Original Article

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

Mahnaz Haddadi[1], Zohreh Mazaheri[2*], Saeid Amanpour[3], Samad Muhammadnejad[4], Ahad Muhammadnejad[5], 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 x 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

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 1, Spring 2014, Pages: 17-27

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

مقاله اصیل

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[1]، زهره مظاهری[2*]، سعید امانپور[3]، صمد محمدنژاد[4]، احد محمدنژاد[5]، منصوره موحدین[6]**

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

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۱۶

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 به‌مدت 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 ۵×۱۰^{۶} 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: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات: ۱۷-۲۷

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

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، ٤]. 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 [٤]. 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 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 [٦–۸].

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 حیوانخانهٔ 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،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

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 فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز، ۳ بار و هر بار به‌مدت ۱ دقیقه با سرعت g 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، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با سرعت g ۳۰ به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، قطعات هضم نشدهٔ 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 ۰/۰٤ تریپان بلو (Trypan blue) (Merk، آلمان) ارزیابی شد.

آزمون‌های ایمنوسیتوشیمی به‌منظور تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

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

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی PLZF براساس دستورالعمل کارخانهٔ سازنده (Santa Cruz Biotechnology) و به‌صورت زیر انجام شد. ابتدا کلونی‌های روی لامل کشت شده، سه بار به‌مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات شستشو شدند. برای ثبوت به‌مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدیید ٤ درصد قرار گرفتند. به دنبال آن شستشو در بافر فسفات به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. مرحله مهارسازی در سرم بز ۱۰ درصد (Sigma، آمریکا) به‌مدت 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 به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بعد از این مرحله و سه بار شستشو با بافر فسفات هربار به‌مدت ۵ دقیقه، روی نمونه‌ها به‌مدت 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 فلوئورسنت 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* به‌صورت کمّی استفاده شد. برای این منظور

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌های جمع‌آوری شده قبل از پیوند، طبق پروتکل کیاژن با استفاده از کیازول 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 اسپکترفتومتری (DPI-1، Qiagen، آلمان) ارزیابی شد. برای تهیه cDNA تک رشته‌ای از آغازگر Oligo dt (Primer) (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 Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Focter City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده 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 ارایه شده است. ٤٠ چرخه برای هر بار Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸-٦۰ 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	۷۵/٤
c-Myc/Myc	FOR: 5'-CCCTCAGTGGTCTTTCCCTAC-3' REV: 5'-CCACAGACACCACATCAATTTC-3'	NM_010849	۷۸/۹

نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) ارزیابی شد. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های ΔΔCT 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 $P\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

ارزیابی تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

به‌منظور بررسی احتمال تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از پیوند به‌منظور سلول درمانی در درمان ناباروری با علت مردانه، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به موش‌های با نقص سیستم ایمنی پیوند زده شدند. موش‌های مورد بررسی همگی نر بالغ ٦-۸ 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 ٦-۸ 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

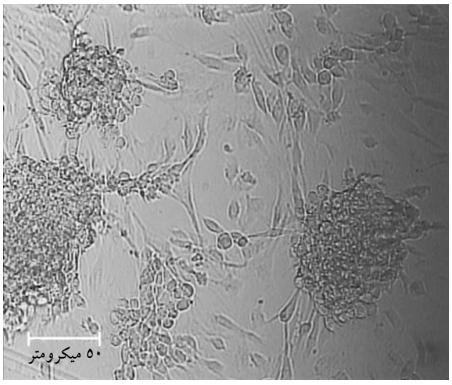
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

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 به‌صورت 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

