

Investigation of Tumorigenicity ability of Immature Male Mouse Spermatogonial Stem Cells after In Vitro Cultivation and Inoculation in Athymic Animals

Mahnaz Haddadi¹, Zohreh Mazaheri^{2*}, Saeid Amanpour³, Samad Muhammadnejad⁴, Ahad Muhammadnejad⁵, Mansoureh Movahedin^{6**}

- 1- M.Sc., Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 2- Post Doc. Researcher, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associated Professor, Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 5- Post Doc. Researcher, Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 6- Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

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

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: movahed.m@modares.ac.ir

Received: 08/Feb/2014, Accepted: 06/May/2014

Abstract

Objective: It is hypothesized that stem cells have the capability to form tumors after transplantation. Spermatogonial stem cells have proliferation potency and colonization ability related to express pluripotency genes such as c-Myc. The primary aim of this study is to investigate tumorigenicity ability of these cells after in vitro cultivation and inoculation in athymic animals.

Methods: Spermatogonial stem cells from 3-5 day-old neonatal mice testes (NMRI) were cultured following two-step enzymatic digestion. After one month of culturing the spermatogonial stem cells, the obtained colonies were identified by Oct4 and PLZF markers. Expressions of Nanog, Oct4 and c-Myc pluripotency genes were subsequently studied. We subcutaneously inoculated 5×10^6 cells into athymic mice and assessed tumor formation after 8 weeks. Mouse embryonic stem cells (CCE line) were used as the positive control. Generated tumors were measured by a caliper.

Results: The colonies expressed Oct4 and PLZF proteins. Ratio of pluripotency gene expressions in these cells compared to embryonic stem cells significantly decreased ($P \leq 0.05$). Mouse embryonic stem cells formed tumors however the spermatogonial colonies did not form any tumors.

Conclusion: Mouse spermatogonial stem cells in comparison with embryonic stem cells are not capable of forming tumors in vivo. We have observed that the tumorigenic ability of these cells decreased significantly with down regulation of pluripotency gene expressions, particularly c-Myc. However, this study should be reassessed by using human tissue samples.

Keywords: Spermatogonial stem cells, Tumorigenicity, Infertility, Inoculate

سنجش تومورزایی سلول‌های بنیادی زایای موش مذکر نابالغ تکثیر یافته در محیط کشت پس از پیوند به موش بالغ با نقص سیستم ایمنی

مهناز حدادی^۱، زهره مظاهری^{۲*}، سعید امانپور^۳، صمد محمدنژاد^۴، احد محمدنژاد^۵، منصوره موحدین^{۶*}

- ۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران
- ۲- پژوهشگر فرادکتری، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران
- ۵- پژوهشگر فرادکتری، مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران، تهران، ایران
- ۶- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

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

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۱۶

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۱۹

چکیده

هدف: این فرضیه وجود دارد که سلول‌های بنیادی پس از پیوند، قابلیت تومورزایی دارند. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارای قابلیت تکثیری بالا و کلونی‌زایی بوده که مربوط به بیان یک‌سری از ژن‌های پرتوانی نظیر ژن *c-Myc* است؛ بنابراین هدف اصلی این تحقیق بررسی قابلیت تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از کشت در آزمایشگاه و پیوند به حیوانات با نقص سیستم ایمنی بوده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حاصل از بافت بیضه موش ۳-۵ روزه نر نژاد NMRI پس از دو مرحله هضم آنزیمی، کشت داده شدند. پس از کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به مدت یک ماه، کلونی‌های به‌دست آمده با استفاده از نشانگر *Oct4* و *Plzf* تعیین ماهیت شدند. سپس بیان ژن‌های پرتوانی *Oct-4*، *Nanog* و *c-Myc* بررسی شد. تعداد 5×10^6 از سلول‌ها به‌صورت زیر پوستی به موش با نقص سیستم ایمنی پیوند و پس از ۸ هفته محل پیوند سلول‌ها از نظر ایجاد تومور ارزیابی شدند. سلول‌های بنیادی موشی رده CCE به‌عنوان کنترل مثبت، استفاده شدند. تومورهای به‌وجود آمده با کولیس اندازه‌گیری شد.

