

The Effect of Laminin and Gelatin Extracellular Matrix on Short-term Cultivation of Neonate Mouse Spermatogonial Stem Cells

***Tavakolifar F., M.Sc., Shahverdi A., Ph.D., Pirouz M., M.Sc., Shakeri M.,
Koruji M., Ph.D., Baharvand H., Ph.D.****

** P.O.Box:19395-4644, Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: To compare the effect of laminin and gelatin on short-term culture of spermatogonial stem cells (SSCs) from neonatal mouse testes.

Materials and Methods: Cell suspension containing SSCs were isolated from testes of 6 day-old mice and cultured in the presence of Glial-derived neurotrophic factor (GDNF), Epidermal Growth Factor (EGF) and Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF) on laminin- and gelatin- coated plates for 9 days. Number and area of colonies were measured in 5th, 7th and 9th days after culturing. At 9th day Immunostaining was used to detect expression of SSC markers, $\alpha 6$ -Integrin and $\beta 1$ -Integrin. moreover, the colonies were harvested and the percentage of $\alpha 6$ -Integrin and $\beta 1$ -Integrin positive cells was assessed by flowcytometry in both groups.

Results: Immunostaining analysis showed that our culture system contained SSC colonies as they were positive for $\alpha 6$ -Integrin and $\beta 1$ -Integrin. Additionally, the number of colonies those were formed on laminin were significantly higher in comparison with those of other group. but colony area was higher on gelatin. There was no significant difference in percentage of cells that expressed $\alpha 6$ -Integrin, $\beta 1$ -Integrin detected by flowcytometry in both groups.

Conclusion: laminin as extracellular matrix cause to increase the number of neonate spermatogonial colonies and decrease the area of them ($P \leq 0.05$).

Keywords: Neonatal mouse, Spermatogonial stem cell, Laminin, Gelatin

تأثیر ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین بر کشت کوتاه مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش

فرانک توکلی فر M.Sc.***، عبدالحسین شاهوردی Ph.D.***، مهدی پیروز M.Sc.*، ملک شاکری سید مرتضی کروجی Ph.D.***، حسین بهاروند Ph.D.***

* گروه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان، تهران، ایران
 ** گروه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
 *** گروه جنین‌شناسی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان، تهران، ایران
 **** گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، تهران، ایران
 ***** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
 تاریخ وصول: اسفند ماه ۱۳۸۸، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۹

چکیده

هدف: مقایسه اثر ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین بر کشت کوتاه مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش

مواد و روش‌ها: سوسپانسیون حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) از بیضه موش ۶ روزه جدا شده و در ظروف کشت پوشیده با لامینین و ژلاتین که از قبل آماده شده بود، به‌طور جداگانه در حضور فاکتورهای رشد (Glial derived GDNF) (neurotrophic factor) EGF، (Epidermal Growth Factor) و (Basic Fibroblastic Growth Factor) bFGF به مدت نه روز کشت شد. تعداد کلونی‌های SSC تشکیل شده و مساحت آن‌ها در روزهای پنجم، هفتم و نهم در هر گروه اندازه‌گیری شد، همچنین در روز نهم پس از کشت از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای بررسی کیفی بیان نشانگرهای $\alpha 6$ -Integrin، $\beta 1$ -Integrin در هر دو گروه استفاده شد و درصد بیان نشانگرهای فوق با استفاده از آزمون فلوسایتومتری مقایسه شد.

یافته‌ها: رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت نشان داد که کلونی‌ها متشکل از SSCs و برای نشانگرهای $\alpha 6$ -Integrin / $\beta 1$ -Integrin مثبت بود. تعداد کلونی‌های ایجادشده روی ظروف کشت پوشیده با لامینین به‌طور معنی‌داری نسبت به ظروف کشت پوشیده با ژلاتین بیشتر بود، درحالی‌که مساحت کلونی‌ها در گروه لامینین کاهش معنی‌داری نسبت به گروه ژلاتین داشت. براساس نتایج فلوسایتومتری درصد سلول‌های بیان‌کننده این ژن‌ها طی کشت در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشتند.

نتیجه‌گیری: استفاده از ماتریکس برون سلولی لامینین در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی نوزاد موش به صورت معنی‌داری موجب افزایش تعداد کلونی‌های SSC و در عین حال کاهش مساحت آن‌ها می‌شود ($p \leq 0.05$).

