DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4

مقاله پژوهشی

تأثیر فاکتورهای القایی مختلف رشد بر توان رشد، کلون‌زایی و الگوی ژنتیکی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر در شرایط آزمایشگاهی

سمانه پورسعید[۱]، محمد رضا کلباسی[۱*]، سیده نفیسه حسنی[۲]، گرو یوشیزاکی[۳] و حسین بهاروند[۲*]

[۱] ایران، نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، گروه شیلات.

[۲] ایران، تهران، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوینی.

[۳] ژاپن، توکیو، دانشگاه علوم دریایی و تکنولوژی توکیو، گروه زیست شناسی دریا.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

چکیده

کشت سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی، منابع با ارزشی را برای انجام مطالعات پایه‌ای و کاربردی در زمینه بیوتکنولوژی تولیدمثل فراهم می کند. لذا، این مطالعه با هدف بررسی اثر فاکتورهای مختلف رشد بر میزان تکثیر، کلون‌زایی و بیان برخی از ژنهای اختصاصی سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفت. سلولهای اسپرماتوگونی پس از جداسازی از بافت بیضه بچه ماهیان آزاد دریای خزر با استفاده از روش هضم آنزیمی و تخلیص از طریق حذف تمایزی، به مدت چهارده روز در محیط کشت حاوی ترکیبی از فاکتورهای مختلف رشد (bFGF، GDNF، IGF-I، EGF و LIF) کشت یافتند. مساحت کلونیها در روز چهاردهم در هر گروه اندازه‌گیری شد. از رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت برای بررسی کیفی و کمی نشانگر DDX4/VASA در بین گروههای مختلف استفاده گردید. همچنین بیان ژنهای Vasa و Gfrα1 در گروههای مختلف اندازه گیری شدند. اندازه کلونیهای اسپرماتوگونی در گروهی که تحت تاثیر چهار فاکتور رشد (bFGF+GDNF+IGF-1+EGF) قرار داشتند، از سایر گروهها بالاتر بود ($P<۰/۰۰۱$). با این وجود، در حضور LIF، اثر معنی داری بر روی تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی مشاهده نشد. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت نشان داد که کلونیهای سلولی در گروههای مختلف برای نشانگر DDX4/VASA مثبت بودند و به جز گروه LIF اختلاف معنی‌داری در بین سایر گروهها مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). اختلاف معنی داری در سطح بیان ژنهای Vasa و Gfrα1 بین گروههای مختلف آزمایشی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد افزودن فاکتورهای مختلف رشد نوترکیب انسانی اثر معنی‌داری بر تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر در شرایط آزمایشگاهی نداشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول زایای نر، فاکتور رشد، کشت *in vitro*، بیان ژن، *Salmo caspius*.

* نویسندگان مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۹۲۱۷۵۲ ، پست الکترونیکی: mkalbassi@gmail.com و baharvand@royaninstitute.org

مقدمه

سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی پایه و اساس فرآیند اسپرماتوژنز و باروری در ماهیان نر هستند. این سلولها با پتانسیل ویژه خودنوزایی و تمایز به سایر رده‌های سلولهای زایا، تنها سلولهای بنیادی بزرگسالان در بدن هستند که قادرند اطلاعات ژنتیکی را از نسلی به نسل دیگر منتقل کنند. استفاده کاربردی از ویژگیهای این سلولها برای نخستین بار توسط Brinster و همکارانش (۴) بر روی موش ارائه شد که با پیوند تعلیق سلولی از موش

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

هتروژنوس به لوله‌های منی ساز موش عقیم، منجر به اسپرم‌زایی در موش پذیرنده پیوند شدند. موفقیت در پیوند سلولهای اسپرماتوگونی در جوندگان باعث شد که کاربرد آن در سایر علوم از جمله آبزی‌پروری مورد توجه قرار گیرد (۷، ۸، ۱۹، ۲۶، ۲۷ و ۲۸). به طوری که امروزه این سلولها منبع ارزشمندی جهت مطالعات بیولوژیکی فرآیند اسپرم زایی، حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های کمیاب و تولید حیوانات تراریخته از طریق دستورزی ژنتیکی سلولهای زاینده محسوب می‌شوند (۳، ۶، ۱۱ و ۳۵). با این وجود، استفاده از سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی به دلایلی چون تعداد بسیار کم آنها در بافت بیضه و نبود نشانگرهای اختصاصی سطحی برای شناسایی و جداسازی امری دشوار است (۱۷، ۲۰، ۲۲). بنابراین، بکارگیری روشهایی که بتوان این سلولها را به طور خالص و به میزان زیاد تهیه کرد همواره مورد توجه بوده است. اولین قدم برای استفاده از این سلولها دستیابی به یک سیستم کشت بهینه است که در آن سلولها به میزان زیادی تکثیر یافته و به صورت تمایز نیافته باقی بمانند.

در بافت بیضه سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی کاملاً توسط سلولهای سرتولی احاطه شده اند که علاوه بر حمایت فیزیکی و تغذیه‌ای، با ترشح بسیاری از عوامل رشد و سایتوکاین‌ها تعادل بین تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی را تنظیم می‌کند (۵ و ۳۰). به همین منظور محققین در گونه-های مختلف اثر عوامل مختلف رشد را به صورت مجزا و یا ترکیبی بر حفظ و تکثیر سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی مورد بررسی قرار داده‌اند. از جمله فاکتوری که به صورت پاراکرین و یا اتوکرین بر عملکرد سلولهای زایا موثر است و باعث فعال شدن مسیرهای پیام‌رسان داخل سلولی می-شود می‌توان به فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) اشاره کرد که به عنوان یک فاکتور میتوژن توسط بسیاری از سلولهای بافت بیضه تولید می شود (۱۸). مطالعات انجام شده بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان و گورخر ماهی نشان داده است که افزودن bFGF به محیط کشت، خودنوزایی سلولهای اسپرماتوگونی را افزایش می دهد (۹، ۲۱، ۳۱). یکی از فاکتور های مهم دیگر در تکثیر و بقای سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، فاکتور نوروتروفیک مشتق از دودمان سلولی گلیالی (GDNF) می باشد که با اتصال به گیرنده های اختصاصی خود (Gfrα و گیرنده تیروزین کیناز) در سطح سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی باعث پاسخهای درون سلولی می‌شود (۱۰ و ۲۳). مطالعه انجام شده بر روی موش نشان داده است که در غیاب GDNF، سلولهای اسپرماتوگونی مسیر تمایزی را پیش می گیرند، درحالی که مقادیر زیاد به خودنوزایی این سلولهای بنیادی کمک می‌کند (۲۳). علاوه بر عوامل فوق الذکر، فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF) که از پروتئینهای تنظیمی محسوب می شود نیز قادر است رشد، تمایز و بقای سلولها را در بافتها مختلف از جمله بافت بیضه تنظیم کند (۲، ۳۰). Kawasaki و همکارانش (۱۵) با مطالعه بر روی کشت سلولهای اسپرماتوگونی گورخر ماهی نشان دادند که IGF-I در ترکیب با bFGF و GDNF تکثیر سلولهای مذکور را افزایش می‌دهد. یکی دیگر از عوامل رشد، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) است که باعث تقسیم سلولهای اسپرماتوگونی شده و فرآیند تولید استروئید، شکل گیری اسپرم، تقسیم سلولهای لیدیگ و فعالیت سلولهای سرتولی را به دو شکل اتوکرین و یا پاراکرین تنظیم می کند (۲۹). اطلاعات اندکی از اثرات EGF بر میزان تکثیر و بقا سلولهای اسپرماتوگونی ماهیان در دسترس است که در این مورد می‌توان به بررسیهای انجام شده بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان و گورخرماهی اشاره کرد (۱۵، ۲۱ و ۳۲). فاکتور مهار کننده لوکمیا (LIF) یک سایتوکین با اثرات چندگانه تنظیمی بر روی انواع مختلف بافتها و سلولها است که به منظور القاء تکثیر و افزایش توان زیستی سلولهای بنیادی به محیط کشت اختصاصی افزوده می‌شود (۱۲-۱۱، ۳۶). اثرات مثبت LIF در خودنوزایی و حفظ بقای سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی گورخرماهی گزارش شده است (۳۷). با این وجود، افزودن LIF نوترکیب قزل‌آلای رنگین‌کمان به محیط