نتایج: کلونی‌ها پروتئین *Oct-4* و *PLZF* را بیان کردند. میزان بیان ژن‌های پرتوانی در این سلول‌ها به نسبت سلول‌های بنیادی جنینی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. سلول‌های بنیادی جنینی موشی تومور ایجاد نمودند ولی کلونی‌های اسپرماتوگونی قادر به ایجاد تومور نبودند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی در مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی قادر به ایجاد تومور در بدن نیستند. به دلیل بیان پایین ژن‌های پرتوان به‌ویژه ژن *c-Myc* قابلیت تومورزایی این سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. با این حال مطالعه در مورد نمونه انسانی نیز باید بررسی شود.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، تومورزایی، ناباروری، پیوند

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات: ۱۷-۲۷

مقدمه

با افزایش آمار موارد ناباروری، ایجاد راهی برای تولید یک منبع از سلول‌های جنسی برای انجام تحقیقات و درمان ناباروری بسیار با ارزش است [۱]. در یک مورد از موارد ناباروری مردانه که تحت عنوان Sertoli-Cell-only Syndrome (Germinal Cell Aplasia) نامیده می‌شود، تنها سلول‌های سرتولی روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز قرار گرفته‌اند. این افراد آزواسپرم (Azoospermia) بوده و فاقد اسپرم در مایع منی هستند. پیوند سلول‌های زایا در این افراد می‌تواند راه‌گشای مناسبی برای درمان این مشکل باشد [۲]. به‌منظور ایجاد اسپرم در بدن، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی واقع بر غشای پایه لوله‌های منی‌ساز، طی فرآیند اسپرماتوژنز (Spermatogenesis) و اسپرمیوژنز (Spermiogenesis)، تکثیر و تمایز می‌یابند. این سلول‌ها همانند سایر سلول‌های بنیادی خاصیت پرتوانی داشته و قادر به بیان ژن *Oct4* هستند [۳، ۴]. این ژن مسئول نگهداری خاصیت پرتوانی در سلول‌های بنیادی است [۳]. به‌علاوه؛ این ژن تا رده‌های مختلف سلول‌های زایا تا مرحله قبل از میوز بیان می‌شود. حالت پرتوانی سلول‌ها از طریق فعالیت ژن‌های دیگری نظیر *Nanog*، *Klf-4*، *Sox-2*، *c-Myc* نیز صورت می‌گیرد [۴]. از این گروه از ژن‌ها، ژن *Nanog* و *Sox-2* هم در رده‌های مختلف سلول‌های زایا تا مرحله قبل از میوز بیان می‌شود [۳]. با توجه به گزارش‌های محققین، این گروه از ژن‌ها منجر به خودسازی بالای سلول‌های بنیادی شده و هر کدام می‌تواند بر سایر ژن‌ها اثر القایی مثبت داشته باشد. در بین ژن‌های مرتبط با حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی، ژن *c-Myc* نیز دیده می‌شود این ژن در حالت طبیعی در سلول‌های بنیادی بیان تنظیم شده‌ای دارد ولی طی تکثیر بالای سلول‌ها و استفاده از یک‌سری محرک‌های رشد، بیان این ژن تحریک شده و افزایش می‌یابد [۵]. پروتئین *c-Myc* یا ژن مربوط در حالت بیان بالا می‌تواند منجر به انواع مختلفی از سرطان‌ها در انسان شود. آمارهای به‌دست آمده نشان می‌دهد که ۸۰ درصد سرطان پستان، ۷۰ درصد سرطان کولون، ۹۰ درصد سرطان دستگاه

بررسی تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

تناسلی، ۵۰ درصد بدخیمی‌های کبدی و انواع مختلفی از تومورهای خونی به دلیل بیان بالای این ژن رخ می‌دهد [۵]. بیان ژن *c-Myc* در سلول‌های طبیعی تحت تأثیر پیام‌های خارجی نظیر عوامل رشد، تماس‌های ماتریکس خارج سلولی و نیز ساعت داخلی سلولی نظیر چرخه سلولی تنظیم می‌شود [۵]. با پیشرفت روش‌های درمانی نیاز به استفاده از روش‌های نوین در درمان انواع بیماری‌ها لازم به‌نظر می‌رسد. در این راستا تلاش‌هایی نیز در زمینه درمان ناباروری صورت گرفته است [۶-۸].

