DOI: 10.1234/knh.v1i0.10

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

بررسی اثر عصاره بیضه در مقایسه با عوامل رشد اختصاصی بر روی حفظ خود نوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سهراب بوذرپور[۱]، مجید مومنی‌مقدم[۲]، مریم مقدم‌متین[۱]، حسین کاظمی‌مهرجردی[۳]، سجاد سی‌سخت‌نژاد[۱]، آسیه حیرانی‌طبسی[۴]، احمدرضا بهرامی*[۱]

۱- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی.
۲- دانشگاه حکیم سبزواری- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی.
۳- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم درمانگاهی.
۴- جهاد دانشگاهی مشهد- گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۶، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۸/۲۵

چکیده

مقدمه: *سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌عنوان سلول بنیادی اختصاصی بافت بیضه وظیفه تولید مداوم اسپرم را در جنس نر بر عهده دارند. حفظ خودنوزایی این سلول‌ها جهت تضمین اسپرم‌زایی مداوم ضروری بوده و کنام بیضه با فراهم‌آوردن شرایط مناسب این مهم را برعهده دارد. تاکنون در شرایط آزمایشگاهی مواد و عوامل رشد اختصاصی جهت جایگزینی این کنام معرفی شده‌اند که اغلب این مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پستانداران صورت گرفته است. لذا در این مطالعه اثر عصاره بیضه موش و خروس بالغ در مقایسه با عوامل رشد بر روی ویژگی کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس مورد بررسی قرار گرفت.*

مواد و روش‌ها *در این مطالعه اثر عصاره بیضه موش و خروس بالغ در مقایسه با سه عامل رشد GDNF، bFGF و LIF بر روی ویژگی کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس در طی چهار روز تیمار تحت بررسی قرار گرفت. پس از مشخص شدن غلظت بهینه عوامل مورد آزمایش، سلول‌ها به‌مدت دوهفته تحت تیمار قرار گرفتند و سپس بررسی بیان ژن OCT4 به‌عنوان یک ژن حائز اهمیت در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با روش Real-time RT-PCR انجام پذیرفت.*

نتایج: *نتایج بررسی کلنی‌زایی نشان داد که پس از گذشت چهار روز از تیمار با عصاره بیضه موش و خروس بالغ در مقایسه با گروه کنترل و همچنین عوامل رشد GDNF، bFGF و LIF در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در تعداد کلنی‌های تشکیل شده نشان دادند. نتایج بررسی بیان ژنی نیز نشان داد که پس از گذشت دو هفته از تیمار، بیان ژن OCT4 به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعه نشان داد عصاره بیضه می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب اما قابل ارتقا برای عوامل رشد گران قیمت مطرح گردد.*

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی اسپرماتوگونی، خود نوزایی، عوامل رشد، عصاره بیضه.

***نویسنده مسئول:** مشهد- ابتدای بلوار وکیل آباد- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی، **تلفن:** ۰۵۱۱-۸۷۶۲۲۲۷، **نمابر:** ۰۵۱۱-۸۷۶۲۲۲۷، **Email:** Ar-Bahrami@um.ac.ir

ارجاع: سهراب بوذرپور، مجید مومنی‌مقدم، مریم مقدم‌متین، حسین کاظمی‌مهرجردی، سجاد سی‌سخت‌نژاد، آسیه حیرانی‌طبسی، احمدرضا بهرامی. بررسی اثر عصاره بیضه در مقایسه با عوامل رشد اختصاصی بر روی حفظ خود نوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۳؛۹(۳):۶۲-۶۹.

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های بنیادی خاصی هستند که در کنام بیضه برروی غشا پایه حضور داشته و تولید مداوم اسپرم در طول زندگی جانور نر برعهده این سلول‌ها می‌باشد (۱). این سلول‌های بنیادی می‌توانند با تولید اسپرم اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل سازند (۲).

با اینکه مطالعات بر روی تولید اسپرم تاریخچه طولانی را به همراه دارد (۳)، مطالعه و بررسی جدی بر روی خود نوزایی سلول‌های اسپرماتوگونی از سال ۱۹۵۳ آغاز گردید (۴). مطالعات بر روی این سلول به‌عنوان یک سلول بنیادی ابتدا بر روی همستر طلایی آغاز گردید (۵) و بعدها در رت و موش ادامه یافت (۶ و ۷). در حال حاضر مطالعات فراوانی در مورد این سلول‌ها بر روی سایر پستانداران و انسان صورت گرفته است (۸ و ۹).