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، نوزاد موش، لامینین، ژلاتین

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه

سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

Email: Baharvand@RoyanInstitute.org

مقدمه

مطالعه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) اساس مطالعات اسپرماتوژنیز و یافتن راه درمانی برای ناباروری‌های مردان است، امروزه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، انجماد و پیوند آن‌ها راه جدیدی است که به کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل مؤثر در ناباروری را بهتر بررسی نمود [۱] بنابراین دانستن مکانیسم قابلیت‌های این نوع سلول‌ها اعم از خودنوزایی و تمایز به اسپرم ضروری است. به علاوه آن‌ها هدف مناسبی برای دستکاری‌های ژنتیکی و تحقیقات درمانی و آزمایش‌های بیولوژیکی محسوب می‌شوند. شناخت فرآیند اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه و در بدن بسیار اهمیت دارد، زیرا دانستن این فرآیند می‌تواند به درمان افراد نابارور و افرادی که در اثر شیمی‌درمانی و پرتو درمانی عقیم می‌شوند کمک کند. در عین حال آن‌ها تنها گروه از سلول‌های بنیادی بالغ هستند که می‌توانند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل کنند [۲، ۳]. بیشتر نشانگرهای شناخته شده برای SSCs به‌وسیله سایر اسپرماتوگونی‌ها نیز بیان می‌شود [۴، ۵]، هر چند بیان بعضی از نشانگرها به اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته محدود شده است [۱، ۶]. با توجه به تعداد بسیار کم SSCs در بین جمعیت سلول‌های موجود در بیضه (حدود یک سلول در ازای هر ۳۰۰۰ سلول موجود در بیضه موش بالغ [۷]) کلونیزاسیون سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه دارای اهمیت زیادی است؛ زیرا به کمک آن می‌توان سلول‌های اسپرماتوگونی را خالص‌سازی و غنی‌سازی کرد. راه‌های مختلفی برای خلوص بالاتر سلول‌ها برای کشت سلول‌های SSC به کار گرفته شده است؛ مانند انتخاب فاکتورهای رشد و به‌کارگیری بسترهای کشت متفاوت و ماتریکس‌های برون سلولی مختلف [۸]. در این بین یکی از راه‌های خالص‌سازی SSCها از بین جمعیت سلول‌های موجود در بیضه، بر پایه نشانگرهای آن‌ها ($\alpha 6$ - integrin / $\beta 1$ - integrin...) استوار است [۹]. شینوها (Shinohara) در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار نشانگرهای $\alpha 6$ -Integrin و $\beta 1$ - Integrin را نشانگرهای سطحی

SSCs معرفی کرد [۹]. او همچنین در سال ۲۰۰۸ Integrin $\beta 1$ - را نشانگر اصلی SSCs معرفی کرد که نقش اساسی در جایگیری SSCs در مجاورت غشای پایه لوله‌های منی ساز دارد [۱۰]. علاوه بر این تقابل، ارتباط بین SSCs و محیط احاطه‌کننده آن‌ها نیز در لوله‌های اسپرم ساز (Seminiferous Tubules) موجب تنظیم فعالیت بیولوژیکی سلول‌های مذکور می‌شود [۱۱]. در همین رابطه اهمیت مولکول‌های تشکیل‌دهنده ماتریکس برون سلولی از دیدگاه بیولوژیکی در تکامل و رشد سلول در مطالعات آزمایشگاهی به‌خوبی نشان داده شده است. به علاوه دیده شده است که لامینین در افزایش تکثیر SSCs در محیط آزمایشگاهی مؤثر است [۱۲، ۱۳]. یکی دیگر از مولکول‌های تشکیل‌دهنده ماتریکس برون سلولی کلاژن است که با نسبت فراوان در بافت‌های مختلف وجود دارد [۱۴]. با توجه به اینکه ژلاتین به لحاظ ترکیبات بسیار شبیه به کلاژن است و همچنین کار با ژلاتین بسیار راحت‌تر از کلاژن است، این ماتریکس در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مورد توجه خاص قرار گرفته است [۱، ۱۵]. استفاده از سلول‌های $\alpha 6$ - integrin+ / $\beta 1$ - integrin+ به‌منظور خالص‌سازی SSC ها و بهبود شرایط کشت آن‌ها مفید خواهد بود. با توجه به اینکه مقایسه اثر ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین در کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تا کنون گزارش نشده است، در این مطالعه اثر ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین در کشت کوتاه مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شد تا با تعیین ماتریکس برون سلولی مناسب که نقش مؤثرتری در خالص‌سازی SSCها و حفظ خصوصیات سلول‌های بنیادی داشته باشد، به روش کشت مناسبی برای خالص‌سازی و تکثیر SSCs دست یابیم که خود گام اساسی نخست برای مطالعات پیشرفته بر پایه حفظ خصوصیات بنیادی سلول‌های اسپرماتوگونی، القای تمایز به اسپرم در محیط آزمایشگاهی یا القای خاصیت پرتوانی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خواهد بود. گرچه درصد غنی‌سازی SSCs در

به مدت پنج دقیقه سانتیفریژ شد. سپس محلول رویی که حاوی سلول‌های بینایی است با آنزیم تازه جایگزین شد. این مرحله روی صفحه گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. پیتاژ تا حد محو شدن لوله‌ها و آزاد شدن سلول‌های منفرد ادامه داشت. سپس سوسپانسیون سلولی برای حذف قطعات لوله‌ای باقیمانده از فیلتر نایلونی ۴۰ میکرومتری عبور داده شد. پس از سانتیفریژ سوسپانسیون حاصل با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه، سلول‌های حاصل دو گروه شده و روی ظروف کشت پوشیده با لامینین و ژلاتین به تعداد مساوی (۱۰۰۰۰۰ سلول در 1cm^2) توزیع و کشت شد.