در این مطالعه بررسی میزان بیان ژن *c-Myc* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تکثیر شده در محیط آزمایشگاه مدنظر بوده است. به‌علاوه احتمال تومورزا بودن این سلول‌ها در موش‌های با نقص سیستم ایمنی ارزیابی شده است. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند بخشی از مسیر درمان بیماران نابارور با استفاده از سلول‌های بنیادی را هموار سازد. با توجه به نقش انکوژنی ارایه شده برای این گروه از ژن‌ها، احتمال ایجاد تومور در سلول‌های زایای بنیادی نیز نظیر سایر سلول‌های بنیادی وجود دارد. از این رو نگرانی از این مسئله تا به امروز به‌عنوان یکی از عوامل مهم بر سر راه استفاده بالینی از این سلول‌ها و برای درمان موارد آزواسپرمی همچنان باقی مانده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

موش‌های نر و ماده نژاد NMRI در حیوانخانه بیمارستان امام خمینی (ره) تحت شرایط مناسب نگهداری شدند. موش‌های نوزاد ۳-۵ روزه برای جداسازی سلول‌ها، استفاده شدند. تمام مراحل کار با حیوانات براساس اصول بین‌المللی رعایت حقوق حیوانات انجام گرفت. برای هر بار جداسازی، ۸ تا ۱۲ سر موش نوزاد نر به‌منظور استخراج بیضه به آزمایشگاه منتقل شدند. بیضه‌ها طی ۱۰ دقیقه استخراج شده و بعد از یک بار شست و شو در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco).

آزمون‌های ایمنوسیتوشیمی به منظور تأیید ماهیت

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

تعیین ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قبل از پیوند سلول‌ها به موش با نقص سیستم ایمنی، به وسیله رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر اختصاصی PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger) و نشانگر پرتوانی Oct4 ارزیابی شدند:

رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی PLZF براساس دستورالعمل کارخانه سازنده (Santa Cruz Biotechnology) و به صورت زیر انجام شد. ابتدا کلونی‌های روی لامل کشت شده، سه بار به مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات شستشو شدند. برای ثبوت به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدید ۴ درصد قرار گرفتند. به دنبال آن شستشو در بافر فسفات به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مرحله مهارسازی در سرم بز ۱۰ درصد (Sigma، آمریکا) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس به کلونی‌ها، آنتی‌بادی اولیه موشی ضد PLZF (Abcam، آلمان) و Oct4 (Abcam، آلمان) با رقت ۱ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بعد از این مرحله و سه بار شستشو با بافر فسفات هر بار به مدت ۵ دقیقه، روی نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه (Goat FITC-conjugated anti Rabbit IgG) (Sigma، آمریکا) با غلظت ۱ درصد در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد. پس از شستشو نمونه‌ها با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. از نمونه‌های رنگ شده به کمک میکروسکوپ فلورسنت عکسبرداری شد.

بررسی بیان ژن‌های پرتوانی سلول‌های بنیادی

اسپرماتوگونی به روش Real-Time PCR

از روش RT-qPCR برای تأیید بیان ژن‌های *Nanog*، *c-Myc* و *Oct 4* به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور

آمریکا)، محیط آن عوض شده و در محیط جدید، کپسول بیضه برش داده شد. سپس بیضه نیز به قطعات کوچک برش داده شد. در اولین مرحله هضم آنزیمی، بیضه‌های خرد شده در محیط کشت حاوی آنزیم‌های کلاژناز/ دیسپاز (Collagenase/Dispase) ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تریپسین ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و DNase ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که همگی از شرکت Sigma (آلمان) تهیه شده بود، قرار گرفتند، سپس به یک لوله فالتون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز، ۳ بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۳۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از هر بار سانتریفوژ محیط بالای رسوب ته لوله با محیط کشت تازه جایگزین شد. این کار باعث حذف بافت بینابینی از قطعات بیضه می‌شود. در ادامه قطعات لوله‌های منی‌ساز که حاصل اولین مرحله از هضم آنزیمی بود وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شد.

در مرحله دوم هضم آنزیمی، برای جدا شدن سلول‌ها از قطعات لوله‌های منی‌ساز، در محیطی مشابه محیط استفاده شده در مرحله اول، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با سرعت ۳۰۰ g به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، قطعات هضم نشده لوله‌های منی‌ساز در ته لوله رسوب کرد و سلول‌های جدا شده از همدیگر و بعضی از تجمعات سلولی در تعلیق بالای رسوب قرار گرفتند. قسمت بالایی تعلیق از فیلترهای نایلونی ۷۰ میکرومتری عبور داده شد تا تجمعات سلولی موجود از سلول‌های منفرد موجود در تعلیق جدا شوند. به تعلیق حاصل، محیط تازه حاوی سرم FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma، آلمان) اضافه شد. تعلیق حاصل اغلب حاوی ۲ نوع سلول (سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی) بود. تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سرتولی به کمک لام نئوبار، شمارش شد. همزمان درصد حیات سلول‌ها به کمک محلول ۰/۰۴ تریپان بلو (Trypan blue) (Merk، آلمان) ارزیابی شد.