این سلول‌ها در مطالعات مربوطبه اسپرم‌زایی و همچنین نازایی جنس نر نقش اساسی را بر عهده دارند (۱۰ و ۱۱)، علاوه بر آن به‌عنوان یکی از انواع سلول‌های بنیادی می‌توانند در مطالعات تکوینی بسیاری به‌کار روند (۱۲ و ۱۳). باتوجه به اینکه این سلول‌ها تنها سلولی هستند که قابلیت انتقال اطلاعات ژنتیکی را دارا می‌باشند در مطالعات تولید جانوران تراریخت و تولید جانوران مدل می‌توانند به‌عنوان یک سلول مناسب جهت ایجاد تغییرات ژنتیکی و انتقال مناسب به نسل جدید مطرح باشند (۱۴).

باتوجه به توانایی‌های ذکر شده، اولین و مهمترین قدم در راه چنین مطالعات ارزشمندی را می‌توان کشت صحیح این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی دانست. در این راستا تا کنون مطالعات مناسبی بر روی پستانداران صورت پذیرفته است (۱۵). همچنین در سال‌های اخیر با کشت موفق این سلول‌ها امکان مطالعات تمایزی آنها به‌عنوان یک سلول بنیادی فراهم گردید (۱۶). علاوه براین امکان نگهداری طولانی مدت آنها به‌صورت منجمد شده توسط محققان تأیید گردید (۱۷ و ۱۸). اما شاید مهمترین و کلیدی‌ترین نتیجه‌ای که از کشت موفق این سلول‌ها در آزمایشگاه حاصل شد امکان پیوند موفق این سلول‌ها درون گونه‌ای (۱۹) و حتی بین گونه‌ای بوده است (۲۰).

بر خلاف پستانداران که مطالعه برروی آنها قدمتی چند دهه دارد، تنها در سال‌های اخیر مطالعات معدودی برروی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پرندگان صورت گرفته است (۲۱ و ۲۲)، براساس این مطالعات و توانایی کشت آزمایشگاهی اینا، مطالعاتی مبتنی بر توانایی تولید پرندگان تراریخت با استفاده از این سلول‌های بنیادی و انتقال ژن به آنها توسط ناقل‌های لنتی ویروسی انجام پذیرفته است (۲۳ و ۲۴).

با وجود همین تعداد اندک مطالعات برروی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پرندگان، همچنان مهمترین گام که در واقع بررسی شرایط زیستی بهینه آن در محیط آزمایشگاهی است به درستی انجام نپذیرفته بلکه به‌طور کامل از روی الگوی پستانداران استفاده شده است (۲۵). با این وجود مطالعات مقدماتی بر روی سلول‌های زایای پرایموردیال پرندگان بهتر انجام شده است (۲۶– ۲۸).

روش بررسی تشکیل کلنی که در سال ۲۰۰۷ معرفی گردید را می‌توان روش مناسبی دانست که در مدت زمان کوتاه می‌تواند اثرات مواد و شرایط مختلف را بر روی کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌وسیله آن سنجش نمود (۲۹). در این مطالعه با استفاده از این روش اثر عصاره بیضه و موش در مقایسه با عوامل رشد تجاری بررسی شده است همچنین از تکنیک Rral-time RT-PCR جهت تأیید روش تشکیل کلنی و با استفاده از ژن OCT4 به‌عنوان یک ژن اختصاصی سلول بنیادی استفاده گردید. هدف این تحقیق معرفی جایگزین مناسب برای عوامل رشد تجاری گرانقیمت به‌منظور کشت و نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خروس باتوجه به حفظ خودنوزایی آنها در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منبع بافت حیوانی مورد استفاده در این پژوهش جوجه (Gallus gallus) یکروزه نر از نژاد تجاری تخم‌گذار (Hy-Line variety w-36) می‌باشد که از شرکت مرغک مشهد تهیه شدند. جوجه‌ها توسط کلروفرم بیهوش شدند و سپس با تشریح، بیضه‌ها از حیوان جدا شد. سپس بیضه‌ها توسط الکل ۷۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه ضد عفونی و سپس به بافر انتقال (محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک، ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنیسیلین و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین) منتقل شدند.

جهت کشت اولیه سلول‌های بافت بیضه، بیضه‌ها توسط اسکالپل مورد هضم مکانیکی قرار گرفته به قطعات بسیار ریز تقسیم شدند و در پلیت کشت سلول شش خانه حاوی محیط کشت DMEM (Gibco) مغذی شده توسط ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS)، بتا مرکاپتواتانول ۰.۱mmol، ال گلوتامین ۲mmol، ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنیسیلین و ۱۰ mg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت جدید اضافه گردید.