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

کشت، اثری بر تکثیر و زنده‌مانی سلولهای اسپرماتوگونی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت (۳۲). علی‌رغم مطالعات انجام شده، هنوز اطلاعات اندکی از محیط کشت مناسب برای حفظ و تکثیر سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ماهی در دسترس است و با توجه به تفاوتهای بین گونه‌ای هنوز ابهامات زیادی باقی مانده است.

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) یک گونه بومی و با ارزش از نظر اکولوژی و اقتصادی محسوب می شود که در سالهای اخیر ذخایر آن در دریای خزر به دلیل آلودگی دریاها و منابع آبی، موانع موجود در مسیر مهاجرت از دریا به رودخانه به هنگام تخم ریزی، ورود فاضلابهای شهری به آب رودخانه و همچنین حضور صیادان غیر مجاز در معرض تهدید قرار گرفته است. بنابراین حفاظت از ذخایر ژنتیکی این گونه امری مهم و ضروری است. پیوند سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی و تولید ماهی کایمر، تکنیک نسبتا جدیدی در حوزه حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان محسوب می شود که موفقیت آن به میزان زیادی به تعداد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در تعلیق سلولی در زمان پیوند بستگی دارد (۳، ۶). لذا به منظور تکثیر سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی و دستیابی به تعداد قابل ملاحظه از سلولها با هدف نهایی تولید ماهی کایمر، مطالعه حاضر به بررسی اثر فاکتورهای مختلف رشد (bFGF، GDNF، IGF-I، EGF و LIF) بر میزان رشد، کلون‌زایی و الگوی ژنتیکی سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر در شرایط آزمایشگاهی می‌پردازد.

مواد و روشها

گونه مورد مطالعه: مطالعه حاضر روی ۸۰ قطعه ماهی آزاد نر ۸ ماهه (نابالغ) با شاخص گنادوسوماتیک کمتر از ۰/۰۸ درصد و میانگین وزنی ۰/۲ ± ۵/۹ (میانگین ± خطای استاندارد) گرم و میانگین طولی ۰/۱ ± ۹/۱ سانتیمتر انجام شد. آزاد ماهیان مورد استفاده در این مطالعه از مرکز تکثیر و پروش شهید باهنر (کلاردشت، مازندران، ایران) تهیه شدند. ماهیان در پژوهشکده سلولهای بنیادی پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) در مخازن پلاستیکی با ظرفیت ۲۰۰ لیتر با هوادهی دائم نگهداری شدند. در طی این دوره دمای آب به طور پیوسته ۱۰ درجه سانتی گراد بود. ماهیان تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ماهیان در طول نگهداری یک نوبت در روز با استفاده از غذای تجاری فرادانه (شهرکرد، ایران) به صورت دستی غذادهی شدند. ۹۶ ساعت قبل از شروع آزمایش، غذادهی به ماهیان متوقف شد.

جداسازی و کشت سلولهای اسپرماتوگونی: برای جداسازی سلولها، ابتدا ماهیان با دُز بالای روغن گل میخک (باریج، کاشان، ایران) کشته شدند و تحت شرایط استریل بافت بیضه آنها خارج شد. بعد از شستشو با محول بافر فسفات (PBS) حاوی آنتی بیوتیک (پنی سیلین با غلظت ۱۰۰ واحد به ازای هر میلی لیتر، استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر و جنتامایسین با غلظت ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر)، بافت بیضه در محلول آنزیمی کلاژناز نوع IV (Gibco) با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر به طور مکانیکی قطعه قطعه شدند. سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت هضم بیشتر و جدا کردن سلولها از لوبولها، پس از شستشو با محلول PBS مرحله دوم هضم آنزیمی با تریپسین ۰/۲۵ درصد (Invitrogen) به مدت ۳۰ دقیقه تحت همان شرایط انجام شد. سپس با استفاده از محیط کشت Leibowitz's L-15 (Sigma-Aldrich; L15) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS, Hyclone™)، آنزیم تریپسین خنثی گردید. سوسپانسیون سلولی حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور g ۳۰۰ در دمای ۱۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون سلولی بدست آمده حاوی سلولهای اسپرماتوگونی، سرتولی و فیبروبلاست بود. به منظور تخلیص سلولهای اسپرماتوگونی بنیادی از روش حذف تمایزی استفاده شد (۳۲). تعلیق سلولی حاضر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد در ظروف کشت ۴۸

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

خانه پوشیده با ژلاتین ۱ درصد کشت یافتند. پس از طی زمان انکوباسیون، سلولهای آزاد در تعلیق جمع‌آوری و به ظروف جدید ۴۸ خانه پوشیده با ژلاتین ۱ درصد انتقال یافتند.

فاکتورهای رشد مورد مطالعه: بعد از جداسازی، سلولها در محیط کشت مخصوص سلولهای اسپرماتوگونی (جدول ۱) همراه با فاکتورهای رشد به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. در طی این مدت، تعویض محیط کشت سلولها هر ۳ روز یکبار انجام شد.

جدول ۱- ترکیبات و غلظت مواد موجود در محیط کشت سلولهای اسپرماتوگونی.