بررسی تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

ابتدا با استفاده از محلول کپازول، RNA کل سلول‌های جمع‌آوری شده قبل از پیوند، طبق پروتکل کپازن با استفاده از کپازول استخراج شد و برای اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I (Fermentas، آمریکا) قرار گرفت. سپس کیفیت RNA های استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری (QIAGEN، DPI-1، آلمان) ارزیابی شد. برای تهیه cDNA تک رشته‌ای از آغازگر (Primer) Oligo dt (MWG-Biotech، آلمان) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentas، آمریکا) براساس پروتکل مربوط استفاده شد. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems، آمریکا) و SYBER Green در دستگاه ABI Applied Biosystems، Sequences Detection) Step One

انجام گرفت. توالی آغازگرهای پیشرو و معکوس اختصاصی برای ژن‌های بتا-اکتین (β -actin) به‌عنوان ژن مرجع و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. ۴۰ چرخه برای هر بار Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. نمودار ذوب (Melting) برای بررسی درستی واکنش‌های PCR انجام شد و به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی برای بررسی وجود آلودگی در هر واکنش استفاده گردید.

جدول ۱ آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	توالی آغازگر	کد بانک ژن	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)
β -actin	FOR: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3' REV: 5'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'	NM_001101	۷۹/۲
Oct-4/Pou5F1	FOR: 5'-AGCACGAGTGGAAAGCAAC-3' REV: 5'-AGATGGTGGTCTGGCTGAAC-3'	NM_013633	۷۳
Nanog	FOR: 5'-CTGGGAACGCCTCATCAA-3' REV: 5'-CGCATCTTCTGCTTCCTGG-3'	ABO93574	۷۵/۴
c-Myc/Myc	FOR: 5'-CCCTCAGTGGTCTTTCCTAC-3' REV: 5'-CCACAGACACCACATCAATTTC-3'	NM_010849	۷۸/۹

نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) ارزیابی شد. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های $\Delta\Delta CT$ و $2^{-\Delta\Delta CT}$ میزان بیان ژن هدف نسبت به ژن مرجع سنجیده شد. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey) برای بررسی و معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

ناباروری با علت مردانه، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به موش‌های با نقص سیستم ایمنی پیوند زده شدند. موش‌های مورد بررسی همگی نر بالغ ۶-۸ هفته و از نژاد Balb/C و فاقد سیستم ایمنی بودند. سلول‌های تکثیر یافته پس از گذشت یک ماه از زمان جداسازی، در ۲ گروه تزریق شدند که شامل سلول‌های بنیادی جنینی موشی به‌عنوان گروه کنترل مثبت و سلول‌های بنیادی زایای جداسازی شده بودند. در هر گروه ۵ نمونه جداگانه پیوند زده شد. در این بخش از مطالعه پس از گذشت ۶-۸ هفته از پیوند زیر جلدی ۵ میلیون در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت از سلول‌های بنیادی جنین موشی به سمت چپ ناحیه پهلوی موش با نقص سیستم ایمنی، ناحیه مورد بررسی جراحی شد و از تومور ایجاد شده برای بررسی‌های

ارزیابی تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

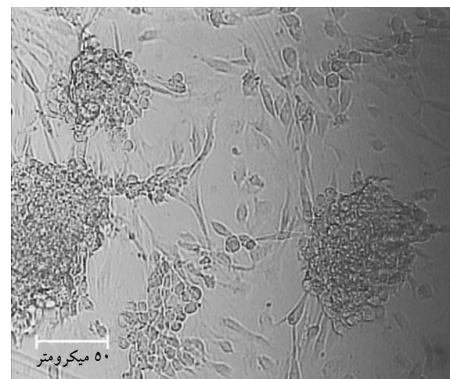
به‌منظور بررسی احتمال تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از پیوند به‌منظور سلول درمانی در درمان

پاتولوژی لام تهیه شد. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیز به همین مقدار و در سمت راست همان موش پیوند شدند.

نتایج

جداسازی سلول‌ها

پس از گذشت یک هفته از جداسازی سلول‌ها، تعلیق سلولی حاصل به دلیل وجود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در آن، ایجاد کلونی نمود. این کلونی‌ها نسبتاً گرد و دارای حدود مشخصی بودند. همچنین حدود سلولی آن‌ها در کلونی قابل تشخیص بود (شکل ۱). ماهیت این سلول‌ها به روش ایمنوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) تأیید شد.



شکل ۱ کلونی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یک هفته پس از جداسازی سلول‌ها؛ سلول‌های تجمع یافته به صورت کلونی درآمده و روی سلول‌های سرتولی پشتیبان خود اتصال دارند.