جهت انجام آزمایش آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز ابتدا سلول‌ها در یک پلیت شش خانه کشت داده شدند و در روز چهارم پس از مشاهده کلنی‌های تشکیل شده ابتدا محیط کشت به آرامی از پلیت خارج شد. سپس به آن پارافرمالدئید ۴ درصد اضافه شد و مدت ده دقیقه سلول‌ها فیکس شدند. پس از این مدت پارافرمالدئید خارج شد و سلول‌ها سه بار با PBS شستشو شدند و برروی سلول‌ها محلول سوبسترای BCIP-T/NBT به همراه بافر ویژه فسفاتاز قلیایی (pH 9.5) اضافه شد (Thermo scientific). پس از گذشت مدت زمان ۱۰ دقیقه با مشاهده میکروسکپی تغییر رنگ بررسی گردید. در این آزمایش سلول‌های

فیبروبلاستی به‌عنوان کنترل منفی و سلول‌های P19 موشی به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

برای تهیه عصاره بیضه (Testis extract preparation)، بیضه خروس و موش نر توسط تشریح از بدن آنها استخراج شد و بلافاصله توزین شدند. پس از شستشو توسط توسط الکل ۷۰ درصد و محلول PBS، بافت‌ها به لوله فالکن منتقل و لوله‌ها درون ظرف حاوی آب و یخ قرار گرفته و توسط هموژنایزر خرد شدند. سپس این بافت‌های هموژن به نسبت حجمی وزنی ۳ به یک محلول PBS سرد اضافه گردید و به شدت هم زده شد و به مدت نیم ساعت در دور g ۲۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتیگراد رسوب داده شد. محلول رویی توسط فیلتر ۰.۲ میکرون استریل گردید و پس از تقسیم‌بندی در ویال‌های ۱.۵ میلی‌لیتری در فریزر ۸۰- راد منجمد و ذخیره شدند.

برای طراحی آزمایش تشکیل کلنی تیمارهای مختلف از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد برای این منظور سلول‌ها و بافت باقی‌مانده از پلیت T25 توسط تریپسین کنده شد و از فیلتر مش ۷۰ میکرونی (BD) رد شد تا بافت اضافی از کشت حذف گردد. سپس این سلول‌ها شمارش شدند و هر ۱۰۰۰۰ سلول به یک چاهک از پلیت کشت سلول ۹۶ خانه منتقل شدند، در خانه‌های خالی باقی مانده آب مقطر استریل اضافه شد تا تبخیر محیط کشت سلول‌ها و در نتیجه تغییر غلظت مواد کاهش یابد. پس از گذشت ۱۲ ساعت و نشستن کامل سلول‌ها به کف پلیت هر شش خانه جهت انجام یک تیمار در نظر گرفته شد. در این مطالعه به‌ترتیب ۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها در یک میلی‌لیتر محیط کشت استفاده گردید. همچنین عوامل رشد GDNF، bFGF و LIF به‌ترتیب با غلظت ۱۵ ng/ml، ۲۰ ng/ml و ۱۵ ng/ml استفاده شدند. برای هر تیمار شش تکرار در نظر گرفته شد.

برای استخراج RNA ابتدا از هر تیمار موردنظر یک فلاسک کشت سلولی تهیه شد، سپس این سلول‌ها توسط تریپسین کنده شده و در دور ۱۵۰۰ rpm رسوب داده شدند سپس به این رسوب ۱ میلی‌لیتر محلول Trizol (Invitrogen) اضافه شد و نیم دقیقه Vortex توسط اسپینر انجام شد سپس به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه گردید و مجدداً ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در مرحله بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴^{oC} با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. به فاز رویی به میزان هم حجم ایزوپروپانل اضافه شد و ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه گردید، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴^{oC} با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۰٪ به رسوب اضافه شد و پس از چند بار سروته کردن تیوب به‌مدت ۵ دقیقه، در دمای ۴^{oC} با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد و پس از حذف محلول رویی و نیمه خشک شدن (Semi-Dry) رسوب را در ۲۰ میکرولیتر محلول DEPC,H2O حل شد.

RNA حاصل از مرحله قبل توسط دستگاه نانودراپ ارزیابی و تعیین غلظت گردید و توسط آنزیم DNase I (GENET Bio) آلودگی احتمالی DNA ژنومی حذف گردید و در نهایت توسط آنزیم نسخه بردار معکوس SuprimeScript (GENET Bio) cDNA ساخته شد. جهت بررسی cDNA ساخته شده از آغازگرهای ژن‌های GAPDH به‌عنوان ژن خانگی و STRA8 به‌عنوان ژن خاصی که در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و رده سلولی پس از آن بیان می‌شود استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در آزمایش بررسی بیان ژن‌ها به‌ترتیب CCTTCATCGATCTGAACTACATGG (Forward) و GAGCTGAGATGATA ACA CGCTTA (Reverse) با شماره شناسایی (Ref.NM204305) برای ژن GAPDH و همچنین GATGTGAGGGACAGTGGAGGTAA (Forward)، CAGAAATGCCGCTTGTAAATGA (Reverse) با شماره شناسایی (Ref. XM416179) برای ژن STRA8 بودند. آزمایش به‌صورت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل به‌صورت ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه و ۲۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت.