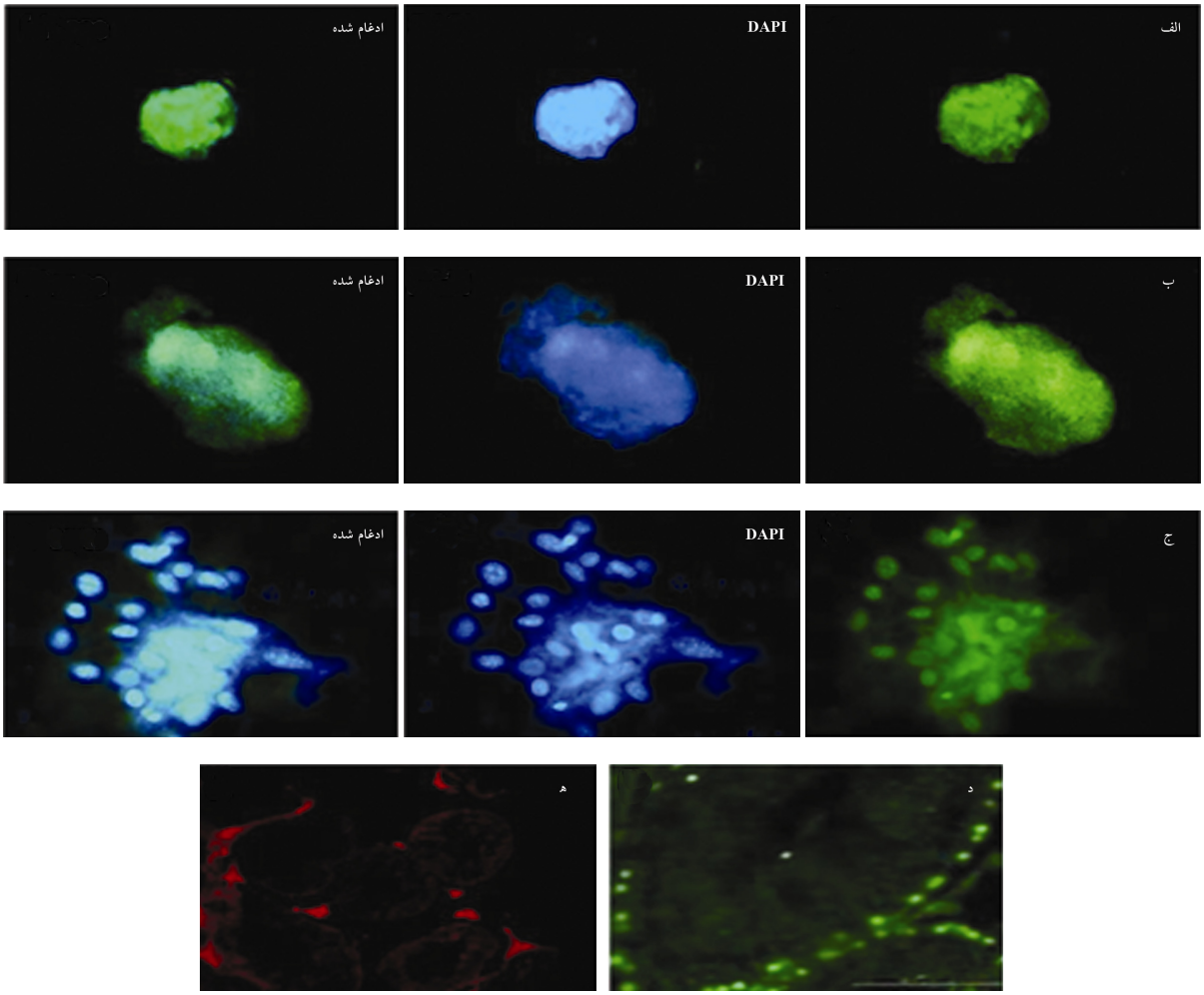
تغییرات بیان ژن‌های پرتوانی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شد. نتایج به‌دست آمده در این بخش از مطالعه در شکل ۳ نشان داده شده است.