بررسی نشانگر Oct4 و PLZF برای سلول‌های

بنیادی اسپرماتوگونی

برای حصول اطمینان از ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جداسازی شده، از نشانگرهای Oct4 و PLZF استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد که نشانگرهای Oct4 و PLZF به‌طور بارز و مشخص در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود و در نتیجه ماهیت

این سلول‌ها تثبیت شد (شکل ۲).

بررسی میزان بیان ژن‌های اختصاصی پرتوانی Oct4،

Nanog و c-Myc در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

تغییرات بیان ژن‌های پرتوانی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شد. نتایج به‌دست آمده در این بخش از مطالعه در شکل ۳ نشان داده شده است.

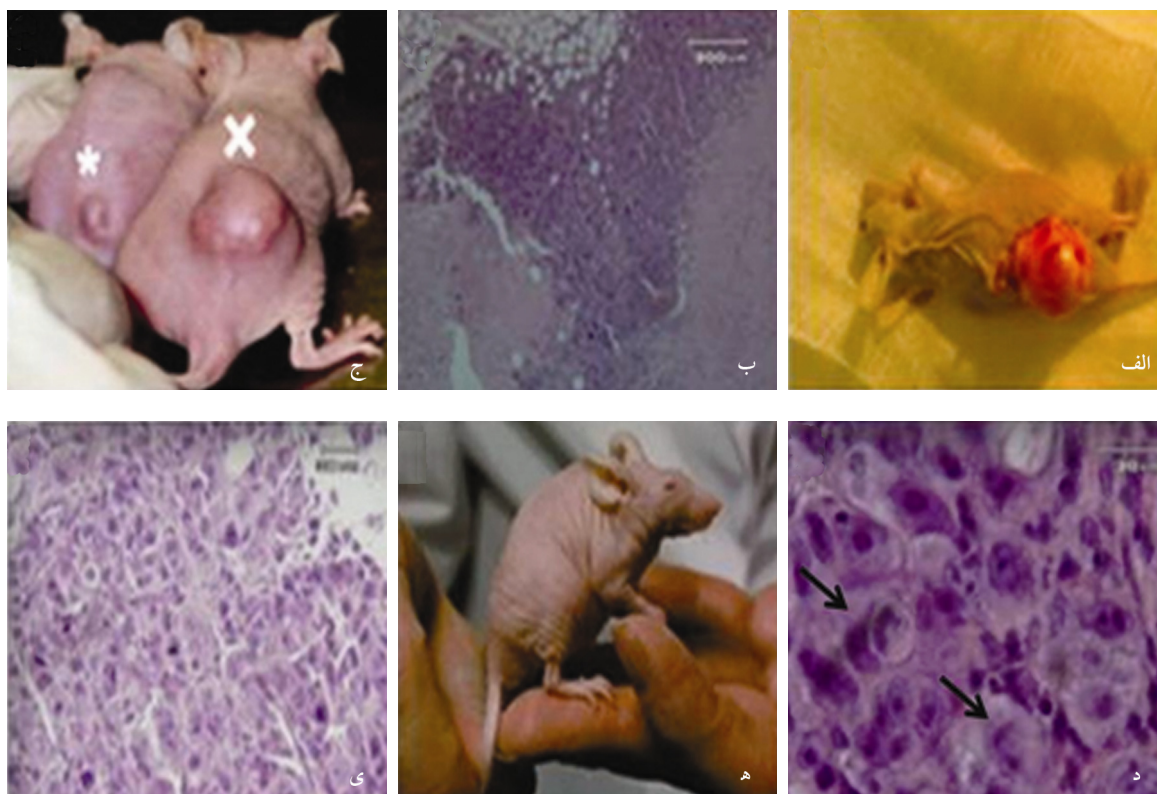
ارزیابی تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

در این بخش از مطالعه پس از گذشت ۶-۸ هفته از پیوند زیر جلدی ۵۰۰۰۰۰۰ در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت از سلول‌های بنیادی جنین موشی به سمت چپ ناحیه پهلوی موش با نقص سیستم ایمنی، تومورهایی به ابعاد ۱×۲×۲ میلی‌متر مشاهده شد. نتایج پاتولوژی نیز وجود تومور را به صورت ظاهری تأیید نمود (شکل ۴).

