بررسی کشت سلولهای بنیادی اسپرم ساز در شرایط چسبنده و غیر چسبنده

حسین عزیزی[۱]، عبدالحسین شاهوردی[۲*] و اباصلت حسین زاده کلاگر[۳]

[۱] آمل، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین، دانشکده زیست فناوری

[۲] تهران، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوینی

[۳] بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۵

چکیده

سلولهای بنیادی اسپرم ساز سلولهایی هستند که در غشای پایه لوله های اسپرم ساز قرار گرفته و قادر به تولید اسپرم در طول حیات مردان می‌باشند. مطالعات مختلف آزمایشگاهی نشان داد این سلولها بعد از جداسازی از بافت بیضه، تحت شرایط خاص قادر به کشت هستند. در این مطالعه سلولهای بیضه موشهای نر۵-۷ روزه نژاد NMRI پس از تیمار با آنزیمهای هضم کننده کلاژناز تیپIV، DNAse و دیسپاز، جداسازی شدند. سپس تعداد تقریبی $۱۰^۶$ سلول در محیطهای حاوی فاکتورهای رشد با شرایط کشت چسبنده، روی فیبروبلاست جنینی موش و کشت غیر چسبنده، روی آگارز ۱ درصد، کشت داده شدند. نتایج نشان داد سلولهای بیضوی کشت شده در شرایط غیرچسبنده (کلنی های غیر چسبنده) قادر به تشکیل کلنی‌هایی بوده که همانند کلنی-های سلولهای بنیادی اسپرم ساز تشکیل شده در شرایط کشت چسبنده (کلنی های چسبنده)، مارکرهای سلولهای جنسی را بیان می‌کنند. مطالعه میکروسکوپ الکترونی کلنی‌ها نشان داد، هر دو نوع کلنی همانند سلولهای اسپرم ساز واقع در غشای پایه لوله-های اسپرم ساز دارای هسته بزرگ اما سیتوپلاسم کوچک می‌باشند. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس وجود کلنی‌های β1-Integrin، α6-Integrin و Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) مثبت را تأیید کرد. آنالیزهای Real-time PCR نیز تفاوت معنی‌داری در بیان ژنهای سلولهای جنسی این کلنی‌ها شامل: *Oct4*، *Sox*-2 (Sex determining region Y-box 2)، *CD*9، *EPCAM* (Epithelial cell adhesion molecule) را با سلول سوماتیکی نشان داد. از طرف دیگر افزایش بیان Ki67 در هر دو نوع کلنی با استفاده از بررسی ایمونوسیتوشیمی مشاهده شد که بیانگر خاصیت تکثیرپذیری این قبیل از سلولهاست. این نتایج نشان می‌دهد سیستم کشت غیر چسبنده می‌تواند به عنوان یک روش جدید برای کشت کوتاه مدت سلولهای جنسی مشتق شده از بیضه مورد توجه محققین در تحقیقات بعدی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سلولهای بنیادی اسپرم ساز؛ کشت سلول جنسی؛ بیان ژنهای جنسی؛ آنتی ژن *Ki67*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۳۳۹۹۰۹ ، پست الکترونیکی: shahverdi@royaninstitute.org

مقدمه

فرآیند اسپرماتوژنز به وسیله جمعیت محدودی از سلولهای بنیادی اسپرم ساز شروع شده و حفظ می‌شود. برآورد می-شود تقریباً در بیضه جوندگان بالغ از بین سلولهای سوماتیکی و همچنین سلولهای تمایز یافته اسپرم ساز، سلولهای بنیادی اسپرم ساز بین ۰/۰۲ تا ۰/۰۳ درصد کل تعداد سلولها را تشکیل دهند (۹، ۲۳ و ۳۸). سلولهای بنیادی اسپرم ساز به غشای پایه لوله‌های اسپرم ساز متصل بوده و معیارهای مورفولوژیک آن به مکان قرارگیری در غشای پایه، ارتباط با دیگر سلولهای لوله اسپرم ساز، سیتوپلاسم روشن و نسبت بزرگی هسته به سیتوپلاسم مشخص می‌شود. هسته سلولهای بنیادی اسپرم ساز دارای ظاهری خالدار با لکه‌های تیره از نوع هتروکروماتینی می-

باشد(۶). قابلیت خود نوسازی و تمایزی سلولهای بنیادی اسپرم ساز آنها را قادر می‌سازد تا فرآیند اسپرماتوژنز را حفظ کنند.

امروزه محققان از چندین روش برای جداسازی سلولهای بنیادی اسپرم ساز استفاده می‌کنند. یکی از روشها، استفاده از ماتریکس خارج سلولی مانند لامینین و کلاژن می‌باشد (۱، ۷، ۱۹و۳۰). علاوه براین از تکنیکهای FACS و MACSبر علیه تعدادی از مارکرهای سطح سلولی مختلف از جمله α6-Integrin (CD49) وβ1-Integrin (CD29) اینتگرین، CD9، E-cadherin ، THY-1 (CD90) و GFRa1 که در سطح سلولهای بنیادی اسپرم ساز بیان می‌شود هم در جداسازی این سلولها کاربرد دارد (۱۷، ۲۷، ۲۸، ۳۹و۴۲). علاوه بر این روشها، شناسایی مورفولوژی سلولهای جنسی پس از کشت کل سلولهای بیضه از دیگر روشهای ارزشمند برای جداسازی سلولهای جنسی می‌باشد (۱۸، ۲۴و ۲۶).