آماده‌سازی ظروف کشت پوشیده با لامینین و ژلاتین

ظروف کشت یک ساعت پیش از کشت با محلول ژلاتین (Sigma; USA) ۲٪ در بافر فسفات (PBS) [۱۸, ۱۷] پوشیده شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول ژلاتین از سطح ظرف کشت جمع‌آوری و برای کارآماده شد. همچنین برای آماده‌سازی ظروف کشت پوشیده با لامینین (Sigma, St Louis, MO)، ظروف کشت به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با لامینین (۱ $1\text{mg}/\text{m}^2$) پوشیده شد و سپس ۱ تا ۲ بار با محلول بافر فسفات (PBS) شسته شده و برای کشت سلولها آماده شد.

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و ارزیابی آن‌ها

پس از استخراج سلول‌ها از بیضه موش‌های نر ۶ روزه به ترتیبی که ذکر شد، سلول‌های منفرد حاصل به کمک لام نئوبار شمارش و سپس به تعداد مساوی در خانه‌های ظرف کشت ۶ خانه (6Well) در دو گروه (خانه‌های پوشیده با لامینین و خانه‌های پوشیده با ژلاتین) توزیع شد. محیط کشت آن‌ها شامل DMEM حاوی ۱ درصد سرم (Fetal bovine serum: Gibco, Paisley, FBS) UK بود که با فاکتورهای رشد زیر غنی‌سازی شد:

۱- GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor) با

غلظت $40\text{ ng}/\text{ml}$

۲- EGF (Epidermal Growth Factor) با غلظت $20\text{ ng}/\text{ml}$

روش خالص‌سازی بر پایه نشانگرهای اختصاصی آن‌ها با استفاده از ماتریکس‌های برون سلولی نسبت به روش‌های مبتنی بر FACS (fluorescent activated cell sorting) و MACS (Magnetic activated cell sorting) کمتر خواهد بود ولی در عین حال روش کار با آن‌ها ساده‌تر، آسان‌تر و ارزان‌تر است. بنابراین دستیابی به روش خالص‌سازی مبتنی بر ماتریکس برون سلولی مناسب از بین ماتریکس‌های برون سلولی مورد آزمایش در بهبود شرایط کشت مهم خواهد بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه از ۳۰ سر موش نوزاد ۶ روزه نژاد NMRI (خریداری شده از موسسه پاستور) استفاده شد.

جداسازی سلول‌های بیضه نوزاد موش

جداسازی سلول‌ها در این مطالعه بر اساس روش کار ایزدیاری (Izadyar) در سال ۲۰۰۲ [۱۶] با کمی اصلاح و تغییر انجام شد. موش‌ها با استفاده از کلروفرم کشته شدند. سپس بیضه‌ها با استفاده از پنس و قیچی استریل در کنار شعله جدا شده روی یخ قرارداده شد و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس در زیر هود به ظرف کشت حاوی بافر فسفات (PBS) منتقل شد و کپسول بیضه‌ها با استفاده از قیچی جدا و کلاف لوله‌های سمینیفروس به ظرف کشت حاوی محیط Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Paisley, UK) منتقل شد و لوله‌ها با کمک پنس و قیچی و همچنین پیتاژ از هم جدا و برای مراحل هضم آنزیمی آماده شدند. سوسپانسیون حاوی لوله‌ها یک‌بار با دور ۱۲۰۰ به مدت یک دقیقه سانتیفریژ شد. سپس محلول رویی با محلول آنزیمی شامل کلاژناز و دیسپاز و هیالورونیداز (Gibco, Paisley, UK) هر کدام به غلظت $1\text{mg}/\text{ml}$ جایگزین شد. پس از آن در کنار شعله به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه پیتاژ شده تا سلول‌های بینایی از لوله‌ها جدا شود. سوسپانسیون حاصل از مرحله اول با دور ۱۵۰۰

و روی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی بادی ثانویه متصل به FITC (goat anti-mouse or goat anti-rat labeled with FITC) با غلظت (fluorescein isothiocyanate; Sigma, St Louis, MO) با غلظت ۱:۲۰۰ پوشیده شد. پس از شستشو، نمونه‌ها، به منظور رنگ‌آمیزی هسته‌ها در محلول ۱ $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI)، به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفته و پس از شستشو به کمک میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر مناسب عکس‌برداری شد.