ارزیابی تومورزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

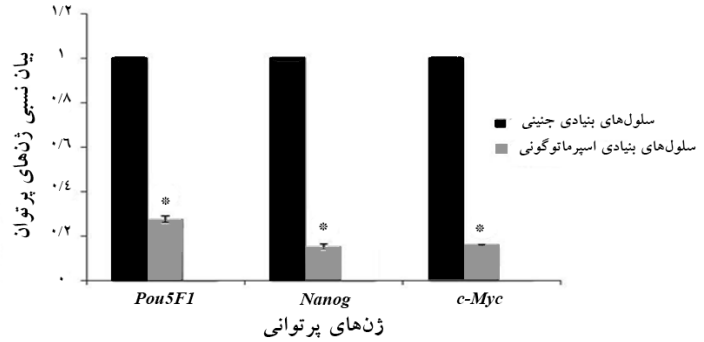
در این بخش از مطالعه پس از گذشت ٦–٨ هفته از پیوند زیر جلدی ۵۰۰۰۰۰۰ در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت از سلول‌های بنیادی جنین موشی به سمت چپ ناحیه پهلوی موش با نقص سیستم ایمنی، تومورهایی به ابعاد ۲×۲×۱ میلی‌متر مشاهده شد. نتایج پاتولوژی نیز وجود تومور را به‌صورت ظاهری تأیید نمود (شکل ٤).

پس از گذشت ٤٧ 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 ٤).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