لایه تغذیه کننده به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی برای رشد سلولهای بنیادی اسپرم ساز در نظر گرفته می‌شود. ویژگیهای لایه های تغذیه کننده مختلف پژوهشگران را قادر می‌سازد تا نتایج مناسبی از رشد و نگهداری سلولهای بنیادی به دست آورند. اخیراً از لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موش یا MEF (Mouse embryonic fibroblasts) در بسیاری از محیطهای کشت سلولهای بنیادی اسپرم ساز استفاده می‌شود. مشخص شده لایه‌های تغذیه کننده بیضه حاوی سلولهای CD34 مثبت (۳۳)، STOیا سلولهای سرتولی (۱۳، ۲۴و ۲۷) می‌توانند به عنوان سلولهای لایه تغذیه کننده از تکثیر سلولهای بنیادی اسپرم ساز حمایت کرده اما رده سلولهای سوماتیکی سرتولی TM4 یا SF7، حفظ و بقای تعدادی از سلولهای بنیادی جنسی را کاهش می‌دهد (۲۴). بررسیها نشان داد ماتریکس خارج سلولی نانوفیبریلار نیز می‌تواند از حفظ و بقای سلولهای بنیادی اسپرم ساز موشهای نوزاد در طی کشت کوتاه مدت حمایت کند (۳۴ و ۳۵).

علاوه بر موارد ذکر شده، سلولهای بنیادی اسپرم ساز می‌تواند تحت شرایط بدون سرم یا بدون سلولهای تغذیه کننده در پلیتهای پوشیده شده با لامینین تکثیر یابد اما در غیاب هر دو (سرم و سلولهای تغذیه کننده) این سلولها قابل تکثیر نمی‌باشند (۱۴ و ۱۵) با توجه به این تحقیقات، پتانسیل تکثیری سلولهای زایشی تحت شرایط سرم و بدون لایه تغذیه کننده (feeder free) کاهش می‌یابد (۱۱). فاکتورهای رشد محلول می‌تواند نقشی حیاتی در کشت سلولهای بنیادی اسپرم ساز ایفا کند. مطالعات نشان داد ترکیبی از فاکتورهای رشد همچون GDNF، EGF، bFGF سلولهای بنیادی اسپرم ساز را در حالت غیر تمایز یافته حفظ می‌نماید (۴۰).

علی رغم شرایط کشت چسبنده، کشت حالت سوسپانسیون سلولهای بنیادی اخیراً گزارش شد. این سیستم کشت می‌تواند از تکثیر، خود نوزایی و همچنین پر توانی سلولهای بنیادی پرتوان بدون تمایز به سلولهای با منشاء لایه‌های اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی حمایت کرده و این سلولها را در حالت غیر تمایز یافته حفظ کند (۱، ۲ و ۳۶). سلولهای شناور در کشت سوسپانسیون نشانگرهای (مارکرهای) پرتوانی را بیان کرده و این قابلیت را دارد تا به سلولهای سه لایه جنینی تمایز یابد (۳۶). لاریجانی و همکارانش سلولهای پر توان hESCs و hiPSCs را در شرایط کشت سوسپانسیون با روش micro-carrier-free گسترش دادند. به طور مشابه ای کشت سوسپانسیون hESCs هم در محیط کشت mTeSR انجام شد (۳۶). همان طور که در بالا ذکر شد، برخی از تحقیقات نشان داد که کشت آزمایشگاهی سلولهای بنیادی اسپرم ساز طی کشت چسبنده، دارای محدودیتهایی در حفظ حالت خودنوزایی در سلولهای بنیادی اسپرم ساز است (۱۲). به منظور غلبه بر این مشکل از کشت سوسپانسیون که مشخص شده دارای مزایای متعددی نسبت به کشت

چسبنده است برای کشت سلولهای جنسی استفاده می-شود(۴، ۸و۳۱). در مطالعه قبلی این تحقیق نشان داده شده که کلنی های سلولهای بنیادی اسپرم ساز در شرایط غیر چسبنده (در پلیتهای کشت پوشیده شده با آگارز) قابل شکل گیری بوده و این کلنی‌ها مارکرهای سلولهای بنیادی جنسی را بیان می‌کنند (۴) در مطالعه حاضر کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرم ساز تشکیل شده در شرایط کشت چسبنده و غیر چسبنده مورد مقایسه قرار گرفته و میزان بیان مارکرهای جنسی در این سلولها با سلولهای سوماتیکی مشتق شده از بیضه ارزیابی شد.

مواد وروشها

جداسازی و کشت سلولهای بافت بیضه: روش جداسازی سلولهای بیضه از بافت بیضه به روش عزیزی و همکاران انجام شد(۳). در این روش بیضه موش نر (نژاد NMRI) ۵-۷روزه بعد از جداسازی از حیوان، در محلول نمکی بافر فسفات قرار داده شد. سپس لوله‌های اسپرم ساز بیضه از کپسول بیضه جدا شده و به قطعات کوچکتر تقسیم شدند. بافت خرد شده در معرض ۰/۵ $mg\ ml^{-1}$ آنزیم کلاژناز تیپ IV؛ ۰/۵ $mg\ ml^{-1}$ آنزیم DNAse؛ و mg ۰/۸ ml^{-1} از دیسپاز قرار داده شد. سوسپانسیون تک سلولی به دست آمده حاصل از هضم آنزیمی بافت بیضه، پس از عبور از فیلتر نایلونی ۷۰ µm به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف شد و در شرایط کشت غیر چسبنده حدود $۱۰^{۶}$سلول بیضه در پلیتهای کشت پوشیده با آگارز ۱ درصد حاوی [2%, FBS؛۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر ازGDNF (Glial derived neurotrophic factor)؛ ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتورEGF (Epidermal growth factor)؛ و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از فاکتور FGF (Fibroblast growth factors)] قرار گرفت. سلولهای زنده با استفاده از روش رنگ سنجی عمومی Trypan blue شناسایی شد. در شرایط کشت چسبنده، سلولها در پلیتهای پوشیده با فیبروبلاست جنینی موش کشت داده شد. سلولهای بیضه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ CO_2 درصد نگهداری شدند.