۲- فلوسایتومتری

به منظور بررسی کمی نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شامل $\alpha 6$ -Integrin و $\beta 1$ -Integrin از روش فلوسایتومتری به شرح زیر استفاده شد: پس از به دست آوردن سلول‌های کاملاً منفرد از کلونی‌های اسپرماتوگونی، سوسپانسیون سلولی سانتریفوژ و سپس محلول آنژیمی با محلول شستشو که حاوی بافر فسفات (PBS)، BSA، (Bovine serum albumin) ۵ درصد و FBS یک درصد است، جایگزین شد. لازم به ذکر است که تمام مراحل آماده سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتری روی یخ انجام شد. سلول‌ها پس از شستشو به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت و پس از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی سرم بز ۱۰ درصد برای ممانعت از اتصال غیر اختصاصی آنتی‌بادی قرار گرفت و سپس آنتی‌بادی‌های اولیه با غلظت مشخص ($\alpha 6/\beta 1$ -Integrin با غلظت ۱:۱۰۰) به آن‌ها اضافه شد. پس از یک شب که نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ماندند، با محلول شستشو، شسته شده و به مدت ۴۵ دقیقه در معرض آنتی‌بادی ثانویه مناسب متصل به FITC (با غلظت ۱:۱۰۰) قرار داده شد. سپس به خوبی شسته شده و مقدار کمی هر کدام از نشانگرها با دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری و آنالیز شد (۳ بار تکرار در هر گروه). در هر مرحله شستشو، سوسپانسیون سلولی سانتریفوژ شده و پس از حذف محلول شستشو، محلول مناسب مرحله بعد به آن‌ها اضافه شد. لازم به ذکر است که در کنار هر نمونه یک نمونه کنترل وجود داشت که اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه در فرآیند آماده سازی آن انجام نشد.

۳- bFGF (Basic Fibroblastic Growth Factor) با غلظت

(Sigma, St Louis, MO) ; ۱۰ ng/ml

سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، فشار CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۸۰ درصد به مدت یک ساعت [۹، ۱۵، ۱۹، ۲۰] انکوبه شد و پس از آن سلول‌های شناور از سطح ظروف کشت در دو گروه جمع‌آوری و سلول‌های چسبیده به کف کشت و هر ۷۲ ساعت محیط آن‌ها تعویض شد [۱۸، ۲۱]. بعد از ۳ تا ۵ روز، کلونی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی ظاهر شده و شروع به رشد و تکثیر کرد. تعداد کلونی‌ها در هر چاهک (۶ چاهک در هر گروه) در روزهای پنجم، هفتم و نهم پس از کشت به دقت شمارش شد. برای اندازه‌گیری مساحت کلونی‌ها نیز با کمک میکروسکوپ مجهز به دوربین از نقاط مختلف چاهک‌ها (۶ چاهک در هر گروه) عکس‌برداری شد و سپس با استفاده از نرم افزار Image مساحت کلونی‌ها اندازه‌گیری شد. کلونی‌ها در روز نهم از طریق رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنت برای نشانگرهای $\alpha 6/\beta 1$ - integrin، تعیین هویت شده و میزان بیان ژن‌های مورد نظر در کلونی‌ها با استفاده از روش فلوسایتومتری در هر دو گروه بررسی شد.

تعیین هویت سلول‌های اسپرماتوگونی

۱- رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنس

به منظور بررسی کیفی نشانگرهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شامل rat polyclonal anti $\alpha 6$ -integrin rat (Sigma, St Louis, MO) polyclonal anti $\beta 1$ integrin در هر دو گروه رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنت انجام شد. برای این منظور ابتدا پلیت‌های سلولی با بافر فسفات (PBS) شسته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴ درصد قرار گرفت و پس از آن در بافر فسفات با ۰/۲ درصد توین شسته شد و پس از ۱۰ دقیقه نمونه‌ها با بافر فسفات شسته شده و از سرم بز ۱۰ درصد (goat serum) به منظور ممانعت از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی استفاده شد. سپس سلول‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض آنتی‌بادی‌های $\alpha 6/\beta 1$ integrin (با غلظت ۱:۱۰۰) قرار داده شد. سپس شستشو شده

آنالیز آماری

کلیه داده‌های کمی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون t، تجزیه و تحلیل شد. تفاوت داده‌ها در سطح $p \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

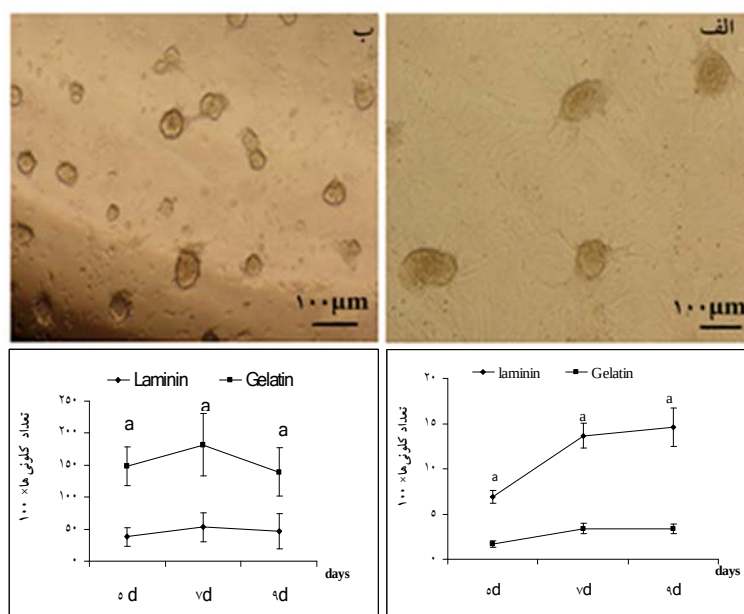
یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیک

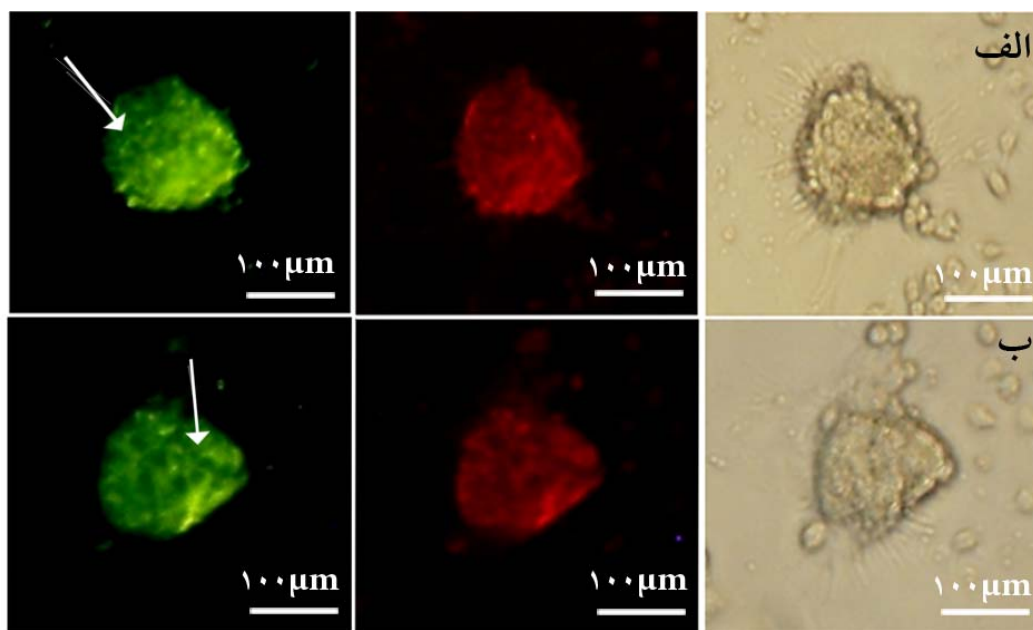
کلونی‌ها، شمارش و اندازه‌گیری مساحت آن‌ها

بررسی‌های مورفولوژیک کلونی‌های حاصل در دو گروه طی ۹ روز کشت نشان داد که کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی ژلاتین ظاهر بی‌نظم و پهنی داشت و نسبت سلول‌های سوماتیک در ظروف کشت پوشیده با ژلاتین بسیار زیاد بود (شکل ۱-الف). درحالی که کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی لامینین مدور بوده و درصد ناچیزی از سلول‌های سوماتیک در این سیستم کشت باقی ماندند (شکل ۱-ب). براساس نتایج، تعداد