برای انجام آزمایش Real-time RT-PCR ، cDNA ساخته شده در مرحله قبل به نسبت یک به پنج رقیق شد و در آزمایش استفاده گردید. در آزمایش از رنگ SYBR Green استفاده گردید (GENET BIO)، از ژن β-actin به‌عنوان ژن رفرانس استفاده شد و ژن OCT4 هم به‌عنوان ژن اصلی مورد بررسی سنجش بیان قرار گرفت. توالی پرایمرهای استفاده شده در آزمایش بررسی بیان ژن‌ها به‌ترتیب GCTCTGACTGACCGCGTTACTC (Forward) و CGACCCACGATAGATGGGAACAC (Reverse) با شماره شناسایی (Ref. NM_205518) برای ژن β-actin و همچنین AATGAGGCAGAGAACACGGACAAC (Forward)، GGGACTGGGCTTCACACATTTGC (Reverse) با شماره شناسایی (Ref. NM_001110178.1) برای ژن OCT4 بودند. آزمایش در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر در دستگاه Illumina انجام شد. شرایط آزمایش به‌صورت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جهت شروع داغ واکنش و سپس ۴۰ سیکل به‌صورت ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه و ۲۰ ثانیه دمای ۶۳ درجه و ۲۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه و سپس مرحله بررسی منحنی ذوب از ۶۵ الی ۹۵ درجه سانتیگراد با افزایش ۰.۵ درجه به‌مدت ۵ ثانیه انجام شد.

برای بررسی آماری نتایج آزمون کلنی‌زایی در گروه‌های آزمایشی مختلف، به کمک میکروسکوپ نوری معکوس مشاهده شد. در هر آزمایش شش تکرار انجام و کلنی‌ها شمارش شدند. جهت بررسی

معنادار بودن اختلاف بین نتایج حاصل از شمارش، با استفاده از نسخه ۲۱ از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney Uاستفاده شد و آزمون Tukey انجام شد. نتایج گروه‌های آزمایشی مختلف نسبت‌به گروه تیمار نشده، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

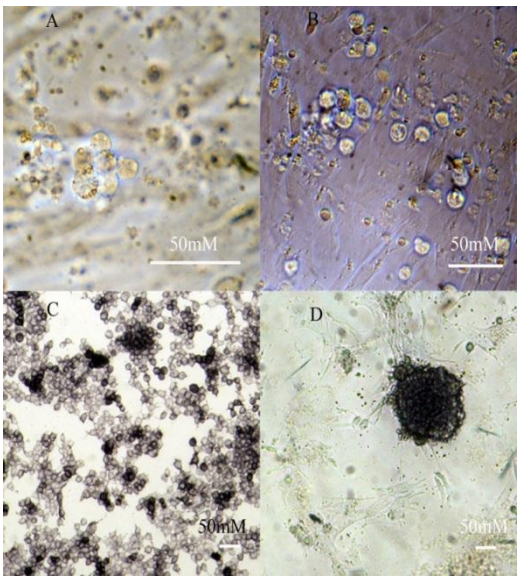
پس از گذشت دو روز از کشت، سلول‌ها در کف پلیت متصل شدند. در میان سلول‌های فیبروبلاستی با شکل دوکی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با شکل مشخص گرد، دیده شدند همچنین تعدادی خوشه اولیه که از خصوصیات این سلول‌هاست دیده شدند. پس از گذشت چهار روز کلنی‌های سلول بنیادی اسپرماتوگونی مشاهده شدند. در شکل ۱ به ترتیب، خوشه‌های اولیه تشکیل شده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر (A-۱)، سلول‌های منفرد گرد و به‌صورت جفت شده و همچنین خوشه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بزرگنمایی ۱۰۰ برابر (B-۱)، نتیجه مثبت آزمون فسفاتاز قلیایی بزرگنمایی ۴۰ برابر (C-۱) و شکل شاخص کلنی‌های اسپرماتوگونی بزرگنمایی ۴۰ برابر (D-۱) نمایش داده شده است.

در آزمایش فسفاتاز قلیایی کلنی‌ها مثبت بودند همچنین تعدادی از سلول‌های گرد هم مثبت بودند، سلول‌های فیبروبلاستی و دوکی رنگ نپذیرفته و منفی بودند همچنین سلول‌های P19 نسبت‌به آزمایش مثبت بودند (شکل ۱).