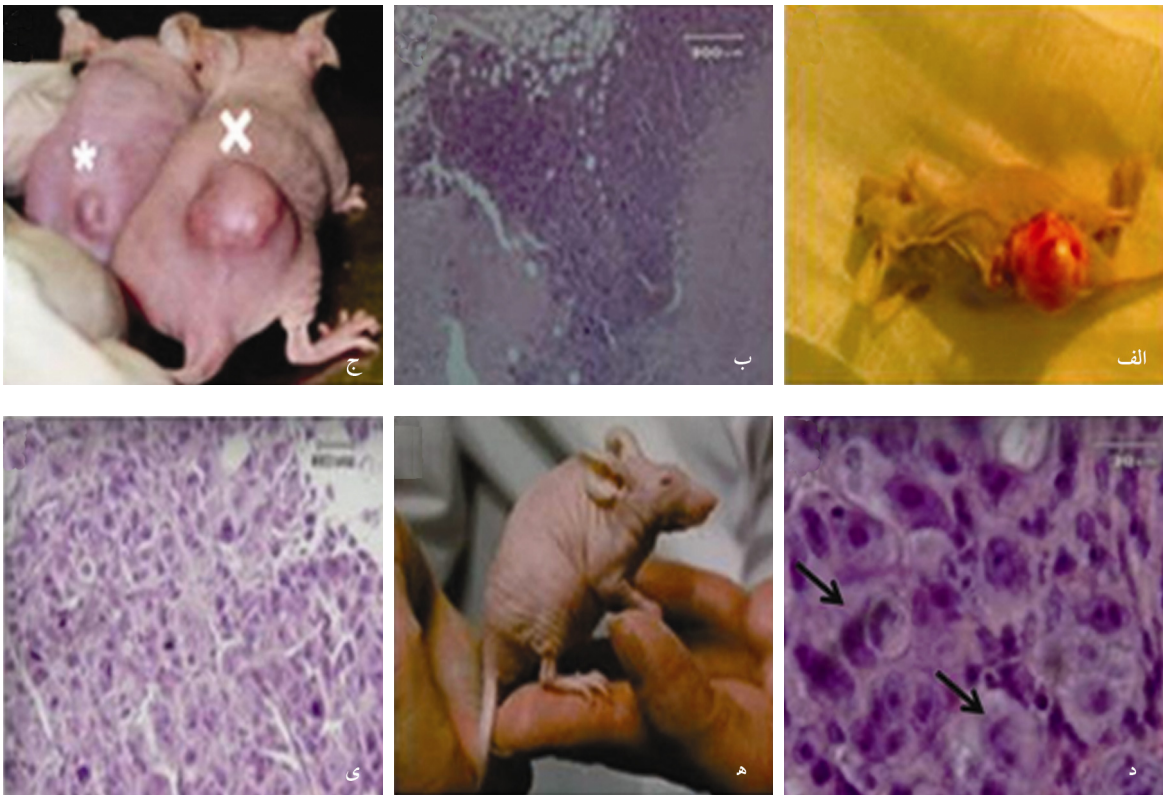


شکل ۲ بررسی نشانگر Oct4 (شکل الف) و PLZF (شکل ب) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از گذشت یک ماه از کشت این سلول‌ها در آزمایشگاه؛ نمونه بافت بیضه به عنوان کنترل مثبت نشانگر PLZF (شکل د) و سلول‌های بنیادی جنینی (شکل ج) به‌عنوان کنترل مثبت برای پروتئین Oct4 و شکل ه به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. هسته سلول‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شده است. تصاویر با درشت‌نمایی‌های ۱۰۰×، ۲۰۰× و ٤۰۰× گرفته شده است.



شکل ۳ بیان نسبی ژن‌های پرتوانی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی؛ سلول‌های بنیادی جنینی موشی به‌عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. نمودار حاصل میانگین به همراه انحراف معیار است. برای هر نمونه سه تکرار انجام شده است. ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شده است. * تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ را در مقایسه با گروه کنترل مثبت در هر کدام از ژن‌های مورد بررسی نشان می‌دهد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]



شکل ٤ بررسی توموزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی؛ تومور بزرگ تشکیل شده حاصل از پیوند سلول های بنیادی جنینی (الف–د) به‌عنوان کنترل مثبت در تشکیل تومور. موش‌های با نقص سیستم ایمنی در ناحیه یکسان و به‌صورت 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 اندازه های 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 ۱۰۰×، ۲۰۰× و ٤۰۰× گرفته شده است.

بحث

استفاده از روش‌های نوین درمانی در درمان انواع بیماری‌ها لازم به‌نظر می‌رسد. در این راستا تلاش‌هایی نیز در زمینه درمان موارد ناباروری صورت گرفته است (٦–۸). 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 آزواسپرمی‌اند 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 است و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روشی جدید برای درمان ناباروری محسوب می‌شود [۹]. در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی اسرماتوگونی با موفقیت از بافت بیضه موش جداسازی شدند. جداسازی این سلول‌ها و نیز پیوند مجدد آن‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ 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 ارایه 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 [٦]. ماسوتاکا توکودا

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

و همکـــاران در ســـال ۲۰۰۷ نشـــان دادنـــد کـــه 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 کـه Plzf را بیـان مـی‌کننـد، از نظـر بیـان نشـانگرهـای Beta1 integrin، Alpha6 integrin و CDH1 نیـز مثبـت بودنـد [۱۱]. مشابه با مطالعه فـوق در مطالعـه حاضـر بیـان نشـانگر Plzf نیز بررسی شد و نشان داده شد که سـلول‌هـای بنیـادی اسپرماتوگونی قادرند این نشانگر را به میزان بالایی بیان کنند.