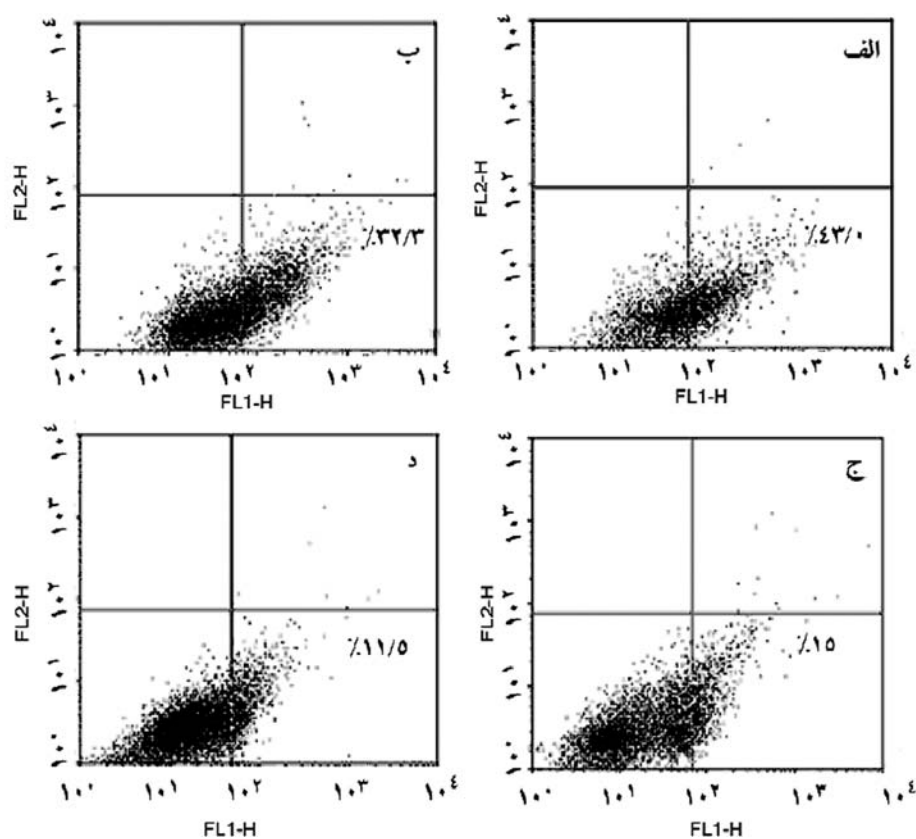
کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی لامینین در روز پنجم $136/6 \pm 136/6$ و در روز نهم $1460 \pm 209/2$ کلونی بود. تعداد کلونی‌های کشت شده روی ژلاتین در روز پنجم $167/3 \pm 37/1$ روز هفتم $340 \pm 57/8$ و در روز نهم $332/5 \pm 53/23$ کلونی بود (شکل ۱-ج). همچنین مساحت کلونی‌های کشت شده روی لامینین در روز پنجم ($3809/7 \pm 1427 \mu m^2$) روز هفتم ($5312/5 \pm 2246 \mu m^2$) و در روز نهم ($13914/9 \pm 3818/5 \mu m^2$) بود (شکل ۱-د). بنابراین طی روزهای پنجم، هفتم و نهم کشت، تعداد کلونی‌های کشت شده روی لامینین نسبت به تعداد کلونی‌های کشت شده روی ژلاتین به‌طور معنی‌داری بیشتر ($p \leq 0.01$) اما مساحت کلونی‌های گروه لامینین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه ژلاتین کمتر بود ($p \leq 0.01$).



شکل ۱. مورفولوژی کلونی‌های اسپرماتوگونی حاصل از کشت اولیه سلول‌های بیضه موش ۶ روزه، نه روز پس از کشت در گروه ژلاتین (الف) و لامینین (ب) نشان داده شده است. نمودار مقایسه تعداد (ج) و مساحت (د) کلونی‌های اسپرماتوگونی در دو گروه (شش تکرار در هر گروه). علامت a معنی‌داری تفاوت دو گروه را در تمام روزها در سطح $p \leq 0.01$ نشان می‌دهد.



شکل ۲. نتایج حاصل از آزمون ایمنوسیتوشیمی در روز نهم پس از کشت برای نشانگر $\alpha 6$ -integrin (الف) $\beta 1$ -integrin (ب) آنتی‌بادی ثانویه متصل با رنگ فلورسنت (FITC) بوده و برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها از رنگ Propidium iodide (PI) استفاده شد. پیکان، غشایی بودن نشانگرها را نشان می‌دهد.



شکل ۳. نتایج حاصل از آزمون فلوسایتمتری در روز نهم پس از کشت برای سنجش نشانگر $\beta 1$ -integrin در گروه ژلاتین (الف) و لامینین (ب) و نشانگر $\alpha 6$ -integrin در گروه ژلاتین (ج) و لامینین (د) (یک تکرار در هر گروه) نشان داده شده است.