انجماد و ذوب سلولهای جنسی: سلولهای جنسی مشتق شده از بیضه در محلول فریز که حاوی DMEM ,30%، FBS ,60% و DMSO ,10% بود، قرار گرفته و سپس بلافاصله به ظروف انجماد حاوی ایزوپروپانول منتقل شده تا در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شود. بعد از ۲۴ ساعت ویال به تانک نیتروژن منتقل شدند. در زمان ذوب، سلولها پس از انتقال به محیط کشت گرم شده DMEM ذوب شده و بعد از سانتریفیوژ و حذف محیط رویی در محیط کشت معمول خود کشت داده شد.

رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی: همانند پروتکل اشاره شده در رفرنس(۴)، سلولهای کشت داده شده با پارافورمالدئید ۴ درصد فیکس شده و بعد از نفوذ پذیری (permeabilized) با 2%,Triton، به مدت یک شبانه روز با آنتی بادی های اولیه انکوبه شد. پس از شستشو این روند با انکوبه کردن سلولها با گونه های خاص آنتی بادیهای ثانویه نشاندار ادامه یافت. در نهایت از میکروسکوپ فلورسنس (BX51, Olympus Co. Japan) و کونفوکال (LSM 700, Zeiss Co. Germany) برای بررسی سلولهای نشان دار شده استفاده گردید.

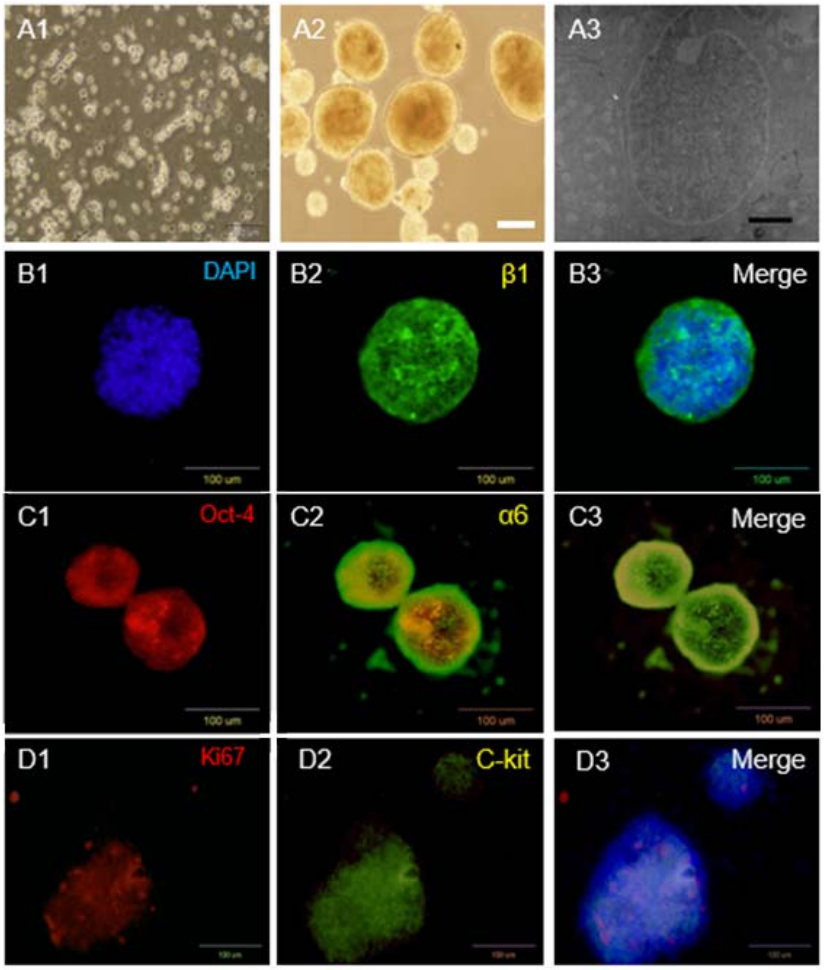
بررسیها با میکروسکوپ الکترونی: کلنی‌ها دو بار با محلولPBS شسته شده سپس با بافر گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت تثبیت شد. مرحله بعدی تثبیت در تترا اکسید اسمیوم آبی به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. نمونه-ها از طریق افزایش درصد اتانول (۲۹ و ۳۰) آبگیری شده سپس در دستگاه خشک کننده هوا خشک شد. سطح نمونه با لایه نازکی از طلا پوشیده شد و با میکروسکوپ الکترونی روبنده یا نگاره (VEGA\TESCAN, Czech Republic) مشاهده شد.