نام ماده	غلظت نهایی در محیط کشت	شرکت سازنده
L-15	pH= ۷/۸	Sigma-Aldrich
Hepes	۲۰mM	Sigma-Aldrich
FBS	٪ ۱	Hyclone™
Bovine insulin	۲۵µg/ml	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	٪ ۰/۵	Sigma-Aldrich
MEM non-essential amino acids	۱۰ µl/ml	Invitrogen
Ascorbic acid	۵۰µM	Sigma-Aldrich
Adenosine	۲۰۰µM	Sigma-Aldrich
GlutaMAX	۲ mM	Invitrogen
2-mercaptoethanol	۱۰۰µM	Sigma-Aldrich
Penicillin	۱۰۰ U/ml	Invitrogen
Streptomycin	۱۰۰ µg/ml	Invitrogen

فاکتورهای رشد و غلظتهای مورد استفاده بر اساس تأثیر مثبتی که بر بقا و تکثیر سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در سایر گونه‌ها داشتند، انتخاب شدند (۱۳، ۱۶ و ۲۵). برای انجام این مطالعه شش گروه آزمایشی (گروه کنترل و گروههای حاوی فاکتور رشد) به شرح ذیل و سه تکرار برای هر گروه در نظر گرفته شد:

۱- گروه کنترل (N): در گروه کنترل محیط کشت فاقد هرگونه فاکتور رشدی بود.

۲- گروه bFGF (B): محیط کشت حاوی فاکتور رشد bFGF نوترکیب انسانی (Royan, Iran) با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر بود.

۳- گروه bFGF و GDNF (BG): محیط کشت حاوی دو فاکتور رشد bFGF با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر و GDNF نوترکیب انسانی (R&D, USA) با غلظت ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر بود.

۴- گروه bFGF، GDNF و IGF-I (BGI): IGF-I نوترکیب انسانی (Royan, Iran) با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر به ترکیب BG اضافه گردید.

۵- گروه bFGF، GDNF، IGF-I و EGF (BGIE): EGF نوترکیب انسانی (Royan, Iran) با غلظت ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر به ترکیب BGI اضافه گردید.

۶- گروه bFGF، GDNF، IGF-I، EGF و LIF (BGIEL): LIF نوترکیب موشی (Royan, Iran) با غلظت ۱۰۰۰ واحد در میلی لیتر به ترکیب BGIE اضافه شد.

ارزیابی ریخت‌شناسی سلولهای کشت شده و کلون‌زایی در سلولهای اسپرماتوگونی: به منظور ارزیابی اثر فاکتور-های رشد، میزان تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی با استفاده از

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

ارزیابی کلونزایی بررسی شد. به این منظور ریخت‌شناسی سلولها به صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ معکوس مدل CKX41 (Olympus, Philippines) مجهز به دوربین تصویر برداری مدل DP72 (Olympus, Japan) ارزیابی شد. از کلونیها مشتق شده از سلولهای اسپرماتوگونی تصویر تهیه شد و مساحت کلونیها توسط نرم افزار Adobe Photoshop CS5 اندازه‌گیری شد (۳۲).

تأیید ماهیت سلولهای اسپرماتوگونی با روش ایمنوسیتوشیمی: برای تأیید ماهیت سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، بیان پروتئین سطحی DDX4/VASA که نشانگر اختصاصی سلولهای زایاست، مطابق روش Lacerda و همکاران ارزیابی شد (۲۰). بدین ترتیب که پس از مرحله تثبیت، تسهیل نفوذ پذیری آنتی‌بادی و حذف اتصالات غیر اختصاصی، به نمونه‌ها آنتی بادی اولیه DDX4/VASA (Rabbit anti-DDX4/VASA; GeneTex, USA) با رقت ۱/۳۰۰ اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از شستشو، به نمونه‌ها آنتی بادی ثانویه (FITC conjugated anti-rabbit IgG; Invitrogen, USA) با رقت ۱/۵۰۰ به سلولها اضافه شد. پس از شستشو، هسته سلولها به مدت یک دقیقه با DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) رنگ آمیزی شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس مجهز به دوربین عکسبرداری شدند. عکسهای منتخب توسط Adobe Photoshop CS5 با یکدیگر ادغام شدند. برای تعیین درصد سلولهای مثبت، نواحی مختلف یک پلیت کشت به طور تصادفی انتخاب، عکسبرداری و سپس شمارش شد. نسبت سلولهای مثبت به کل سلولها به عنوان شاخص مقایسه‌ای بین گروههای مختلف انتخاب شد.

بررسی مولکولی سلولهای اسپرماتوگونی با روش Real-Time RT-PCR: بررسی بیان ژنهای اختصاصی سلولهای اسپرماتوگونی (Vasa و Gfrα1) در ۱۴ روز پس از کشت در گروههای مختلف مورد مطالعه انجام شد. RNA از سلولهای کشت یافته (حداقل سه تکرار زیستی برای هر گروه) مطابق دستورالعمل کیت Nucleospin® RNA XS (Macherey-Nagel, Düren, Germany) استخراج شد. ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر هگزامر تصادفی و کیت RevertAidTM H Minus First Strand cDNA synthesis (Thermo Scientific, USA) انجام شد. واکنش Real-Time RT-PCR با cDNA سنتز شده، آغازگرهای پیشرو و معکوس اختصاصی برای هر ژن (جدول ۲) و سایبرگرین (Takara, Japan) در طی ۴۰ چرخه با استفاده از دستگاه StepOne Plus thermocycler ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام شد. ژن هدف در هر نمونه با ژن مرجع (β-actin) نرمال سازی شد. بیان ژن در گروه کنترل به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. سپس بیان نسبی ژنها با روش $^{-\Delta\Delta CT}$۲ محاسبه شد (۳۸).

تجزیه و تحلیل آماری: ابتدا نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمونها Shapiro-Wilk و همگنی واریانسها با استفاده از آزمون Levens بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه معنی‌داری بین میانگینها، از آزمون چند دامنه Tukey در سطح اعتماد ۵ درصد استفاده شد. از نرم افزار SPSS (Chicago, IL, USA, version 15) برای آنالیز آماری داده ها و از Excel (Microsoft, USA, version 10) برای رسم نمودار استفاده شد. داده‌های درون متن به صورت میانگین ± خطای معیار (SE) بیان شده‌اند.