بحث

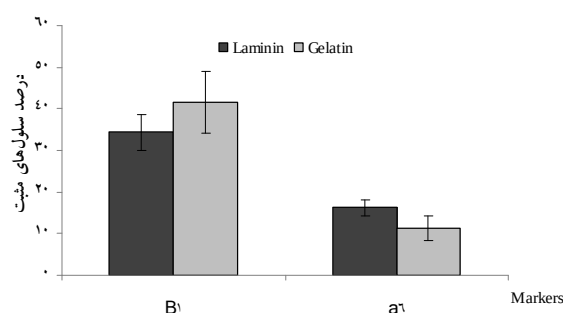
در این مطالعه به منظور بررسی اثر ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین در کشت کوتاه مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد، سوسپانسیون سلولی بیضه موش روی ظروف کشت پوشیده با لامینین و ژلاتین کشت شد و طی نه روز با استفاده از آزمون‌های کمی و کیفی ارزیابی شد. بر اساس نتایج حاصل، کلونی‌های کشت شده در هر دو گروه نشانگرهای $\beta 1$ - integrin/ $\alpha 6$ - integrin را بیان می‌کند ولی کلونی‌های کشت شده روی ظروف پوشیده با لامینین تعداد بیشتر و مساحت کمتری نسبت به کلونی‌های کشت شده روی ظروف پوشیده با ژلاتین داشت. با توجه به اینکه تا کنون نشانگر اختصاصی برای SSCs معرفی نشده است، اساس انتخاب نشانگرها در این مطالعه بر مبنای گزارش شینوهارا (Shinohara) در سال ۱۹۹۹ بود که برای اولین بار نشانگرهای $\beta 1$ - Integrin و $\alpha 6$ -Integrin را نشانگرهای سطحی SSCs معرفی کرد [۹]. پس از آن در مطالعات بسیاری از این نشانگرها برای تعیین هویت یا خالص سازی SSCs استفاده شد [۲۲-۲۴]. همچنین شینوهارا (Shinohara)؟ در سال ۲۰۰۸ $\beta 1$ - Integrin را نشانگر اصلی SSCs دانست که نقش اساسی در جای‌گیری SSCs در مجاورت غشای پایه لوله‌های منی ساز دارد [۱۰]. از آنجا که محل جای‌گیری SSCs (Homming) در مجاورت غشای پایه لوله‌های سمینی فروس است و این سلول‌ها با استفاده از پروتئین‌های سطحی خود (از جمله $\alpha 6$ Integrin و $\beta 1$ - Integrin) به پروتئین‌های تشکیل دهنده غشای پایه لوله‌های سمینی فروس (از جمله لامینین و کلاژن) متصل می‌شوند، در بسیاری از مطالعات از ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین (که از هیدرولیز کلاژن حاصل می‌شود [۲۵]) برای بهبود شرایط کشت SSCs سود برده‌اند. چنانچه هوانگ (Huang) در سال ۲۰۰۹ [۲۰] و کوجیک (Kuijk) در سال ۲۰۰۹ [۱۹] از ظروف کشت پوشیده با لامینین برای کشت SSCs موش نابالغ استفاده کردند. به علاوه گوان (Guan)

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

بررسی کیفی بیان نشانگرهای اختصاصی SSCها با استفاده از آزمون ایمونوسیتوشیمی برای تعیین هویت کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سلول‌های بیضه موش نوزاد برای نشانگرهای $\alpha 6$ - integrin, $\beta 1$ - integrin در دو گروه در روز نهم پس از کشت انجام شد. براساس تصاویر حاصل از آزمون ایمونوسیتوشیمی، کلونی‌های به‌دست آمده شامل سلول‌هایی هستند که در هر دو گروه برای نشانگر سطحی $\alpha 6$ - integrin (شکل ۲-الف) و $\beta 1$ - integrin (شکل ۲-ب) مثبت هستند.

نتایج حاصل از فلوسایتومتری

بررسی کمی بیان نشانگرهای اختصاصی SSCها نشان داد که ۴۱/۶ درصد کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی ژلاتین (شکل ۳-الف) و ۳۹/۳ درصد کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی لامینین (شکل ۳-ب) نشانگر $\beta 1$ - integrin را بیان می‌کند و ۱۱/۲ درصد کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی ژلاتین (شکل ۳-ج) و ۱۶/۲ درصد کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی لامینین (شکل ۳-د) نشانگر $\alpha 6$ - integrin را بیان می‌کند ولی در بیان نشانگرهای $\beta 1$ - integrin و $\alpha 6$ - integrin در گروه لامینین تفاوت معنی‌داری با گروه ژلاتین ندارد ($p > 0.05$) (شکل ۴).



شکل ۴. مقایسه درصد بیان نشانگرهای $\alpha 6$ - integrin و $\beta 1$ - integrin در کلونی‌های اسپرماتوگونی در هر دو گروه (با سه تکرار) که تفاوت درصد سلول‌های بیان‌کننده نشانگرهای فوق در دو گروه در روز نهم پس از کشت معنی‌دار نیست.

