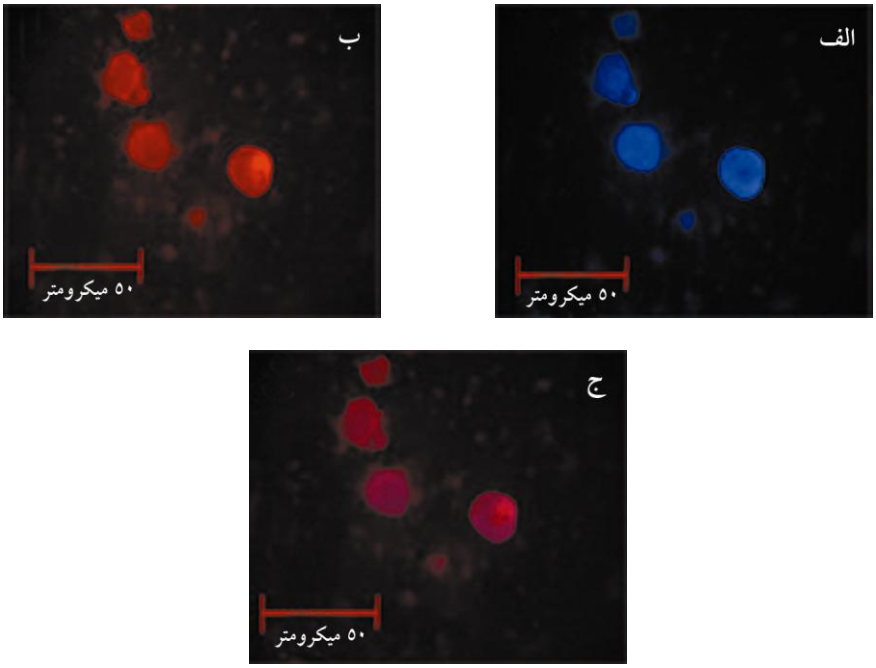
شکل ۵ مقایسه روند تغییرات میانگین قطر کلونی میکرومتر در دو گروه تابش و بدون تابش امواج، ❋: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد (±SE، n=۳، P≤۰/۰۵).

تأیید کلونی‌های سلول‌های بنیادی شبه جنینی

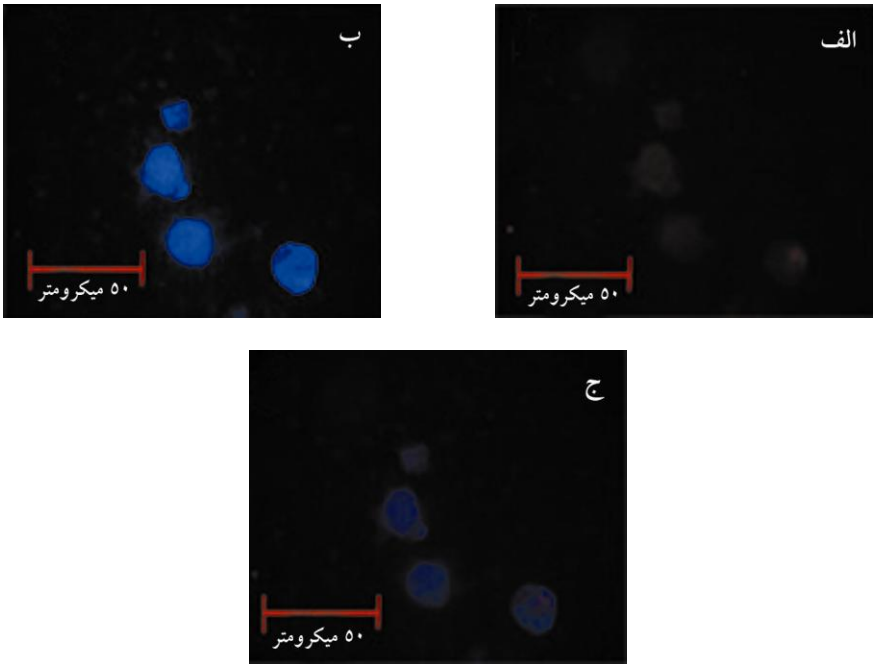
برای حصول اطمینان از ماهیت سلول‌های بنیادی شبه جنینی، از نشانگر اختصاصی Sox2، SSEA-1 استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی، نشان داد که نشانگر مزبور بیان شد؛ در نتیجه ماهیت این سلول‌ها به اثبات رسید (شکل ٦-٨).