آنالیزهای بیان کمی ژن با روش FluidigmBiomark: از

این روش برای اندازه گیری بیان چندین ژن مخصوص سلولهای جنسی مانند Oct4، Sox-2، CD9، EPCAM و همچنین ژن خانه دار GAPDH برای سلولهای جنسی کشت داده شده استفاده شد. در این آزمایش سلولها به صورت مکانیکی و با استفاده از میکروپیپت‌های مخصوص یا میکرومنیپولاتور جداسازی و بلافاصله منجمد شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه‌ها با استفاده از بافر لیز کننده خاص لیز شده و در ادامه با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس mRNA به cDNA تبدیل شده و مقدار ترانس کریپت‌های با استفاده از پرایمرهای مخصوص و با دستگاه Fluidigm تعیین کمیت گردید. به منظور تحلیل داده ها، Ct به دست آمده با بیان ژن GAPDH و همچنین بیان mRNA ژنها در سلولهای تغذیه کننده MEF نرمال سازی شده و آنالیز داده ها هم توسط نرم افزارهای GenEx، Exel و SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه در شرایط کشت غیر چسبنده حدود $۱۰^{۶}$ سلول بیضه موش در پلیتهای کشت $۱۰cm^2$ پوشیده با آگارز ۱ درصد و در حالت کشت چسبنده سلولهای جنسی بیضه روی ژلاتین و لایه تغذیه MEF کشت داده شد. سپس کلنی‌های تشکیل شده در این دو شرایط مورد بررسی قرار گرفت (شکل های ۱و۲).



شکل۱- بررسی کلنی‌ها در شرایط غیر چسبنده: تشکیل کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط غیر چسبنده (A1 و A2)؛ تصویر میکروسکوپ الکترونی از کلنی‌های اسپرم ساز (A3)؛ رنگ‌آمیزی β1-Integrin, DAPI و ادغام آنها (B)؛ رنگ‌آمیزی Oct4, α6-Integrin و ادغام آنها (C)؛ رنگ‌آمیزی C-kit, Ki67 و ادغام آنها با DAPI (D).

مشاهدات نشان داد که کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی حدود ۷ روز پس از کشت در سیستم غیر چسبنده تشکیل شدند (شکل۱-A1 وA2).

آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی نشان داد که کلنی‌های به دست آمده در حالت غیرچسبنده همانند سلولهای بنیادی اسپرم ساز قرار گرفته در غشای پایه لوله‌های اسپرم ساز، دارای ضریب نوکلئوپلاسمی (حجم هسته به سیتوپلاسم) بالا هستند (شکل۱-A3). خصوصیات کلنی‌های به وجود آمده در شرایط غیر چسبنده، ۲۱ روز پس از کشت و با روش ایمونوسیتوشیمی مشخص شد. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس وجود کلنی‌های β1-Integrin، α6-Integrin و Oct4 مثبت را تأیید کرد (شکل۱-B وC).

همچنین با بررسی بیان مارکر تکثیر سلولی Ki67 در کلنی-ها، مشخص خواهد شد که آیا کلنی‌های به وجود آمده در کشت غیر چسبنده می‌توانند در این شرایط کشت، تکثیری داشته باشند؟ رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس بیان Ki67 را در کلنی های c-kit مثبت تأیید کرد (شکل ۱-D و E). پروتئین Ki67 یک پروتئین غیرهیستونی هسته‌ای است که در طی تکثیر سلولها بیان می‌شود (۳۲).

نتایج به دست آمده در شرایط کشت غیر چسبنده با حالت چسبنده مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. تحت شرایط کشت چسبنده، کلنی سلولهای بنیادی جنسی در پلیتهای کشت پوشیده شده با ژلاتین تشکیل شده و سپس ادامه کشت این کلنی‌ها در پلیتهای کشت جدید پوشیده با لایه تغذیه MEF انجام شد (شکل۲- A و B). نتایج ذوب و انجماد نشان داد کلنی‌های سلولهای جنسی به دست آمده از بافت بیضه در شرایط چسبنده و غیر چسبنده، بعد از انجماد دوباره شکل گرفت. آنالیز های میکروسکوپ الکترونی نشان داد این کلنی‌ها همانند کلنی‌های تشکیل شده در شرایط غیرچسبنده دارای هسته بزرگ اما سیتوپلاسم کوچک می‌باشد (شکل۲-E). بررسیهای ایمونوسیتوشیمی بیان مارکرهای سلولهای جنسی Oct4، Sox2، Vasa و همچنین آنتی ژنKi67 را در کلنی‌های به دست آمده تأیید کرد (شکل۲-C، D وE). در این بررسی بیان Ki67 در کلنی‌های Vasa مثبت نشان داد (شکل۲-C).