نتایج

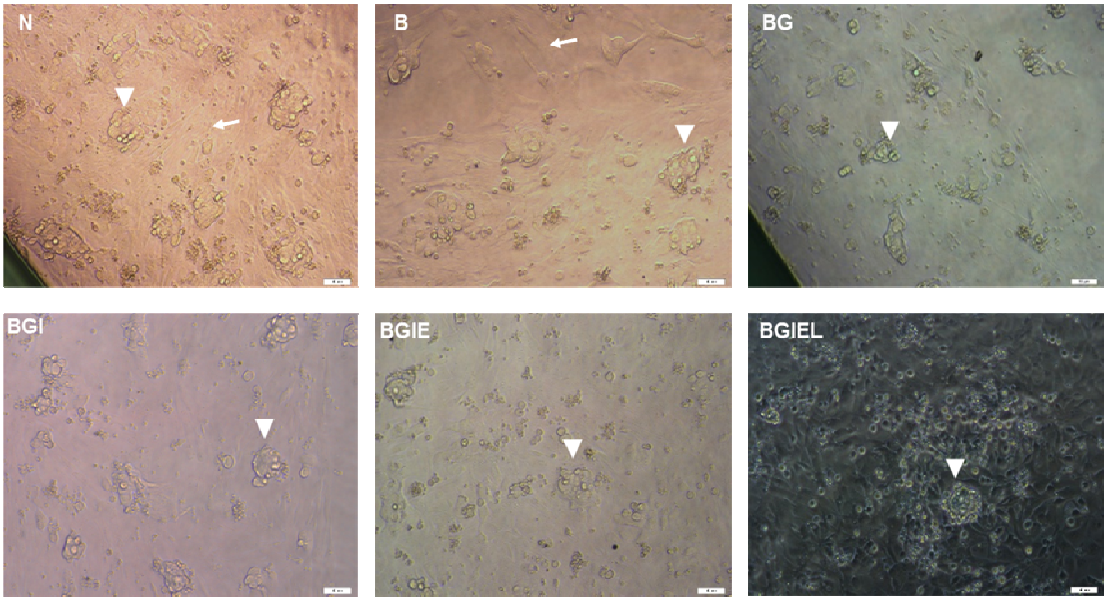
ارزیابی ریخت‌شناسی سلولهای کشت یافته: پس از جداسازی سلولها از بافت بیضه طی هضم مکانیکی و دو مرحله هضم آنزیمی، تعلیق سلولی حاصل به مدت ۱۴ روز در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد بر روی بستر ژلاتین کشت یافتند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده جهت بررسی بیان ژنهای Vasa و Gfrα1.

نام آغازگر	توالی	کد بانک ژن
Vasa- F	5′-TGGTGGAGGAGGCGGCTTCAG-3′	KX098658
Vasa-R	5′-ACCACCCTCCCCATCCATG-3′	
Gfrα-1-F	5′- AAGCAGAGCCCCCTGTATAA -3′	MH475923
Gfrα-1-R	5′- GCCAGTCGGAATATGTCAGA -3′	
β-actin-F	5′-GATCTGGCATCACACCTTCTAC -3′	EF406272.1
β-actin-R	5′-GCCAGTCGGAATATGTCAGA -3′	

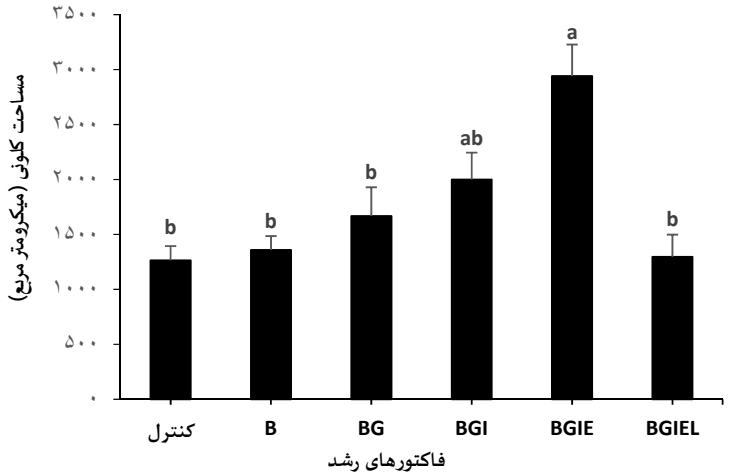
سلولهای سوماتیک عمدتاً با ساختار دوکی شکل و یا ساختار مدور با زوائد سیتوپلاسمی کشیده مشخص بودند. این سلولها به صورت یک لایه به کف پلیت کشت متصل شدند در حالی که سلولهای اسپرماتوگونی با ساختار مدور بر روی سلولهای سوماتیک و یا در لابه‌لای آنها قرار گرفتند و کلونی ایجاد کردند (شکل ۱). از نظر ریخت-شناسی، افزودن فاکتورهای رشد bFGF و GDNF تأثیر معنی داری بر روی روند کشت سلولها نداشت. در حالی که افزودن فاکتورهای رشد IGF و EGF باعث شد که سرعت رشد سلولهای سوماتیک در مقایسه با سایر گروهها افزایش یابد. بررسیها میکروسکوپی نشان داد زمانی که فاکتور رشد LIF به محیط کشت اضافه می‌شود رشد سلولها در مقایسه با گروههای دیگر کاهش می‌یابد.



شکل ۱- کشت اولیه سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر تحت تأثیر فاکتورهای رشد ۱۴ روز بعد از جداسازی. N: محیط کشت فاقد فاکتور رشد، B: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml)، BG: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml) و GDNF (۲۰ ng/ml)، BGI: IGF (۱۰ ng/ml) به محیط BG اضافه شد، BGIE: EGF (۲۰ ng/ml) به محیط BGI اضافه شد و BGIEL: LIF (۱۰۰۰ U/ml) به محیط BGIE اضافه شد. سر پیکان نشان‌دهنده کلونیهای اسپرماتوگونی و پیکان نشان‌دهنده سلولهای سوماتیک است. بزرگنمایی ۲۰۰. مقیاس برابر ۵۰ میکرومتر (تکرار زیستی ۶= n).

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

نتایج حاصل از بررسی کمی کلون‌زایی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی: با افزودن فاکتورهای مختلف رشد به محیط کشت سایز کلونیهای اسپرماتوگونی افزایش یافت به طوری که بیشترین رشد سلولها در گروه BGIE مشاهده شد که مساحت کلونیها در این گروه تقریباً ۲/۵ برابر گروه کنترل بود ($P< ۰/۰۰۱$). با این وجود، افزودن فاکتور رشد LIF به ترکیب BGIE تأثیری بر رشد سلولها نداشت (شکل ۲).



شکل ۲- اثر فاکتورهای رشد بر توان کلون زایی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر. کنترل: محیط کشت فاقد فاکتور رشد، B: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml)، BG: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml) و GDNF (۲۰ ng/ml)، BGI: IGF (۱۰ ng/ml) به محیط BG اضافه شد، BGIE: EGF (۲۰ ng/ml) به محیط BGI اضافه شد و BGIEL: LIF (۱۰۰۰ U/ml) به محیط BGIE اضافه شد. حروف a و b بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگینها در گروههای مختلف کشت است ($P< ۰/۰۵$). ستونهای دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی دار هستند ($P> ۰/۰۵$). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده اند (تکرار زیستی n =۳).

نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی: کلونیهای در گروههای آزمایشی مختلف برای نشانگر DDX4/VASA مثبت بودند و پروتئین مذکور در سیتوپلاسم سلولهای اسپرماتوگونی بیان می‌شود (شکل ۳).