شکل ٦ بررسی نشانگر ***Sox2*** در کلونی سلول‌های بنیادی شبه جنینی (ب)، شکل‌های (الف) و (ج) به‌ترتیب تصاویر DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) و ادغام شده (Merge)



شکل ۷ بررسی نشانگر ***SSEA-1*** در کلونی سلول‌های بنیادی شبه جنینی(ب). شکل‌های (الف) و (ج) به‌ترتیب تصاویر DAPI و ادغام شده



شکل ۸ بررسی نشانگر کونژوگه با *PE* در کلونی سلول‌های بنیادی شبه جنینی به‌عنوان گروه کنترل منفی (ب)، شکل‌های (الف) و (ج) به‌ترتیب تصاویر DAPI و ادغام شده

بحث

در این مطالعه از موش ۳ تا ۵ روز استفاده شد. به‌دلیل این که موش (نژاد NMRI) نوزاد ۳–۵ روزه بهترین سن برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A است. اپی تلیوم لوله‌های منی‌ساز در موش ٦ روزه تنها دارای سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A و سرتولی است، به‌طوری که ١٦ درصد از سلول‌های اپی تلیوم را سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A و ٨٤ درصد دیگر آن را سلول‌های سرتولی تشکیل می‌دهند. با افزایش سن، درصد این دو نوع سلول خصوصاً سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A کاهش می‌یابد. بنابراین درجه خلوص سلول‌های بنیادی که یکی از زیر شاخه‌های سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A است در اپی تلیوم منی‌ساز موش نوزاد در بالاترین سطح است [۲۱، ۲۲].

براساس نتایج به‌دست آمده، مشخص شد که امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین قادر خواهد بود تا میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی شبه جنینی را نسبت به گروه کنترل تحت تأثیر قرار دهد. این نتایج برای اولین بار نشان داد که سلول‌های بنیادی شبه جنینی ایجاد شده تحت تأثیر امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین قادر است تا طی ۲۱ روز کشت، میزان کلونی‌زایی و قطر کلونی‌های ایجاد شده را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط بعضی از محققین انجام گرفت مشخص شد که امواج فرا صوت با شدت پایین باعث بهبود تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف انسانی می‌شود. این گروه از محققین نشان دادند که امواج فرا صوت با شدت پایین به‌واسطه حداقل سه مکانیسم قادر است منجر به بهبود تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی شود. این مکانیسم‌ها شامل شل کردن بافت هم‌بند اطراف سلول، آزادسازی عوامل رشد خارج سلولی و افزایش حساسیت سلول‌ها به بعضی عوامل رشد خارج سلولی است [۲۳].

در مطالعه دیگری که در سال ٢٠١٤ توسط عده‌ای از محققین انجام گرفت، مشخص شد که امواج فرا صوت پیوسته و پالسی با شدت پایین می‌تواند بر تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی مؤثر باشد [۲۰، ٢٤]. از آنجایی که در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی شبه جنینی ایجاد شده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ماهیت کلونی‌زایی داشتند و تنها از نظر ریخت شناختی با کلونی اسپرماتوگونی تفاوت داشتند، بنابراین به‌نظر می‌رسد که امواج فرا صوت با شدت پایین، طی ۲۱ روز توانسته با تأثیر بر مولکول‌های اتصالی سلولی منجر به افزایش تمایل بیشتر سلول‌ها به تشکیل کلونی شود و در نتیجه تعداد و قطر کلونی‌ها را نسبت به گروه کنترل بدون تابش افزایش دهد. این نتایج با آنچه که محققین حاضر به آن دست یافتند، از نظر تأثیر امواج بر تعداد کلونی هم‌خوانی دارد. هر چند که در مطالعه انجام شده آن‌ها، تنها اثر امواج روی سلول‌های اسپرماتوگونی بررسی شده و میزان قطر کلونی‌ها بدون تغییر بوده است.