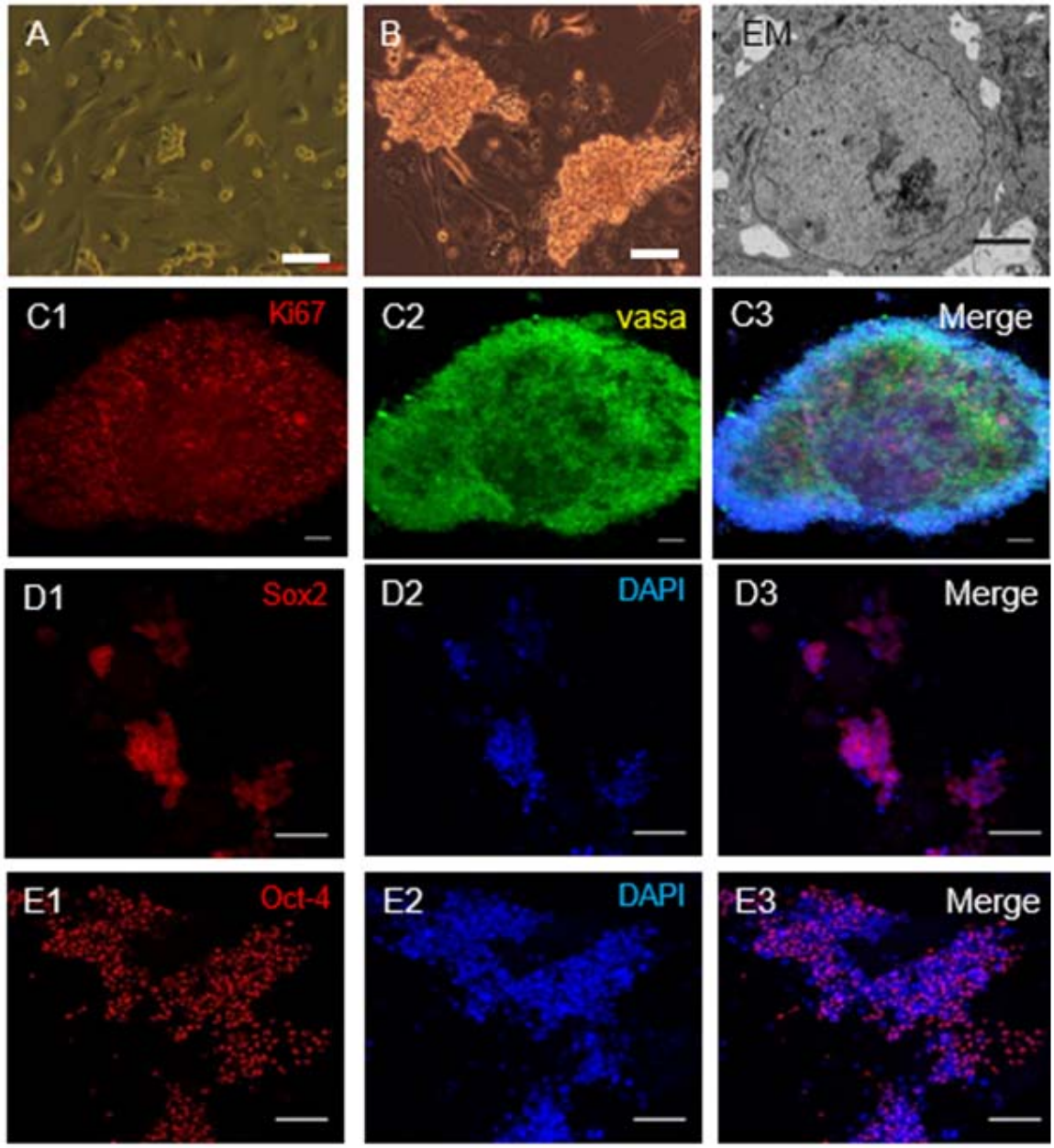
آنالیز Fluidigm Realtime PCR افزایش معنی دار بیان mRNAی ژنهای Oct4، Epcam و Sox2 را در کلنی‌های سلولی جدا شده در شرایط غیر چسبنده و چسبنده نسبت به سلول سوماتیکی بیضه نشان داد اما در سطح بیان Cd9 افزایش معنی داری مشاهده نشد (شکل۳). همچنین این بررسی نشان می‌دهد کلنی‌های سلولی جدا شده در شرایط غیر چسبنده و چسبنده نسبت به هم در بیان ژنهای Epcam ، Oct4، Cd9 و Sox2 تفاوت معنی داری ندارد (شکل۳).

بحث

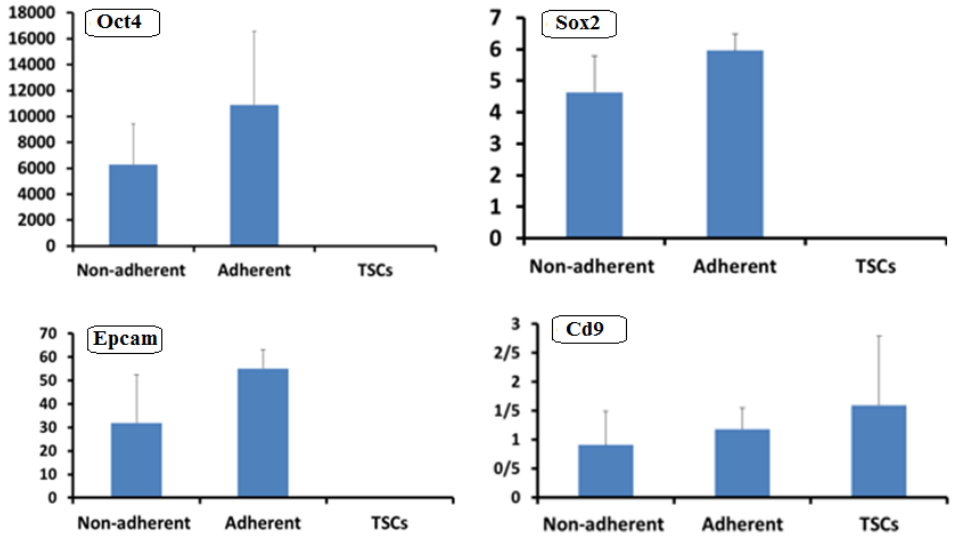
در این مطالعه کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرم ساز به دست آمده در شرایط کشت غیر چسبنده در مطالعه قبلی(۴) با کلنی‌های سلولهای اسپرم ساز تشکیل شده در شرایط کشت چسبنده مورد مطالعه قرار گرفت. بررسیها نشان داد کلنی سلولهای بنیادی اسپرم ساز جدا شده در شرایط کشت غیر چسبنده همانند کلنی‌های به دست آمده در کشت چسبنده، مارکرها و ویژگیهای سلولهای بنیادی اسپرم ساز را نشان دادند. در شرایط کشت غیر چسبنده، به منظور ممانعت از چسبندگی سلولهای بیضه به بستر ظرف، سلولهای بیضه موش در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد و همچنین ظروف پوشیده شده با آگارز کشت داده شد(۴). در شرایط کشت چسبنده سلولهای جنسی بیضه روی ژلاتین و لایه تغذیه MEF کشت داده شد. استفاده از فاکتورهای رشد GDNF و FGF2 یا EGF نشان داد که این فاکتورها برای خودنوزایی تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی اسپرم ساز ضروری است (۵ و ۲۱).