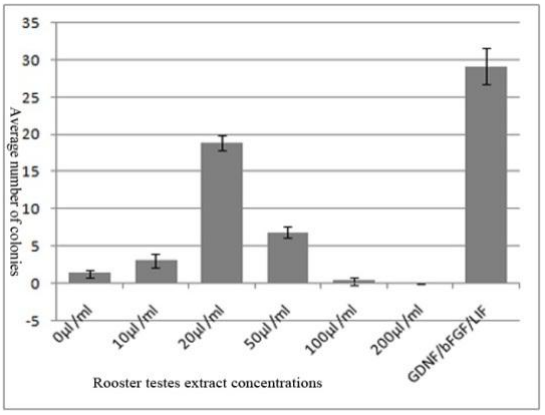
نتایج بررسی تشکیل کلنی در مورد عصاره بیضه خروس در غلظت‌های µl/ml ۱۰، µl/ml ۲۰و µl/ml ۵۰ نسبت‌به نمونه بدون تیمار افزایش معناداری داشتند اما در غلظت µl/ml ۲۰ محیط کشت عصاره‌ها بیشترین تعداد کلنی تشکیل شده مشخص گردید (نمودار ۱). در آزمایش تشکیل کلنی در مورد عصاره بیضه موش در غلظت‌های µl/ml ۲۰ و µl/ml ۵۰ نسبت‌به نمونه بدون تیمار افزایش معنادار داشتند اما در غلظت µl/ml ۲۰ محیط کشت عصاره‌ها بیشترین تعداد کلنی تشکیل شده مشخص گردید (نمودار ۲). در نهایت غلظت µl/ml ۲۰ به‌عنوان غلظت بهینه این عصاره‌ها جهت تیمار نهایی و سنجش بیان ژن OCT4 در نظر گرفته شد (نمودار ۱ و ۲). در غلظت‌های بالاتر این عصاره‌ها سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی شکل طبیعی خود را از دست داده و به‌صورت نکروتیک و یا مرده و شناور توسط میکروسکوپ مشاهده شدند.

در آزمایش RT-PCR کلیه تیمارهای مورد آزمایش برای ژن GAPDH و STRA8 مثبت بودند، نتیجه در مورد ژن GAPDH کنترل منفی آزمایش منفی بود.

در آزمایش Real-time RT-PCR غلظت‌های بهینه تعیین شده عصاره‌های بافت بیضه و همچنین تیمار عوامل رشد افزایش بیان

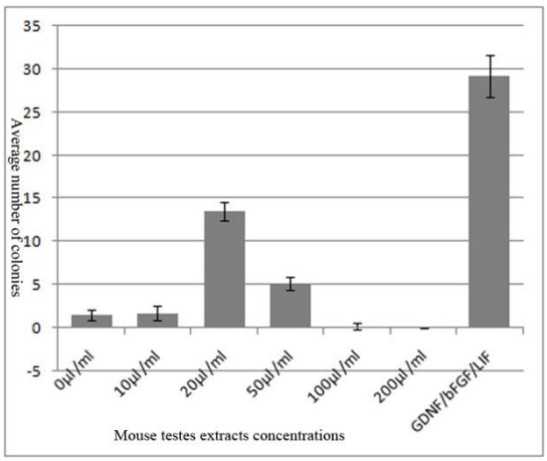


شکل ۱- اشکال مختلف سلول‌های بنیادی و آزمایش فسفاتاز قلیایی

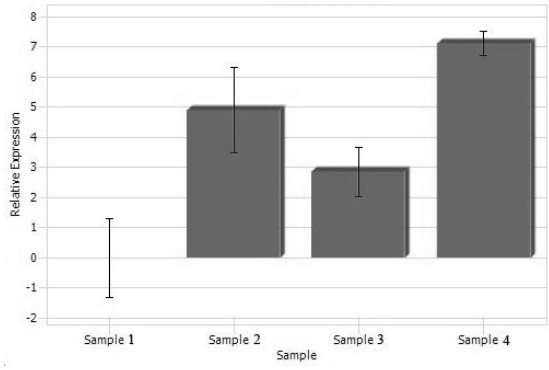


نمودار ۱- بررسی مقایسه‌ای بازده تشکیل کلنی در غلظت‌های مختلف عصاره بیضه خروس (آزمایش در شش تکرار صورت گرفته است و نتایج به‌صورت mean±SD گزارش شده است.)