کمی سازی میزان بیان پروتئین DDX4/VASA نشان داد که افزودن فاکتورهای مختلف رشد اثر معنی‌داری بر تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی نداشت و صرفاً در گروهی که فاکتور رشد LIF افزوده شد اثر منفی بر میزان بیان مشاهده شد به طوری که شدت بیان این پروتئین به نصف کاهش یافت و به طور معنی داری از سایر گروه‌های آزمایشی کمتر بود (شکل ۴؛ $P< ۰/۰۰۱$).

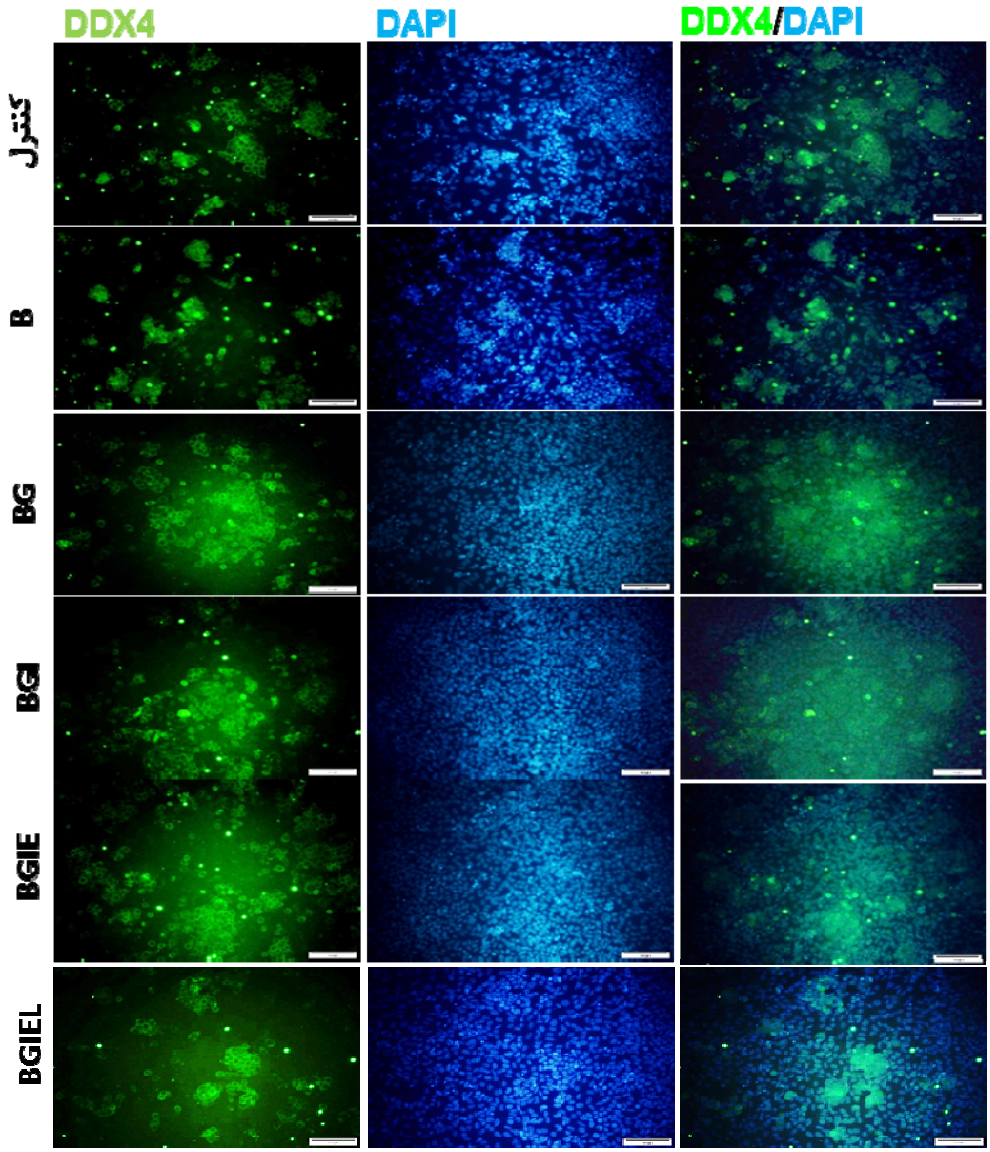
نتایج حاصل از مقایسه بیان ژنهای اختصاصی سلولهای اسپرماتوگونی در گروههای مختلف: با وجود اینکه میزان بیان ژن Vasa در گروه‌های فاکتور رشد از گروه کنترل بالاتر بود اما اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۵؛ $P> ۰/۰۵$). روند مشخص و معنی‌داری در شدت بیان ژن Gfrα1 در گروه‌های مختلف فاکتور رشد مشاهده نشد ($P> ۰/۰۵$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد با وجود اینکه سایز کلونیها در گروه تحت تیمار شده با فاکتور رشد ترکیبی BGIE به مراتب بالاتر از سایر گروههای آزمایشی بود، اما اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژنهای زایا و میزان بیان پروتئین DDX4/VASA مشاهده نشد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4