از آنجائی که در مطالعات قبلی تأثیر کشت سوسپانسیون روی سلولهای بنیادی نشان داده شد (۲۰، ۲۲ و ۳۶) و اخیراً محققان از سوسپانسیون بیوراکتور برای افزایش

سلولهای زایا بیضه استفاده کردند (۸ و۳۱). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده در هر دو شرایط کشت چسبنده و غیر چسبنده به وضوح مارکرهای سلول زایا را بیان می‌کنند. از سوی دیگر این تحقیق نشان داد کلنی‌ها در محیط کشت غیرچسبنده همانند کلنی‌های سلولهای اسپرم ساز در شرایط چسبنده ویژگیهای تکثیر پذیری را از خود نشان می‌دهند (۳۴ و ۳۷).



شکل۲- بررسی کلنی‌ها در شرایط چسبنده: تشکیل کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط چسبنده (A و B)؛ تصویر میکروسکوپ الکترونی از کلنی‌ها (EM)؛ رنگ‌آمیزی Ki67,Vasa و ادغام آنها (C)؛ رنگ‌آمیزی Sox2, DAPI و ادغام آنها (D)؛ رنگ آمیزی Oct4, DAPI و ادغام آنها (E).



شکل۳- آنالیز Fluidigm Realtime PCR برای بررسی بیان ژنهای *Epcam*، *Oct4*، *Cd9* و *Sox2*

بررسیها نشان داد مسیر سیگنالینگ Nodal در سلولهای اسپرم ساز در حال تکثیر فعال می‌باشد (۱۰). در مسیر سیگنالینگ Nodal، فعال شدن این مسیر با بیان ژنهای Smad2/3و Oct4 همراه می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده و بیان ژن Oct4، به نظر می‌رسد در کلنی‌های سلولی جدا شده در شرایط غیر چسبنده و چسبنده مسیر سیگنالینگ Nodal فعال باشد.

در سلولهای اسپرم ساز مولکولهای مختلف مانند epithelial cell ،melanoma cell adhesion molecule adhesion molecule و CD9 در چسبندگی و اتصالات سلولی نقش داشته به طوری‌که از این عوامل در جداسازی این سلولها هم استفاده می شود (۱۱، ۱۲ و ۱۶). اگرچه بررسیهای مختلف نشان داد CD9 به عنوان یک مولکول سطح سلولی در سلولهای اسپرم ساز وجود دارد (۳ و۱۲). آنالیز های مولکولی ما در کلنی های سلولی جدا شده در شرایط غیر چسبنده و چسبنده نشان داد مارکر CD9 علاوه بر سلولهای اسپرم ساز در سلولهای سوماتیکی هم بیان می‌شود. سلولهای سوماتیکی بیضه با ترشح فاکتورهای رشد مختلف تکثیر و تمایز سلولهای اسپرم ساز را القاء می‌کند (۲۵، ۲۹، ۳۳ و ۴۱).

نتیجه گیری نهایی

سلولهای بیضه موشهای نر در محیطهای حاوی فاکتورهای رشد در شرایط غیرچسبنده قادر به تشکیل کلنی‌هایی بوده که همانند کلنی‌های سلولهای بنیادی اسپرم ساز تشکیل شده در شرایط کشت چسبنده، مارکرهای سلولهای جنسی را بیان می‌کنند. مورفولوژی کلنی‌های به دست آمده در شرایط غیرچسبنده با بررسیهای میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر این، مطالعات ایمونوسیتوشیمی و Real-time PCR نیز بیان مارکرهای و همچنین تکثیر پذیری سلولهای جنسی این کلنی‌ها را همانند کلنی‌های چسبنده این آزمایش تأیید کرد. این نتایج می‌تواند تأیید کننده این باشد که کلنی‌های سلولهای اسپرماتوگونی علاوه بر کشت چسبنده، در سیستمهای غیرچسبنده هم شکل گرفته که می‌تواند منجر به حفظ و بقای سلولها از طریق بیان ژنهای مرتبط شود. بنابراین می‌توان در این شرایط کشت، فاکتورهای رشد مختلف و همچنین القای مسیرهای سیگنالینگ مرتبط را روی کلنی

سلولهای اسپرم ساز، دور از تأثیرات سیتوکاین‌های مترشحه از سلولهای لایه تغذیه کننده آنالیز کرد. با توجه به نتایج این تحقیق می توان پیشنهاد کرد: اگرچه سیستم غیر چسبنده می‌تواند مدل مناسبی برای بررسی اثر فاکتورهای مختلف بدون تأثیر سلولهای لایه تغذیه کننده باشد اما این روش برخلاف شرایط کشت چسبنده نمی تواند با ازدیاد کلنی های سلولهای بنیادی اسپرم ساز همراه باشد.