معنی‌داری را نسبت‌به نمونه شاهد نشان دادند، شماره‌های ۱ تا ۴ به‌ترتیب بیانگر محصول RT-PCR از سلول‌های کشت نرمال در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو؛ تیمار شده با ۲۰ میکرولیتر عصاره بافت بیضه خروس در هر میلی‌لیتر محیط کشت نرمال; تیمار شده با ۲۰ میکرولیتر عصاره بافت بیضه موش در هر میلی‌لیتر محیط کشت نرمال؛ تیمار شده با عوامل رشد GDNF، bFGF و LIF، می باشد در این آزمایش به‌ترتیب تیمار حاوی عوامل رشد، تیمار با عصاره بافت بیضه خروس و تیمار با عصاره بافت بیضه موش نسبت‌به نمونه شاهد افزایش بیان بالاتری را داشتند (نمودار ۳).



نمودار ۲- بررسی مقایسه‌ای بازده تشکیل کلنی در غلظت‌های مختلف عصاره بیضه موش (آزمایش در شش تکرار صورت گرفته است و نتایج به‌صورت mean±SD گزارش شده است.)



نمودار ۳- بررسی کمی بیان ژن OCT4 در گروه کنترل و تیمارهای مختلف

بحث

اولین گام جهت شروع مطالعات مناسب بر روی سلول بنیادی کشت و نگهداری مناسب آن در محیط آزمایشگاهی قابل کنترل است. در طی سال‌های اخیر عوامل رشد مهمی همچون GDNF، LIF و bFGF بر روی سلول‌های بنیادی پستانداران بهینه‌سازی شده است (۳۰-۳۲). این تجارب بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی هم آزمایش شده و نتایج مهمی از آنها حاصل شده است (۳۳). اما تاکنون آزمایش مستقلی در مورد پرندگان صورت نگرفته است و در واقع نتایج رشد سلول‌های اسپرماتوگونی پستانداران به‌عنوان الگویی در پرندگان تکرار شده است (۲۲).

علاوه بر روش‌های استفاده از عوامل رشد تاکنون روش‌هایی همچون همکشتی این سلول‌ها با سلول‌های دیگر و همچنین بررسی بسترهای تغذیه‌کننده و حتی استفاده از سیستم‌های سه بعدی کشت سلول مورد توجه بوده‌اند (۳۴ و ۳۵). اما گزارشی مبتنی بر استفاده از عصاره بافت بیضه به‌عنوان بافت اصلی این سلول‌ها یافت نشد.

باتوجه به اینکه روش کلاسیک بررسی این سلول‌ها مبتنی‌بر انجام عمل جراحی و پیوند سلول‌ها به حیوان بالغ دیگر بود در سال ۲۰۰۷ پژوهشگران روش جدید و مستقل از پیوند را معرفی نمودند (۲۹). این روش سرعت زیادتری داشته و ارزیابی مقایسه‌ای آن با روش پیوند، آن را به‌عنوان روشی مناسب و قابل اطمینان معرفی می‌نماید، در پژوهش حاضر از این روش و بررسی کلنی‌های تشکیل شده جهت تصمیم‌گیری در مورد تیمار بهینه استفاده شد. نتایج مشخص ساختند که این روش در زمان کوتاه می‌تواند تأثیر عصاره بافت بیضه خروس و موش را به خوبی آشکار سازد.

نتایج این پژوهش مشخص ساخت که سلول‌های اسپرماتوگونی پرندگان با استفاده از یک روش جایگزین کم هزینه قابل کشت و نگهداری در محیط آزمایشگاه هستند. همچنین این سلول‌ها از لحاظ مورفولوژیک، آزمون فسفاتاز قلیایی و بیان OCT4 و STRA8 مورد ارزیابی قرار گرفتند.

گرچه در حال حاضر عوامل رشد مشخصی در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پستانداران معرفی شده‌اند اما قطعاً این عوامل در مقابل عوامل مؤثر بافت بیضه بسیار اندک هستند. سلول‌های سرتولی که محافظ سلول‌های اسپرماتوگونی هستند اکثر عوامل مؤثر را ترشح می‌کنند و در تعیین سرنوشت این سلول‌ها نقش به‌سزایی دارند (۳۶). در واقع عواملی همچون GDNF، bFGF، LIF، EGF، SCF و بسیاری عوامل دیگر توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شوند (۳۷ و ۳۸). باتوجه به این توانایی مطالعاتی برروی هم کشتی سلول‌های سرتولی با سلول‌های نیازمند این عوامل صورت گرفته است (۳۹).

گرچه در غلظت‌های بهینه عصاره بیضه می‌تواند در جهت حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی عمل نماید اما نکته‌ای که حائز اهمیت است این است که در غلظت‌های بالاتر از این مقدار نوعی اثر مهاری و حتی سمی برای سلول‌ها مشاهده شد که خود نیازمند بررسی بیشتر است. در عین حال مشخص است که تغییرات درون گونه‌ای در طی تکامل وجود دارد تا جایی که عصاره بافت بیضه خود خروس اثر بهتری را چه در تشکیل کلنی و چه در افزایش بیان ژن OCT4، که در حال حاضر به‌عنوان یکی از عوامل ضروری حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شناخته شده است (۴۰)، نسبت‌به عصاره حاصله از بافت بیضه موش بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جوجه‌های یک‌روزه داشته است.