پس از گذشت ۴۷ روز از دوره نهفتگی تومور، درگروه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، توموری مشاهده نشد. در بررسی‌های بافتی تومور ایجاد شده حاصل از سلول‌های بنیادی جنین موشی مشاهده شد که این سلول‌ها قادر به ایجاد رده‌های مختلف سلولی (تراتوما) نیستند؛ با این وجود سلول‌هایی که به سمت بدخیمی (Bizarre Calls) می‌رفتند طبق نظر پاتولوژیست مشاهده شد. این سلول‌های دارای هسته چندشکلی ناشی از اتصال چند سلول به یکدیگر بودند. سلول‌های مذکور به‌عنوان پیش آگهی بد و به نفع ایجاد تومور در آینده معرفی شدند. در مرکز تومور ایجاد شده حاصل از پیوند سلول‌های بنیادی جنین نکروز بافتی مشاهده و در برخی از سلول‌های محیطی نیز نمای رنگ پریده و کف آلود سلول‌ها نشانگر نکروز سلول‌ها بودند (تصویر ب). بررسی‌های انجام شده به‌منظور حضور شواهدی از متاستاز (Metastasis) نشان داد که هیچ‌یک از اندام‌های داخلی درگیر نبوده و تنها بخشی از ناحیه زیرجلدی محل تزریق تغییر در سلول‌ها را از خود نشان داد و هیچ‌گونه دست‌اندازی به بافت‌های زیرین نداشته است (شکل ۴).

Gene	سلول‌های بنیادی جنینی (ES)	سلول‌های اپیماژوگونی (EF)
<i>Pou5F1</i>	~1.0	~0.25*
<i>Nanog</i>	~1.0	~0.15*
<i>c-Myc</i>	~1.0	~0.15*

۲۳



شکل ۴ بررسی تومورهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی؛ تومور بزرگ تشکیل شده حاصل از پیوند سلول‌های بنیادی جنینی (الف-د) به عنوان کنترل مثبت در تشکیل تومور. موش‌های با نقص سیستم ایمنی در ناحیه یکسان و به صورت زیرجلدی 5×10^6 سلول را در هر دو سمت راست و چپ دریافت کردند. توموری در تلقیح سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از هفته ۸ مشاهده نشد (ه و ی). * و *# هر کدام تومورهای با اندازه‌های مختلف را نشان می‌دهد. این تومورها حاصل پیوند سلول‌های بنیادی جنینی هستند که به تعداد یکسان، در یک زمان مشخص پیوند و نیز بررسی شدند. علامت پیکان سلول‌های بزرگ با هسته چندشکلی را نشان می‌دهد. سلول‌های مشخص شده همان سلول‌های بدخیم هستند. تصاویر با بزرگنمایی $100 \times$ و $400 \times$ گرفته شده است.

بحث

است و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روشی جدید برای درمان ناباروری محسوب می‌شود [۹]. در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با موفقیت از بافت بیضه موش جداسازی شدند. جداسازی این سلول‌ها و نیز پیوند مجدد آن‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ توسط Raph-Brinster گزارش شد [۱۰]. هوبنر (Hubner) و همکاران در سال ۲۰۰۳ اولین مطالعه تولید گامت در محیط آزمایشگاه (In vitro) جهت درمان ناباروری با استفاده از سلول‌های بنیادی را ارائه دادند [۸]. پس از این مطالعه، تویوکا (Toyooka) و همکاران مشتق شدن سلول‌های زایای مذکر را از اجسام شبه جنینی (Embryoid Body: EB) گزارش کردند [۶]. ماسوتاکا توکودا

استفاده از روش‌های نوین درمانی در درمان انواع بیماری‌ها لازم به نظر می‌رسد. در این راستا تلاش‌هایی نیز در زمینه درمان موارد ناباروری صورت گرفته است (۶-۸). تقریباً ۱۵ درصد جمعیت به نوعی با مواردی از ناباروری در تماس هستند. از این میزان ۵۰ درصد موارد را مردان نابارور تشکیل می‌دهند. در این میان عده‌ای از بیماران درگیر با این مشکل دچار اختلالی به نام آرواسپرمی‌اند که فاقد سلول زایا بوده و تنها دارای سلول‌های سرتولی و تعداد محدودی سلول‌های زایای بنیادی یا رده‌های تمایزی اولیه از این سلول‌ها هستند [۲]. در این موارد استفاده از سلول‌های بنیادی روشی است که مد نظر قرار گرفته