امواج فرا صوت با شدت پایین به‌عنوان یک نمونه از انرژی مکانیکی غیر فیزیولوژیک، به‌طور غیر مستقیم، می‌تواند استرس مکانیکی به سلول‌های کشت داده شده را اعمال نماید، بنابراین به‌عنوان یکی از تحریک‌کننده‌های مکانیکی یا القاگر به حساب می‌آید [۲۵]. با توجه به نتایج به‌دست آمده در هفته‌ها و پاساژهای مختلف سلولی، به‌نظر می‌رسد که پاسخ‌دهی سلول‌ها به تأثیرات امواج در یک محدوده زمانی مشخص رخ می‌دهد. به این ترتیب که سلول به‌صورت دوره‌ای و در یک مقطع زمانی پس از پاسخ‌دهی به امواج دچار تغییرات ساختاری شده و بعد از این تغییر، قادر به ایجاد تغییراتی در رفتار سلولی از جمله کلونی‌زایی می‌شوند. به این ترتیب مشخص شد که کلونی‌زایی سلول‌های شبه جنینی، تحت تأثیر امواج فراصوت پیوسته با شدت پایین، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. به عبارت دیگر؛ تعداد و قطر کلونی‌ها در تمام طول مدت کشت، نسبت به گروه کنترل که امواجی دریافت نکرده بود، افزایش چشم‌گیری داشت. در هفته‌های دوم و سوم، نسبت به هفتهٔ اول، این روند مثبت ادامه نیافت و تعداد کلونی‌ها، با وجود اختلاف با گروه کنترل، ثابت باقی ماند.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که امواج فرا صوت با شدت پایین به‌عنوان یک روش کم هزینه و بدون عوارض جانبی برای بهبود غنی‌سازی سلول‌های بنیـادی شـبه جنینی در محیط آزمایشگاه می‌تواند استفاده شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشـته علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بوده و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] Lanza R GJ, Hogan B, Melton D, Pederson R. Essentials of Stem Cell Biology. 2nd Edition, Elsevier Inc, 2009.

[2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131(5): 861-72.

[3] Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. Theriogenology 2003; 59(1): 73-86.

[4] Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. Asian J Androl 2004; 6(3): 259-68.

[5] Roser JF. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. Anim Reprod Sci 2008; 107(3-4): 179-96.

[6] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. Cell 2004; 119(7): 1001-12.

[7] Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature 2006; 440(7088): 1199-203.

[8] Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Pandolfi PP, Rafii S. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. Nature 2007; 449(7160): 346-50.

[9] Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ikawa M, Nakamura T, Ogura A, Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. Biol Reprod 2008; 78(4): 681-7.

[10] Ko K, Tapia N, Wu G, Kim JB, Bravo MJ, Sasse P, Glaser T, Ruau D, Han DW, Greber B, Hausdörfer K, Sebastiano V, Stehling M, Fleischmann BK, Brüstle O, Zenke M, Schöler HR. Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. Cell Stem Cell 2009; 5(1): 87-96.

[11] Wu H, Ren K, Zhao W, Baojian GE, Peng S. Effect of electromagnetic fields on proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow mesenchymal stem cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2005; 25(2): 185-7.

[12] Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM,

Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. Lasers Surg Med 2008; 40(6): 433-8.

[13] Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BD. Pulsed electro-magnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 2008; 26(9): 1250-5.

[14] Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, Chiu HT, Lu SF, Luo GH, Kuo TK, Lee OK, Chiou TW. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. Bioelectromagnetics 2009; 30(4): 251-60.

[15] ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. Prog Biophys Mol Biol 2007; 93(1-3): 111-29.

[16] Lowry WE, Quan WL. Roadblocks en route to the clinical application of induced pluripotent stem cells. J Cell Sci 2010; 123(Pt 5): 643-51.

[17] Graf U, Casanova EA, Cinelli P. The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. Genes (Basel) 2011; 2(1): 280-97.

[18] Asadi MH, Javanmardi S, Movahedin M. Derivation of ES-like cell from neonatal mouse testis cells in autologous sertoli cells co-culture system. Iran J Reprod Med 2014; 12(1): 37-46.

[19] Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. Alteration in genes expression patterns during in vitro differentiation of mouse spermatogonial cells into neuroepithelial-like cells. Cytotechnology 2013; 65(1): 97-104.

[20] Mohaqiq M, Movahedin M, Mokhtari Dizaji M, Mazaheri Z. Upregulation of Integrin-α6 and Integrin-β1 Gene Expressions in Mouse Spermatogonial Stem Cells after Continues and Pulsed Low Intensity Ultrasound Stimulation. Cell J 2018; 19(4): 634-639.

[21] Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol 1977; 74(1): 68-85.

[22] McLean DJ, Friel PJ, Johnston DS, Griswold MD. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. Biol Reprod 2003; 69(6): 2085-91.

[23] Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Lee DS, Han KS, Kim JS, Kim BJ, Jeon HW, Yoon KS. Introducing pulsed low-intensity ultrasound to culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Biotechnol Lett 2009; 31(3): 329-35.

[24] Mohaqiq M, Movahedin M, Mokhtari Dizaji M, Mazaheri Z. The effect of Low-intensity Pulsed Ultrasound Stimulation on Neonate Mouse Spermatogonial Stem Cells. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology 2013; 16(2): 85-94.

[25] Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. Biomaterials 2006; 27(3): 354-61.