باتوجه به اثر مثبت عصاره بافت بیضه بر روی حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی این روش به‌عنوان روشی کم هزینه و

جایگزین عوامل رشد گرانقیمت معرفی می‌گردد. در عین حال باید در نظر داشت که در این روش به‌علت نامشخص بودن محتوای عصاره و متغیر بودن آن که وابسته به نژاد و سن خروس دارد باید در هر استخراج عصاره بافتی مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتوان غلظت بهینه آن را مشخص نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط گرنت ستاد سلول‌های بنیادی حمایت شد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر فراهم آوردن امکان پژوهش و از آقایان حجت نادری مشکین و علی‌اکبر حداد مشهدریزه جهت کمک‌های علمی ایشان و همچنین از شرکت مرغک مشهد به خاطر فراهم آوردن مدل حیوانی تشکر نمایند.

References

1. de Rooij DG. The spermatogonial stem cell niche. Microsc Res Tech 2009;72(8):580-585.
2. de Rooij DG. Stem cells in the testis. Int J Exp Pathol 1998; 79(2):67-80.
3. Goldschmidt R. Some experiments on spermatogenesis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1915;1(4):220-222.
4. Clermont Y, Leblond CP. Renewal of spermatogonia in the rat. Am J Anat 1953;93(3):475-501.
5. de Roolj DG. Stem cell renewal and duration of spermatogonial cycle in the goldhamster. Z Zellforsch Mikrosk Anat 11968;89(1): 133-136.
6. Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. 3. Evidence for a long-cycling population. Cell Tissue Kinet 1971; 4(4):335-349.
7. Oakberg EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. Anat Rec 1971;169(3):515-531.
8. Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. Physiol Rev 2012;92(2):577-595.
9. Vlajkovic S, Cukuranovic R, Bjelakovic MD, Stefanovic V. Possible therapeutic use of spermatogonial stem cells in the treatment of male infertility: a brief overview. Scientific World Journal 2012; 374151.
10. 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):1075-1081.
11. Poirot C, Schubert B. Fertility preservation in prepubertal children. Bull Cancer 2011;98(5):489-499.
12. Scaldaferri ML, Fera S, Grisanti L, Sanchez M, Stefanini M, De Felici M, et al. Identification of side population cells in mouse primordial germ cells and prenatal testis. Int J Dev Biol 2011; 55(2):209-214.
13. Schmidt JA, Abramowitz LK, Kubota H, Wu X, Niu Z, Avarbock MR, et al. In vivo and in vitro aging is detrimental to mouse spermatogonial stem cell function. Biol Reprod 2011;84(4):698-706.
14. Huang G, Ashton C, Kumbhani DS, Ying QL. Genetic manipulations in the rat: progress and prospects. Curr Opin Nephrol Hypertens 2011;20(4):391-399.
15. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell 1998; 30(4):389-397.
16. Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. Science 2002;297(5580):392-395.
17. Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. Biol Reprod 2003;6:272-281.
18. Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. J Androl 2002;23(4):537-545.
19. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(24):11303-11307.
20. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. Biol Reprod 1999;61(5):1331-1339.
21. Jung JG, Lee YM, Kim JN, Kim TM, Shin JH, Kim TH, et al. The reversible developmental unipotency of germ cells in chicken. Reproduction 2010;139(1):113-119.
22. Li B, Wang XY, Tian Z, Xiao XJ, Xu Q, Wei CX, et al. Directional differentiation of chicken spermatogonial stem cells in vitro. Cytotherapy 2010;12(3):326-331.
23. Liu L, He P, Cai K, Zhang Y, Li J, Cao F, et al. Lentivirus-mediated expression of MxA in chicken spermatogonial stem cells. Reprod Domest Anim 2010;45(5):e131-137.
24. Yu F, Ding LJ, Sun GB, Sun PX, He XH, Ni LG, et al. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. Mol Reprod Dev 2010;77(4):340-347.
25. Nakamura Y, Kagami H, Tagami T. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. Dev Growth Differ 2013; 55(1):20-40.
26. Jung JG, Kim DK, Park TS, Lee SD, Lim JM, Han JY. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. Stem Cells 2005;23(5):689-698.
27. Kim JN, Lee YM, Park TS, Jung JG, Cho BW, Lim JM, et al. Detection and characterization of primordial germ cells in pheasant (Phasianus colchicus) embryos. Theriogenology 2005;63(4):1038-1049.
28. Mokoto M, Ohashi T, Ken-ichi N, Shinji L. Analysis of chicken primordial germ cells. Cytotechnology 2008;57(2):199-205.
29. Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2007;77(5):897-904.
30. Hu J, Shima H, Nakagawa H. Glial cell line-derived neurotropic factor stimulates sertoli cell proliferation in the early postnatal period of rat testis development. Endocrinology 1999;140(8):3416-3421.
31. Pitman M, Emery B, Binder M, Wang S, Butzkueven H, Kilpatrick TJ. LIF receptor signaling modulates neural stem cell renewal. Mol Cell Neurosci 2004;27(3):255-266.
32. Xi J, Wang Y, Zhang P, He L, Nan X, Yue W, et al. Human fetal liver stromal cells that overexpress bFGF support growth and maintenance of human embryonic stem cells. PLoS One 2010;5(12):e14457.