چاپ رسید، نشان داده شد که القای ژن *c-Myc* می‌تواند منجر به تومورزا بودن ۲۰ درصد از سلول‌های حاصل شود [۱۶]. به این ترتیب ناکاگاو (Nakagawa) در سال ۲۰۰۸، تصمیم به حذف این ژن در روش آزمایشگاهی خود گرفت که این روند باعث کاهش خطر تومورزایی سلول‌ها شد و تنها به میزان بسیار کمی از توان تکثیری سلول‌ها کاسته شد [۱۷]. بنابراین در این مطالعه تعیین میزان بیان ژن *c-Myc* در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی و در نتیجه مشاهده شد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قادر به بیان ژن مذکور هستند. به دنبال بیان ژن *c-Myc* احتمال تومورزا بودن این سلول‌ها در موش‌های با نقص سیستم ایمنی ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان داد که این میزان از بیان ژن *c-Myc* قادر به ایجاد تومور نبود. ژن مذکور طی چرخه سلولی بیان می‌شود ولی سپس به شرایط قبلی خود برمی‌گردد. بیان غیر طبیعی یا بیش از حد این ژن منجر به فعال شدن مسیرهای پیشگیرانه در سلول یعنی مسیر فعالیت ژن p19/p14ARF و p53 می‌شود که در مرگ سلولی دخالت دارد [۵]. به این ترتیب به نظر می‌رسد که در شرایط آزمایشگاه سلول‌ها به دلیل سرعت رشد زیاد قادر به بیان ژن مورد نظر بوده‌اند، حال آن‌که در محیط بدن تکثیر آن‌ها کمتر شده و در نهایت به سمت مرگ سلولی پیش رفته‌اند و در نتیجه توموری نیز ایجاد نکردند.

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نظیر سلول‌های بنیادی جنینی قادر به بیان ژن *Oct4* نیز بودند که در مطالعه حاضر بررسی شد. این ژن مسئول نگهداری خاصیت پرتوانی در سلول‌های بنیادی است [۳]. به‌علاوه این ژن تا رده‌های مختلف سلول‌های زایا تا مرحله قبل از میوز بیان می‌شود. علاوه بر این تکثیر بالای سلول‌های بنیادی در اثر عوامل پرتوانی دیگری نظیر *Nanog*، *Klf-4*، *Sox-2*، *c-Myc* و غیره است [۴]. از این گروه از ژن‌ها، ژن *Nanog* و *Sox-2* هم در رده‌های مختلف سلول‌های زایا تا مرحله قبل از میوز بیان می‌شود [۳]. با توجه به گزارش‌های محققین این گروه از ژن‌ها منجر به خودسازی بالای سلول‌های بنیادی شده و هر کدام می‌تواند بر

و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که *Plzf* در اسپرماتوگونی نوع A بیان می‌شود. این سلول‌ها پس از تیمار و پیوند به موش مدل آزواسپرمی زنده ماندند و توانایی نوسازی مجدد اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز را پیدا کردند. سلول‌هایی که *Plzf* را بیان می‌کنند، از نظر بیان نشانگرهای *Beta1*، *CDH1*، *integrin*، *Alpha6* نیز مثبت بودند [۱۱]. مشابه با مطالعه فوق در مطالعه حاضر بیان نشانگر *Plzf* نیز بررسی شد و نشان داده شد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قادرند این نشانگر را به میزان بالایی بیان کنند. در سال‌های اخیر برخی از محققین از جمله کروجی و همکاران به بررسی میزان کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی و حیوانی پرداخته‌اند. این گروه از محققین با تلاش بر روی مدل‌های آزواسپرمی حیوانی به نتایج امیدوار کننده‌ای در زمینه درمان آزواسپرمی دست یافتند [۹، ۱۲-۱۴] حال آن‌که در موارد درمان مردان نابارور هنوز از پیوند سلول‌های تکثیر یافته اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی استفاده نکرده‌اند. یکی از عواملی که مانع استفاده از این دسته از سلول‌ها در موارد بالینی شده است، احتمال تومورزا بودن سلول‌های مذکور است. این سلول‌ها با توجه به داشتن توانایی بالا در تکثیر و خودسازی قادر به بیان یک‌سری از ژن‌های دخیل در خاصیت پرتوانی هستند. چنانچه در مطالعه حاضر مشخص شد که این سلول‌ها در زمان پیوند و پس از گذشت یک ماه از کشت در شرایط آزمایشگاه، قادر بودند نشانگر *Oct4* را به‌عنوان یک نشانگر پرتوانی از خود بروز دهند. طبق مطالعه تاکاهاشی (Takahashi) و همکارانش در سال ۲۰۰۷، برای به‌دست آوردن سلول‌هایی با توان تکثیری و تمایزی بالا از سلول‌های سوماتیک، القای یک‌سری از ژن‌ها در سلول‌های سوماتیک ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه آن‌ها عنوان شد که ژن‌هایی نظیر *Oct-4*، *Sox-2*، *Klf-4* و *c-Myc* دارای بیشترین اهمیت در تبدیل سلول‌های سوماتیک به سلول‌های پرتوان القایی هستند [۱۵]. حال آن‌که در مطالعه دیگر که توسط اوکیتا (Okita) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ به