در سال‌های اخیر برخـی از محققـین از جملـه کروجـی و همکاران بـه بررسـی میـزان کلـونی‌زایـی سـلول‌هـای بنیـادی اسپرماتوگونیای انسـانی و حیـوانی پرداختـه‌انـد. ایـن گـروه از محققین با تلاش بر روی مدل‌های آزواسپرمی حیوانی به نتـایج امیـدوار کننـده‌ای در زمینـه درمـان آزواسـپرمی دسـت یافتنـد [۹، ۱۲–۱۴] حال آن‌که در موارد درمان مردان نابـارور هنـوز از پیونـد سـلول‌هـای تکثیـر یافتـه اسـپرماتوگونی در محـیط آزمایشگاهی استفاده نکرده‌اند. یکی از عواملی که مانع اسـتفاده از این دسته از سلول‌ها در مـوارد بـالینی شـده اسـت، احتمـال تومورزا بودن سلول‌های مذکور است. این سلول‌ها با توجـه بـه داشتن توانایی بالا در تکثیر و خودسازی قادر به بیان یک‌سـری از ژن‌های دخیل در خاصیت پرتوانی هستند. چنانچه در مطالعه حاضر مشخص شد که این سلول‌ها در زمـان پیونـد و پـس از گذشت یک ماه از کشـت در شـرایط آزمایشـگاه، قـادر بودنـد نشانگر Oct4 را به‌عنوان یـک نشـانگر پرتـوانی از خـود بـروز دهند. طبق مطالعـه تاکاهاشـی (Takahashi) و همکـارانش در سال ۲۰۰۷، برای به‌دست آوردن سلول‌هایی با تـوان تکثیـری و تمایزی بالا از سلول‌های سوماتیک، القای یک‌سری از ژن‌هـا در سلول‌های سوماتیک ضروری به‌نظر می‌رسـد. در مطالعـه آن‌هـا عنوان شد که ژن‌هایی نظیـر *Oct-4*، *Sox-2*، *Klf-4* و *c-Myc* دارای بیشـترین اهمیـت در تبـدیل سـلول‌هـای سـوماتیک بـه سلول‌های پرتوان القایی هسـتند [۱۵]. حـال آن‌کـه در مطالعـه دیگر که توسط اوکیتا (Okita) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بـه چاپ رسید، نشان داده شد که القای ژن *c-Myc* می‌تواند منجـر به تومورزا بودن ۲۰ درصد از سلول‌های حاصل شود [۱۶]. بـه این ترتیب ناکاگاوا (Nakagawa) در سـال ۲۰۰۸، تصـمیم بـه حذف این ژن در روش آزمایشگاهی خود گرفت که این رونـد باعث کاهش خطر تومورزایی سلول‌هـا شـد و تنهـا بـه میـزان بسیار کمی از توان تکثیری سلول‌ها کاسـته شـد [۱۷]. بنـابراین در این مطالعـه تعیـین میـزان بیـان ژن *c-Myc* در سـلول‌هـای بنیـادی اسـپرماتوگونی بررسـی و در نتیجـه مشـاهده شـد کـه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قادر به بیان ژن مذکور هسـتند. به دنبال بیان ژن *c-Myc* احتمال تومورزا بودن این سلول‌هـا در موش‌های با نقص سیستم ایمنـی ارزیـابی شـد. نتـایج حاصـل نشان داد که این میزان از بیان ژن *c-Myc* قادر به ایجاد تومـور نبود. ژن مذکور طی چرخه سلولی بیان می‌شود ولی سـپس بـه شرایط قبلی خود برمی‌گردد. بیان غیر طبیعی یا بیش از حد این ژن منجر به فعال شـدن مسـیرهای پیشـگیرانه در سـلول یعنـی مسیر فعالیت ژن p19/p14ARF و p53 می‌شود کـه در مـرگ سلولی دخالت دارد [۵]. به این ترتیب به‌نظر مـی‌رسـد کـه در شرایط آزمایشگاه سلول‌ها به دلیل سرعت رشـد زیـاد قـادر بـه 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 نظیـر سـلول‌هـای بنیـادی جنینی قادر به بیان ژن *Oct4* نیز بودنـد کـه در مطالعـه حاضـر بررسی شد. ایـن ژن مسـئول نگهـداری خاصـیت پرتـوانی در سلول‌های بنیادی است [۳]. به‌علاوه این ژن تا رده‌های مختلف سلول‌های زایا تا مرحله قبل از میوز بیان می‌شود. علاوه بر ایـن تکثیر بالای سلول‌های بنیادی در اثـر عوامـل پرتـوانی دیگـری نظیر Nanog، Klf-4، Sox-2، c-Myc و غیـره اسـت [۴]. از ایـن گـروه از ژن‌هـا، ژن *Nanog* و *Sox-2* هـم در رده‌هـای مختلف سلول‌های زایا تا مرحله قبل از میوز بیان می‌شـود [۳]. با توجه به گزارش‌های محققین ایـن گـروه از ژن‌هـا منجـر بـه خودسازی بالای سلول‌های بنیادی شده و هر کدام می‌تواند بـر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

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 سارکومای (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 مطالعات بعدی بررسی شود.

با توجه به نتایج به‌دست 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 به‌نظر 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.

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]

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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-11-04]