منابع

۱- دشت بزرگی، س.، سپهری، ح.، گلیایی، ب.، دلفی، ل.، جان زمین، ا. ۱۳۹۲. بررسی اثر مشتقات پکتینی در القای مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی DU145. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران). ۲۶ (۲): ۱۸۶-۱۹۹

2- Amit, M., Chebath, J., Margulets, V., Laevsky, I., Miropolsky, Y., Shariki, K., Peri, M., Blais, I., Slutsky, G., Revel, M., & Itskovitz-Eldor, J. (2010). Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. Stem Cell Reviews and Reports. 6:248-259.

3- Azizi, H., Conrad, S., Hinz, U., Asgari, B., Nanus, D., Peterziel, H., Hajizadeh Moghaddam, A., Baharvand, H. & Skutella, T. (2016). Derivation of pluripotent cells from mouse SSCs seems to be age dependent. Stem Cells International. 2016:ID8216312.

4- Azizi, H., Skutella, T., & Shahverdi, A. (2017). Generation of mouse spermatogonial stem-cell-colonies in a non-adherent culture. Cell Journal. 19(2): 238-249.

5- Carlomagno, G., van Bragt, M.P., Korver, C.M., Repping, S., de Rooij, D.G., & van Pelt, A.M. (2010). BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. Biology of Reproduction. 83:742-749.

6- Chiarini-Garcia, H., & Russell, L.D. (2002). Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. Reproduction. 123:567-577.

7- Conrad, S., Azizi, H., Hatami, M., Kubista, M., Bonin, M., Hennenlotter, J., Renninger, M., & Skutella, T. (2014). Differential gene expression profiling of enriched human spermatogonia after short- and long-term culture. BioMed Research International. 2014:138350.

8- Dores, C., Rancourt, D., & Dobrinski, I. (2015). Stirred suspension bioreactors as a novel method to enrich germ cells from pre-pubertal pig testis. Andrology. 3:590-597.

9- Hasegawa, K., & Y. Saga. (2014). FGF8-FGFR1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse. Biology of Reproduction. 91:145.

10- He, Z., Jiang, J., Kokkinaki, M., & Dym, M. (2009). Nodal signaling via an autocrine pathway promotes proliferation of mouse spermatogonial stem/progenitor cells through Smad2/3 and Oct-4 activation. Stem Cells. 27:2580-2590.

11- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Morimoto, H., Ogura, A., & Shinohara, T. (2011). Serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. Biology of Reproduction. 84(1):97-105.

12- Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., & Shinohara, T. (2005). Long-term culture of mouse male germline stem cells under

تشکر

نویسندگان از آقای حسین معینی و خانم فاطمه فلاح که در تهیه برخی از مواد و آنالیزهای آماری این پژوهش کمک نمودند، تشکر می‌نمایند. همچنین از حمایتهای مالی پژوهشگاه رویان (تهران) و همچنین مرکز مطالعات و همکاریهای علمی بین‌الملل وزارت علوم که به این پژوهش داشته‌اند، تشکر می‌گردد.

serum-or feeder-fee conditions. Biology of Reproduction. 72(4):985-991.

13- Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., & Shinohara, T. (2012). Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. Biology of Reproduction. 87(6):139-140.

14- Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biology of Reproduction. 69(2):612-616.

15- Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Matoba, S., Morimoto, H., Ogura, A., & Shinohara, T. (2014). Improved serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. Biology of Reproduction. 91(4):88-99.

16- Kanatsu-Shinohara, M., Takashima, S., Ishii, K., & Shinohara, T. (2011). Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. PLoS One. 6(8):e23663.

17- Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2004). CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. Biology of Reproduction. 70(1):70-75.

18- Khosronezhad, N., Hosseinzadeh Colagar, A., Jorsarayi, S.G.A., 2015. C26232T mutation in *Nsun*7 gene and reduce sperm motility in asthenoteratospermic men. Journal of Genetic Resources, 1(1):25-30.

19- Koruji, M., Movahedin, M., Mowla, S. J., Gourabi, H., & Arfaee, A. J. (2009). Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 45(5-6):281-289.

20- Krawetz, R., Taiani, J. T., Liu, S., Meng, G., Li, X., Kallos, M. S., & Rancourt, D. E. (2009). Large-scale expansion of pluripotent human embryonic stem cells in stirred-suspension bioreactors. Tissue Engineering Part C: Methods. 16(4):573-582.

21- Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101(47):16489-16494.

22- Larijani, M., Seifinejad, R., Pournasr, A., Hajihoseini, B., V., Hassani, Totonchi, S. N., ... & Baharvand, H. (2011). Long-term maintenance of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells in suspension. Stem Cells and Development. 20(11):1911-1923.

23- Molavi, F., Darvish, J., Haddad, F., Matin, M., 2015. Chromosome C-banding in *Mus musculus* L.1766 strains shows a fixed position for the centromere and variable amounts in different populations. Journal of Genetic Resources, 1(2):83-88.

24- Nagai, R., Shinomura, M., Kishi, K., Aiyama, Y., Harikae, K., Sato, T., ... & Kanai, Y. (2012). Dynamics of GFRα1- positive spermatogonia at the early stages of colonization in the recipient testes of W/Wv male mice. Developmental Dynamics. 241(8):1374-1384.

25- Nagano, M., Ryu, B. Y., Brinster, C. J., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. Biology of Reproduction. 68(6):2207-2214.