مطالعات بعدی بررسی شود.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی قادر به ایجاد تومور در بدن نیستند حال آن‌که این سلول‌ها دارای خاصیت پرتوانی نظیر سایر سلول‌های بنیادی هستند. این سلول‌های قابلیت استفاده در درمان موش مدل آزواسپرمی را دارند ولی با توجه به اهمیت موضوع مورد بررسی ضروری به نظر می‌رسد که مطالعه در مورد انسان نیز بررسی شود و با توجه به نتایج حاصل از آن برای استفاده بالینی در بیماران مدل آزواسپرمی تصمیم‌گیری شود.

تشکر و قدردانی

محققین این مطالعه بر خود لازم می‌دانند تا مراتب سپاس خود را از همکاران خود در بخش نگهداری حیوانات با نقص سیستم ایمنی خصوصاً آقای دکتر عقابیان اعلام دارند. لازم به ذکر است که هزینه این طرح از بودجه تحقیقاتی مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان امام خمینی (ره) تأمین شده است.

سایر ژن‌ها اثر القایی مثبت داشته باشد. در بین ژن‌های مرتبط با حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی، ژن *c-Myc* نیز دیده می‌شود [۵]. در سال ۱۹۱۱، روس (Rous) مشاهده کرد که سارکوما (Sarcoma) جوجه ممکن است از طریق سلول‌های جدا شده از تومور انتقال یابد [۱۵]، سپس آلیتالو (Alitalo) و همکارانش مطالعه‌ای روی زیر گروه خاصی از رتروویروس‌ها (*Retroviruses*) در پرندگان انجام دادند که منجر به القای لوسمی میلوئید (*Myeloid Leukemia*)، سارکوماها، تومورهای کبد و کلیه و سایر تومورها در جوجه می‌شدند این گروه از محققین ژن *v-Myc* را دلیل این تومورها ذکر کردند [۱۸].

در این مطالعه اگر چه از پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به موش با نقص سیستم ایمنی توموری مشاهده نشد ولی یکی از دلایل آن را می‌توان به تعداد سلول‌های تزریق شده و مدت زمان بررسی تومور ارتباط داد. به علاوه؛ ممکن است با استفاده از یک‌سری روش‌های هورمون درمانی سلول‌ها مجدداً پاسخ مثبت از خود نشان دهند و در نهایت تومورهای احتمالی را ایجاد نمایند که پیشنهاد می‌شود موارد مذکور در

منابع

- [1] Hou J, Yang S, Yang H, Liu Y, Liu Y, Hai Y, Chen Z, Guo Y, Gong Y, Gao WQ, Li Z, He Z. Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells. *Reproduction* 2014; 147(6): R179-R188.
- [2] Jain M, Halder A. Sertoli cell only syndrome: Status of sertoli cell maturation and function. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16(Suppl 2): S512-3.
- [3] Marques-Mari AI, Lacham-Kaplan O, Medrano JV, Pellicer A, Simón C. Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Hum Reprod Update* 2009; 15(3): 379-90.
- [4] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- [5] Gardner LB, Lee LA, Dang CV. *c-Myc* protooncogene. In: Bertino J, editor. *Encyclopedia of cancer*. Vol 1. 2nd ed. San Diego (CA): Academic Press, 2002; P: 555–61.
- [6] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20): 11457-62.
- [7] 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* 2004; 427(6970): 148-54.
- [8] Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Schöler HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300(5623): 1251-6.
- [9] 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.
- [10] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(24): 11298-302.
- [11] Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* 2007; 76(1): 130-41.
- [12] Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* 2005; 279(1): 114-24.
- [13] Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Effects of different doses of bone morphogenetic protein 4 on viability and proliferation rates of mouse embryonic stem cells. *Yakhteh* 2009; 11(1): 29-34.
- [14] Mazaheri Z, Movahedin M, Rahbarizadeh F, Amanpour S. Generation of In-vitro Spermatogonial Stem Cells following Genetic Manipulation of Primordial Germ-like Cells. *Avicenna J Med Biotechnol* 2012; 4(2): 55-63.
- [15] Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911; 13(4): 397-411.
- [16] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- [17] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- [18] Alitalo K, Bishop JM, Smith DH, Chen EY, Colby WW, Levinson AD. Nucleotide sequence to the v-myc oncogene of avian retrovirus MC29. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(1): 100-4.