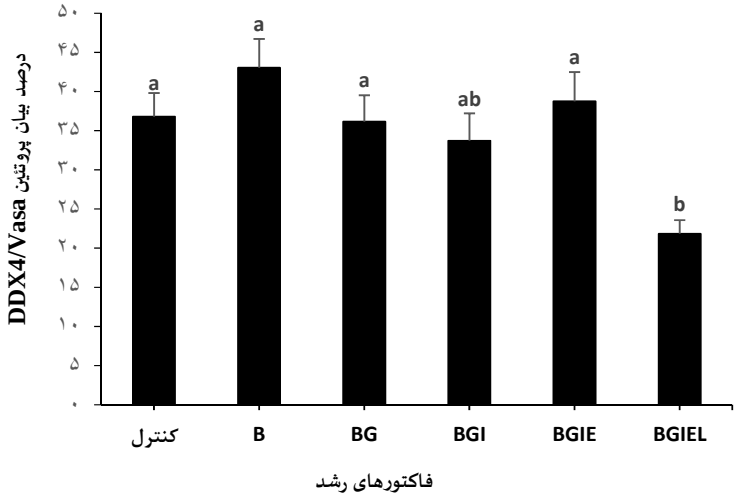
مقاله پژوهشی



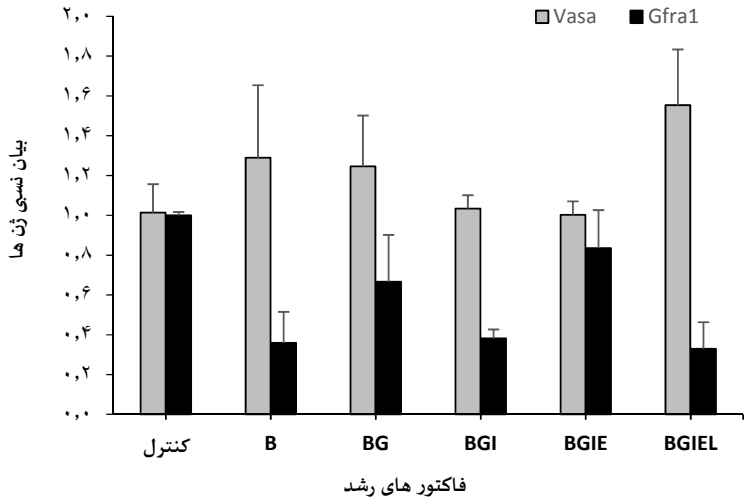
شکل ۳- اثر فاکتورهای رشد بر بیان پروتئین DDX4/VASA سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر. ستون اول از سمت چپ تصاویر مربوط به رنگ آمیزی با نشانگرهای اختصاصی، ستون دوم تصاویر مربوط به رنگ آمیزی هسته‌ای با استفاده از DAPI و ستون سوم از سمت چپ تصاویر تلفیق شده رنگ آمیزی مربوط به نشانگر اختصاصی و DAPI است. ردیف اول: تصاویر گروه کنترل (محیط کشت فاقد فاکتور رشد)، ردیف دوم (B): تصاویر محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml)، ردیف سوم (BG): تصاویر محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml) و GDNF (۲۰ ng/ml)، ردیف چهارم (BGI): تصاویر محیط کشت IGF (۱۰ ng/ml) همراه با BG، ردیف پنجم (BGIE): تصاویر محیط کشت EGF (۲۰ ng/ml) همراه با BGI و ردیف ششم (BGIEL): تصاویر محیط کشت LIF (۱۰۰۰ U/ml) همراه با BGIE.. بزرگنمایی ۲۰۰. مقیاس برابر ۵۰ میکرومتر. (تکرار زیستی n =۳).

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4

مقاله پژوهشی



شکل ۴- اثر فاکتورهای رشد بر میزان بیان پروتئین DDX4/VASA در سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر. کنترل: محیط کشت فاقد فاکتور رشد، B: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml)، BG: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml) و GDNF (۲۰ ng/ml)، BGI: محیط کشت IGF (۱۰ ng/ml) همراه با BG، BGIE: محیط کشت EGF (۲۰ ng/ml) همراه با BGI و BGIEL: محیط کشت LIF (۱۰۰۰ U/ml) همراه با BGIE. حروف a و b بیانگر اختلاف معنی‌دار بین میانگینها در گروههای مختلف کشت است ($P< ۰/۰۵$). ستونهای دارای یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی دار هستند ($P> ۰/۰۵$). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده اند (تکرار زیستی ۳= n).



شکل ۵- اثر فاکتورهای رشد بر بیان ژن Vasa و Gfrα1 در سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر. نرمال سازی سطوح بیان بر پایه β-actin به عنوان ژن کنترل داخلی و متعادل سازی بر پایه گروه کنترل (فاقد فاکتورهای رشد) اجرا شد. کنترل: محیط کشت فاقد فاکتور رشد، B: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml)، BG: محیط کشت حاوی bFGF (۱۰ ng/ml) و GDNF (۲۰ ng/ml)، BGI: IGF (۱۰ ng/ml) به محیط BG اضافه شد، BGIE: EGF (۲۰ ng/ml) به محیط BGI اضافه شد و BGIEL: LIF (۱۰۰۰ U/ml) به محیط BGIE اضافه شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده اند (تکرار زیستی ۳= n).

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

در مطالعه‌ای مشابه بر روی گورخر ماهی، اثرات سینرژیک چهار فاکتور رشد نوترکیب انسانی (BGIE) با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، در افزایش تعداد سلولهای اسپرماتوگونی گزارش شده بود (۱۵). با این وجود، در مطالعه فوق بین گروههای مختلف آزمایشی از نظر میزان بیان ژنها و پروتئینها مقایسه‌ای انجام نشد و صرفاً به صورت کیفی گزارش گردید که پروتئینهای VASA و سایر پروتئینهای مربوط به سلولهای زایا در کلونیهای اسپرماتوگونی گورخر ماهی بعد از کشت به مدت یک ماه بیان می‌شود.

در مطالعه‌ای بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، اثر فاکتورهای مختلف رشد نظیر bFGF انسانی، GDNF نوترکیب رت، EGF نوترکیب موشی و LIF نوترکیب قزل‌آلای رنگین‌کمان در غلظت‌های متفاوت بر روی بقاء و تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت (۳۲-۳۱). یافته‌های آنها نشان داد که به غیر از bFGF، سایر فاکتورهای رشد به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر اثر معنی‌داری بر بقا و تکثیر سلولها ندارد. اثرات مثبت bFGF بر بقا و فعالیت میتوزی سلولهای اسپرماتوگونی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۹، ۲۱). Hong و همکارانش (۹) با افزودن bFGF با غلظت ۱۰ ng/ml به محیط کشت، توانستند سلولهای اسپرماتوگونی مداکا را به مدت دو سال در شرایط آزمایشگاه نگهداری کنند. این در حالی بود که یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از bFGF با غلظت ۱۰ ng/ml بر روی رشد سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر و بیان ژنهای زایا اثر معنی‌داری ندارد.

گیرنده‌های FGF بر روی سلولهای سوماتیک (سرتولی و لایدیگ) و سلولهای زایا شناسایی شدند (۱۸). بنابراین این فاکتور رشد به طور مستقیم و از طریق اتصال به گیرنده-های خود بر روی سلولهای زایا و با فسفریله کردن مسیر MAPK و AKT، تکثیر میتوزی را افزایش می‌دهد (۱۴) و یا به شکل غیر مستقیم از طریق سلولهای سوماتیک پاسخهای درون سلولی را القا می‌کند. در این مطالعه، میزان رشد سلولهای سوماتیک در گروهی تیمار شده با bFGF بیشتر از گروه کنترل بود. بنابراین به نظر می‌رسد هم‌کشتی سلولهای اسپرماتوگونی با سلول‌سوماتیک باعث شده است که اثرات bFGF بر روی سلولهای زایا نمایان نشود.