26- Nasiri, Z., Hosseini, S. M., Hajian, M., Abedi, P., Bahadorani, M., Baharvand, H., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Effects of different feeder layers on short-term culture of prepubertal bovine testicular germ cells in-vitro. Theriogenology. 77(8):1519-1528.

27- Rastegar, T., Minaee, M. B., Roudkenar, M. H., Kashani, I. R., Amidi, F., Abolhasani, F., & Barbarestani, M. (2013). Improvement of expression of α6 and β1 integrins by the co-culture of adult mouse spermatogonial stem cells with SIM mouse embryonic fibroblast cells (STO) and growth factors. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 16(2):134-139.

28- Reding, S. C., Stepnoski, A. L., Cloninger, E. W., & Oatley, J. M. (2010). THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. Reproduction. 139(5):893-903.

29- Sada, A., Hasegawa, K., Pin, P. H., & Saga, Y. (2012). NANOS2 acts downstream of glial cell line□derived neurotrophic factor signaling to suppress differentiation of spermatogonial stem cells. Stem Cells. 30(2):280-291.

30- Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Roepers-Gajadien, H. L., Koruji, M., ... & de Rooij, D. G. (2009). Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. Jama. 302(19):2127-2134.

31- Sakib, S., Dores, C., Rancourt, D., & Dobrinski, I. (2016). Use of stirred suspension bioreactors for male germ cell enrichment. Methods in Molecular Biology.1502:111-118

32- Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H., Key, G., Flad, H. D., & Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. The Journal of Cell Biology. 123(3):513-522.

33- Seandel, M., James, D., Shmelkov, S. V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., ... & Yancopoulos, G. D. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. Nature. 449(7160):346-350.

34- Shakeri, M., Kohram, H., Shahverdi, A., Shahneh, A. Z., Tavakolifar, F., Pirouz, M., ... & Baharvand, H. (2013). Behavior of mouse spermatogonial stem-like cells on an electrospun nanofibrillar matrix. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 30(3): 325-332.

35- Singh, H., Mok, P., Balakrishnan, T., Rahmat, S. N. B., & Zweigerdt, R. (2010). Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. Stem Cell Research. 4(3):165-179.

36- Steger, K., Aleithe, I., Behre, H., & Bergmann, M. (1998). The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. Molecular Human Reproduction. 4(3):227-233.

37- Steiner, D., Khaner, H., Cohen, M., Even-Ram, S., Gil, Y., Itsykson, P. & Berman-Zaken, Y. (2010). Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. Nature Biotechnology. 28(4): 361-364.

38- Tagelenbosch, R. A., & de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F 1 hybrid mouse. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 290(2):193-200.

39- Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., & Marunouchi, T. (2007). CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. Biology of Reproduction. 76(1):130-141.

40- Wei, X., Jia, Y., Xue, Y., Geng, L., Wang, M., Li, L. & Wu, X. (2016). GDNF-expressing STO feeder layer supports the long-term propagation of undifferentiated mouse spermatogonia with stem cell properties. Scientific Reports. 6:36779.

41- Yang, Y., Feng, Y., Feng, X., Liao, S., Wang, X., Gan, H. & Han, C. (2016). BMP4 cooperates with retinoic acid to induce the expression of differentiation markers in cultured mouse spermatogonia. Stem Cells International. 2016: ID 9536192.

42- Zhang, Y., Su, H., Luo, F., Wu, S., Liu, L., Liu, T. & Wu, Y. (2011). E-cadherin can be expressed by a small population of rat

undifferentiated spermatogonia *in vivo* and *in vitro*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 47(8):593-600.

Investigation of Spermatogonial Stem Cells in Adherent and Non-Adherent Culture

Azizi H.[1], Shahverdi A.H.[2] and Abasalt Hosseinzadeh Collagar[3]

[1] Biotechnology Dept., Amol University of Special Modern Technologies, Amol, I.R. of Iran

[2] Stem Cells and Developmental Biology Dept., Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Tehran, I.R. of Iran

[3] Molecular and Cell Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

Abstract

Spermatogonial stem cells are the undifferentiated cells in the basal membrane of the seminiferous tubules and are able to produce sperm in male testis. Different experimental studies proved the capatility of undifferentiated spermatogonial stem cells to culture under different conditions, after isolation of the testes. In this study mouse neonate testicular cells (5-7 days-old NMRI strain) isolated by digestive enzymes include Collagenase IV, Dispase and DNAse. Then, approximately 10^6 cells were cultured in both adherent on MEF feeder layer and non-adherent culture system on 1% agarose with condition mediums that contained growth factors. Studies demonstrates that testicular cells cultured in a non-adherent condition (non-adherent colonies) were able to form colonies similar to spermatogonial stem cell colonies in adherent condition (adherent colonies) and clearly expressed germ cell marker. Electron microscope analyses made evident that both types of colonies were similar to localized spermatogonial stem cells on the basement membrane of seminiferous tubules and showed a high nucleus/cytoplasm ratio. Immunocytochemistry assays proved that both of colony expressed germ cell markers β1-Integrin, α6-Integrin and Oct4 positive. Real-time PCR analysis revealed significant differences in the expression of germ cell genes *Oct4*, *Sox-2*, *CD9* and *EPCAM*, between these colonies and somatic cells. On the other hand, high expression of Ki67 in these colonies showed that these cells have proliferative characteristics. These results proved that a non-adherent culture system similar to adherent culture could provide a favorable method for in vitro short-term culture of spermatogonial stem-like cell colonies.

Key words: Spermatogonial stem cells; Germ cell culture; Eexpression of germ cell markers; Ki67 expression