33. Yin M, Li DX. Effects of SCF, LIF and bFGF on mouse spermatogonial stem cells proliferation in vitro. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2002;18(6):754-757.

34. Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, et al. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. J Androl 2008;29(3):312-329.

35. Zhang DY, He DW, Wei GH, Song XF, Li XL, In t. Long-term coculture of spermatogonial stem cells on sertoli cells feeder layer in vitro. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2008;39(1):6-9.

36. Oatley MJ, Racicot KE, Oatley JM. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. Biol Reprod 2011;84(4):639-645.

37. Fouchecourt S, Godet M, Sabido O, Durand P. Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. J Endocrinol 2006;190(1):59-71.

38. Spinnler K, Kohn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. Hum Reprod 2010;25(9):2181-2187.

39. Shi B, Deng L, Shi X, Dai S, Zhang H, Wang Y, et al. The enhancement of neural stem cell survival and growth by coculturing with expanded Sertoli cells in vitro. Biotechnol Prog 2012;28(1):196-205.

40. Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH. Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. Stem Cells 2008;26(11):2928-2937.

Journal of Knowledge & Health 2014; Vol 9, No 3
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.1234/knh.v1i0.10
Original Article

The Evaluation of Testes Extracts on Spermatogonial Stem Cells' Self-Renewal Property Compared to Their Specific Growth Factors

Sohrab Boozarpour (Ph.D.)[1], Majid Momeni Moghaddam (Ph.D.)[2], Maryam Moghaddam Matin (Ph.D.)[1], Hossein Kazemi Mehrjerdi (Ph.D.)[3], Sajjad Sisakhtnezhad (Ph.D.)[1], Asieh Heyrani Tabasi (M.Sc.)[4], Ahmad Reza Bahrami (Ph.D.)[1*]

1- Dept. of Biology, School of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Dept. of Biology, School of Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
3- Dept. of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4- Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad Branch, Mashhad, Iran.

Received: 16 November 2013**, Accepted:** 6 June 2013

Abstract:

Introduction: *Spermatogonial stem cells are regarded as the continual generator of sperms in males. They possess the potential to regenerate themselves, provided by the niche, which is necessary for substituting the old sperms with the new ones and their population's maintenance. There are demanding efforts conducted often on spermatogonial stem cells, and some special growth factors with the capability of reestablishment of this niche under experimental circumstances, but there have been few studies on poultries in this respect.*
Methods: *In the present study, the impact of adult mice and roosters testes extracts on colony-formation potential of chicken spermatogonial stem cells in the course of four days, as compared to those of three conventional growth factors (LIF, bFGF and GDNF) was investigated. After determination of the optimum concentrations of growth factors, OCT4 gene expression was measured as one of spermatogonial stem cell activities' signature via Real-time RT-PCR technique during two weeks treatment.*
Results: *The results of colony forming activity show that in vitro treatment by the mice and roosters testes extracts and the three mentioned growth factors (GDNF,bFGF and LIF) had a considerably discrepancies in terms of the number of created colonies compared to the control group (without adding any factor) after four days. Moreover, the OCT4 over-expressed extremely by these biological impulses after two weeks.*
Conclusion: *The results indicated that the testes extract would be a valuable substitute for non-economical industrial growth factors.*

Keywords: Spermatogonial stem cell, Self renewal, Growth factors, Testes extract.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** A R. Bahrami**, Email:** Ar-Bahrami@um.ac.ir*

Citation: Boozarpour S, Momeni Moghaddam M, Moghaddam Matin M, Kazemi Mehrjerdi H, Sisakhtnezhad S, Heyrani Tabasi A, Bahrami A R. The evaluation of testes extracts on spermatogonial stem cells' self-renewal property compared to their specific growth factors. Journal of Knowledge & Health 2014;9(3):62-69.