مطالعات انجام شده بر روی پستانداران نشان داده است که GDNF فاکتور مهم خودنوزایی SSCs است که با اتصال به گیرنده‌های نظیر خود GFRα باعث القاء پاسخهای درون سلولی می‌شود (۱، ۱۰، ۱۱، ۲۳). با وجود اینکه اثرات سینرژیک GDNF و bFGF در تکثیر SSCs در موش گزارش شده بود (۳۳)، اما در مطالعه حاضر چنین اثری مشاهده نشد. این یافته با مطالعه قبلی بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان که نشان داد GDNF بر فعالیت میتوزی سلولهای اسپرماتوگونی تاثیری ندارد، مطابقت دارد (۳۲). بررسی-های انجام شده بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که بر خلاف پستانداران، GDNF در ماهیان توسط سلولهای سرتولی ترشح نمی‌شود و بیان آن در سلولهای زایا (از اسپرماتوگونی تا اسپرماتوسیت) نشان‌دهنده عملکرد آن به عنوان یک فاکتور اتوکرین در حفظ و تکثیر سلولهای بنیادی زایا است (۲۴). بنابراین نبود اختلاف معنی‌دار بین تیمار BG با سایر گروههای آزمایشی در پارامترهای بررسی شده ممکن است به دلیل عدم نیاز سلولهای اسپرماتوگونی به GDNF موجود در محیط کشت باشد، اما تایید این فرضیه نیازمند به تحقیقات بیشتر در این زمینه با استفاده از GDNF نوترکیب ماهی می‌باشد.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که IGF1 در ترکیب با bFGF و GDNF اثر معنی‌داری بر تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی و میزان بیان ژنهای زایا ندارد. در حالی که Bahadorani و همکارانش (۲) با مطالعه بر روی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی بز بیان کردند که IGF1 اثرات فاکتور-های رشد bFGF و GDNF را در حفظ بنیادی بودن و تکثیر

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

سلولها تشدید می‌کند. بررسی انجام شده بر روی گورخر ماهی نیز نشان داده بود که ترکیب سه فاکتور رشد IGF1، bFGF و GDNF تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی را در محیط کشت افزایش می‌دهد (۱۵). گزارشاتی نیز در مورد نقش IGF1 در تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی قزل‌آلای رنگین-کمان و تیلاپیای نیل در محیط آزمایشگاهی وجود دارد (۲۱، ۳۴). چنین اختلافاتی با نتایج این مطالعه می‌تواند به نوع گونه، دوز مصرفی فاکتورهای رشد و شرایط کشت مرتبط باشد.

افزایش اندازه کلونیها در گروه BGIE در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل تاثیر خاصیت القا کنندگی تقسیم توسط EGF بود. EGF به دو شکل مختلف عمل می‌کند؛ به طور مستقیم با اثر بر روی سلولهای زایا و یا به شکل غیر مستقیم از طریق اثر بر روی سلولهای سرتولی (۲۹). بنابراین با توجه به عدم تغییر در میزان بیان ژنها و بیان پروتئین DDX4/VASA با گروه کنترل به نظر می‌رسد که افزایش اندازه کلونیها به دلیل افزایش در تکثیر سلولهای سوماتیک باشد.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که افزودن LIF به ترکیب BGIE، منجر به کاهش اندازه کلونی‌ها و کاهش تعداد سلول بیان‌کننده پروتئین DDX4/VASA می‌شود. نتایج متناقضی در مورد اثر فاکتور رشد LIF بر روی رشد سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی ماهیان گزارش شده است. Shikina و Yoshizaki (۳۲) با مطالعه بر روی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان دادند که LIF اثری بر بقا و تکثیر سلولهای اسپرماتوگونی‌تمایز نیافته ندارد. در مقابل، مطالعه انجام گرفته بر روی سلولهای اسپرماتوگونی گورخر ماهی نشان داد سلولهایی که بر روی لایه مغذی ترشح کننده دو فاکتور رشد bFGF و LIF و یا ترکیب GDNF و LIF کشت یافته بودند، در مقایسه با گروه کنترل سرعت رشد بیشتری داشتند (۳۷). دلیل قطعی کاهش بیان DDX4/VASA در این مطالعه مشخص نیست اما به نظر می‌رسد LIF اثرات آنتاگونیستی در ترکیب BGIE روی سلولهای اسپرماتوگونی داشته باشد.

به طور کلی، عدم کارآیی فاکتورهای رشد به کار گرفته شده در این مطالعه بر روی سلولهای اسپرماتوگونی ممکن است به دلیل شباهت کم پروتئینهای انسانی با ماهی باشد (۷۷/۳۴ درصد برای bFGF، ۴۵/۸ درصد برای GDNF، ۵۴/۹ درصد برای IGF1 و ۴۴/۵ درصد برای EGF) که با توجه به تکامل مولکولی سریع فاکتورهای رشد (۲۲)، این احتمال وجود دارد که فاکتورهای رشد نوترکیب انسانی نتوانسته باشند به گیرنده‌های خود بر روی سلولهای اسپرماتوگونی ماهی آزاد دریای خزر متصل شوند و مسیر-های پیام رسان درون سلولی را فعال کنند. البته اثرات حضور سلولهای استرومایی بافت بیضه در کشت سلولی و رشد سریع آنها در حضور فاکتورهای مختلف رشد را نمی‌توان نادیده گرفت. از این رو، یکی دیگر از دلایل احتمالی نبود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی را می‌توان به اثرات هم‌کشتی با سلولهای سوماتیک نسبت داد که به نظر می‌رسد در مقایسه با فاکتورهای رشد نوترکیب انسانی تاثیر بیشتری بر روی سلولهای اسپرماتوگونی داشت. بنابراین مطالعات تکمیلی با استفاده از فاکتورهای رشد نوترکیب ماهی آزاد دریای خزر در محیط کشت فاقد سلولهای سوماتیک پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: این مطالعه با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و دانشگاه تربیت مدرس در قالب طرح تحقیقاتی مصوب انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر را به عمل می آورند.

منابع

۱- عزیزی، ح.، شاهوردی، ع.، حسین زاده کلاگر، ا. ۱۳۹۷. بررسی کشت سلولهای بنیادی اسپرم ساز در شرایط چسبنده و غیر چسبنده. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (زیست شناسی ایران). ۳۱ (۳): ۴۸۰-۴۹۷.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4
مقاله پژوهشی

2- Bahadorani M, Hosseini SM, Abedi P, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Glial cell line-derived neurotrophic factor in combination with insulin-like growth factor 1 and basic fibroblast growth factor promote in vitro culture of goat spermatogonial stem cells. Growth Factors. 2015; 33(3):181-191.

3- Bar I, Smith A, Bubner E, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Yazawa R, Chen BN,Cummins S, Elizur A. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. Reprod Fertil Dev.2016; 28(12): 2051-2064.

4- Brinster RL, Avarbock MR. Germ line transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA.1994; 91(24): 11303-11307.

5- Crespo D, Assis LHC, Furmanek T, Bogerd J, Rüdiger W. Schulz RW. Expression profiling identifies Sertoli and Leydig cell genes as Fsh targets in adult zebrafish testis. Mol Cell Endocrinol. 2016; 437(1): 237-251.

6- Higaki S, Shimada M, Kawamoto K, Todo T, Kawasaki T, Tooyama I, Fujioka Y, Sakai N, Takada T. In vitro differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). Sci Rep.2017; 17(7): 42852.

7- Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinsk I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. Biol Reprod. 2003; 69(4): 1260-1264.

8- Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod. 2002; 66(1): 21-28.

9- Hong Y, Liu T, Zhao H, Xu H, Wang W, Liu R, Chen T, Deng J, Gui J. Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(21): 8011-8016.

10- Jijiwa M, Kawai K, Fukihara J, Nakamura A, Hasegawa M, Suzuki C, Sato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. GDNF mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. Genes Cells. 2008; 13(4): 365-374.

11- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. Hum Reprod. 2003; 18(12): 2660-2667.

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

13- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum or feeder-free conditions. Biol Reprod. 2005; 72(4): 985-991.

14- Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. Annu Rev Cell Dev Biol. 2013; 29(1): 163-187.

15- Kawasaki T, Saito K, Sakai C, Shinya M, Sakai N. Production of zebrafish offspring from cultured spermatogonial stem cells. Genes Cells. 2012; 17(4): 316-325.

16- Kim SM, Fujihara M, Sahare M, Minami N, Yamada M, Imai H. Effects of extracellular matrices and lectin Dolichos biflorus agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured in vitro. Reprod Fert Develop. 2014; 26(2): 268-281.

17- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100(11): 6487-6492.

18- Kubota H, Avarbock M, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(47): 16489-16494.

19- Lacerda SM, Batlouni SR, Costa GM, Segatelli TM, Quirino BR, Queiroz BM, Kalapothakis E, França LR. A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. PLoS One, 2010; 5:e10740.

20- Lacerda SM, Costa GM, Silva SM, Campos-Junior AP, Segatelli TM, Peixoto MT, Resende RR, França LR. Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. Gen Com Endocrinol. 2013; 192(1): 95-106

21- Loir M. Spermatogonia of rainbow trout: II. *in vitro* study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. Mol Reprod Dev. 1999; 53(4): 434-442.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4 مقاله پژوهشی

22- Lutfalla G, Crollius RH, Stange-thomann N, Jallion O, Mogensen K, Monneron D. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: The class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. BMC Genomics. 2003; 4(1): 29-44.

23- Meng X, Lindahl M, Hyvonen M, Parvinen M, De Rooij DG, Hess M, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel J, Westphal H, Saarma M, Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science. 2000; 287(5457):1489-1493.

24- Nakajima S, Hayashi M, Kouguchi T, Yamaguchi K, Miwa M, Yoshizaki G. Expression patterns of gdnf and gfrα1 in rainbow trout testis. Gene Expr Patterns. 2014; 14(2):111-120.

25- Nóbrega RH, Morais RD, Crespo D, de Waal PP, de Franca LR, Schulz RW, Bogerd J. Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via Igf3. Endocrinology. 2015; 156(10): 3804-3817.

26- Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(8): 2725-2729.

27- Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*. 2007; 317(5844): 1517.

28- Panda RP, Barman HK, Mohapatra C. Isolation of enriched carp spermatogonial stem cells from *Labeo rohita* testis for in vitro propagation. Theriogenology. 2011; 76(2): 241-251.

29- Radhakrishnan B, Oke BO, Papadopoulos V, DiAugustine RP, Suarez-Quian CA. Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. Endocrinology. 1992; 131(6): 3091-3099.

30- Schulz RW, França LRD, Lareyre JJ, Le Gac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. Gen Com Endocrinol. 2010; 165(3): 390-411.

31- Shikina S, Ihara S, Yoshizaki G. Culture conditions for maintaining the survival and mitotic activity of rainbow trout transplantable type A spermatogonia. Mol Reprod Dev. 2008; 75(3):529-537.

32- Shikina S, Yoshizaki G. Improved in vitro culture conditions to enhance the survival, mitotic activity, and transplantability of rainbow trout type a spermatogonia. Biol Reprod. 2010; 83(2): 268-276.

33- Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Takashi T, Morimoto H, Inoue K, Ogonuki N, Takashi M, Ogura A, Shinohara T. Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem Cell self-renewal. Stem Cell Reports. 2015; 4(3): 489-450.

34- Tokalov SV, Gutzeit HO. Spermatogenesis in testis primary cell cultures of the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dev Dyn. 2005; 223(4): 1238-1247.

35- Tonelli FMP, Lacerda SMSN, Paiva NCO, Lemos MS, de Jesus AC, Pacheco FG, Correa Junior JD, Ladeira LO, Furtado CA, França LR, Resende RR. Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials. RSC Advances.2016; 6(58): 52636-52641.

36- Wang P, Suo LJ, Wang YF, Shang H, Li GX, Hu JH, Li QW. Effects of GDNF and LIF on mouse spermatogonial stem cells proliferation in vitro. Cytotechnology. 2014; 66(2): 309-316.

37- Wong T, Collodi P. Effects of specific and prolonged expression of zebrafish growth factors, Fgf2 and Lif in primordial germ cells in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 430 (1): 347-351.

38- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics. 2006; 7(1): 85.

مقاله پژوهشی DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.3.4

The effects of different growth factors on proliferation, colonization and gene expression of Caspian trout spermatogonial stem cells in vitro

Poursaeid S.[1], Kalbassi M.R.[1*], Hassani S.N.[2], Yoshizaki G.[3] and Baharvand H.[2*]

[1] Dept. of Fisheries, School of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran.

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

[3] Dept. of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan.

Abstract

In vitro culture of spermatogonial stem cells provides valuable sources of cells for both basic and applied studies related to reproductive biotechnology. Therefore, the present study aimed to examine the effect of different growth factors on Caspian trout spermatogonial cell proliferation, colony formation and germ cell specific gene expression. Spermatogonial cells after isolation from testes of juvenile male Caspian trout by two enzymatic digestion methods and purification by differential plating technique were cultured with different growth factors (bFGF, GDNF, IGF-I, EGF and LIF) for 14 days. The area of colony was measured in all experimental groups at day 14. Immunofluorescence staining was used for qualitative and quantitative evaluations of DDX4/VASA-positive cells. Also, the expression levels of Vasa and Gfrα1 were assessed in the experimental groups. Spermatogonial cells treated with a combination of growth factors bFGF, GDNF, IGF-1 and EGF had a positive effect on the area of colonies ($P< 0.001$). However, in the presence of LIF, no considerable effect detected on the spermatogonial cell proliferation. Immunofluorescence staining showed spermatogonial colonies were positive for germ cell-specific marker. With the exception of LIF-treated group, no significant difference was observed in the number of DDX4/VASA-positive spermatogonial cells among the experimental groups ($P>0.05$). A combination of growth factors did not have detectable effects on the expression levels of Vasa and Gfrα1 ($P>0.05$). The findings indicated that recombinant human growth factors have no significant effects on the *in vitro* proliferation of Caspian trout spermatogonia.

Keywords: Male germ cell, Growth factors, *in vitro* culture, Gene expression, *Salmo caspius*.