در سال ۲۰۰۶ [۲۶] و سیندل (Seandel) در سال ۲۰۰۷ [۲۷] و کوساک (Kussack) در سال ۲۰۰۹ [۲۸] از ظروف کشت پوشیده با ژلاتین برای کشت SSCs انسانی و موشی استفاده کردند و شینوهارا (Shinohara) در سال ۲۰۰۴ [۲۹] وایزدیارد در سال ۲۰۰۲ [۳۰] از ظروف کشت پوشیده با ژلاتین برای کاهش تعداد سلول‌های سوماتیک در کشت SSCs استفاده کردند. به‌علاوه شینوهارا (Shinohara) در سال ۲۰۰۸ از ظروف کشت پوشیده با لامینین و ژلاتین برای حذف سلول‌های غیر جنسی استفاده کرد [۳۱]. با وجود این در مطالعات مرتبط، رویکرد مقایسه‌ای کمتر مورد توجه بوده است. در تحقیق حاضر، بررسی‌های مورفولوژیک کلونی‌های حاصل در دو گروه نشان داد که کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی ژلاتین ظاهر بی‌نظمی داشت و نسبت سلول‌های سوماتیک در کشت روی ظروف کشت پوشیده با ژلاتین بسیار زیاد بود (شکل ۱-الف) که این مطلب مشابه سایر گزارش‌ها بود [۳۰، ۳۱]، درحالی که کلونی‌های به‌دست آمده از کشت سوسپانسیون سلولی روی لامینین مدور بوده و درصد ناپیزی از سلول‌های سوماتیک در این سیستم کشت باقی مانده بود (شکل ۱-ب). این یافته مشابه نتیجه مطالعاتی است که از ظروف کشت پوشیده با لامینین برای خالص سازی SSCs استفاده کردند [۳۱]. همچنین چنانچه کالتوف (Kalthoff) در سال ۱۹۹۶ در مقایسه اثر ماتریکس‌های لامینین و کلاژن بر کشت سلول‌های عصبی مطرح کرد [۳۲]، مورفولوژی متفاوت SSCs نیز روی این دو بستر ممکن است به دلیل ایجاد ریزمحیط‌های (microenvironments) متفاوت توسط لامینین و ژلاتین (فرم هیدرولیز شده کلاژن) باشد. نتایج حاصل از شمارش تعداد کلونی‌ها و اندازه‌گیری مساحت آن‌ها طی روزهای پنجم، هفتم و نهم کشت نشان داد که تعداد کلونی‌های کشت شده روی لامینین نسبت به تعداد کلونی‌های کشت شده روی ژلاتین به‌طور معنی‌داری بیشتر است ($p \leq 0.01$). براین اساس لامینین در ایجاد یا حفظ ظرفیت

کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مؤثرتر بود، به‌طوری که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در سیستم کشت لامینین، توانستند کلونی بیشتری ایجاد کنند و تعداد کلونی‌ها با گذشت زمان افزایش یافت که این امر نشان‌دهنده توان کلونی‌زایی بالای این سلول‌ها روی لامینین و در محیط آزمایشگاه بود. مساحت کلونی‌های گروه لامینین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه ژلاتین کمتر بود ($p \leq 0.01$) (شکل ۱-د). چنانچه Kalthoff در سال ۱۹۹۶ در مقایسه اثر ماتریکس‌های لامینین و کلاژن بر کشت سلول‌های عصبی عنوان کرد [۳۲]، تفاوت‌های شیمیایی لامینین و کلاژن از یک طرف و اثر متفاوت این دو بستر در ایجاد پل‌های بین سلولی از سوی دیگر موجب می‌شود که سلول‌ها روی لامینین تمایل بیشتری به اتصال با هم و روی کلاژن تمایل به پهن شدن داشته باشند. از سوی دیگر در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های سوماتیک در بستر ژلاتین زیاد بود (چنانچه کف ظرف کشت را می‌پوشاندند) تمایل بیشتر SSCs برای اتصال به این سلول‌ها نسبت به اتصال به ژلاتین موجب افزایش تمایز سلول‌های کلونی و در نتیجه افزایش مساحت کلونی‌های SSCs حین تکثیر روی این بستر شده است. در صورتی که در ریزمحیط ایجاد شده توسط لامینین سلول‌ها تمایل دارند به هم متصل شوند [۳۲] و مساحت کمتر و احتمالاً ارتفاع بیشتری نسبت به کلونی‌های کشت شده روی ژلاتین پیدا کنند که خود نشان دهنده تکثیر و عدم تمایز آن‌هاست. به‌علاوه کلونی‌های حاصل از کشت اولیه روی ماتریکس‌های مورد استفاده در این طرح از نظر اندازه بسیار متفاوت بودند. انجم روز (Anjamrooz) در سال ۲۰۰۶ پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی موش نوزاد گزارش کرد که ظرفیت کلونی‌زایی این سلول‌ها با هم متفاوت است [۳۳]. به‌علاوه سلول‌های کشت شده روی ماتریکس‌های برون سلولی استفاده شده در این مطالعه از نظر تعداد و سرعت تقسیمات متفاوت بودند که می‌تواند نشان‌دهنده اثر متفاوت لامینین و ژلاتین باشد. برای تعیین

سال ۲۰۰۳ را تأیید نمود و بیان کرد که وجود EGF و bFGF موجب افزایش اثر GDNF در خود نوزایی SSCs می‌شود [۳۶]. همچنین مینگ (Meng) در سال ۲۰۰۰ در گزارشی وجود GDNF را موجب افزایش خود نوزایی SSCs دانست [۳۷].

هر چند هویت قطعی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه تنها با استفاده از پیوند ممکن خواهد بود، اما براساس نتایج می‌توان کلونی‌های به دست آمده با استفاده از روش فوق را متشکل از سلول‌های اسپرماتوگونی دانست که نشانگرهای $\alpha 6$ - integrin و $\beta 1$ -integrin (پروتئین‌های سطحی SSCs) را بیان می‌کند اما با توجه به تعداد بسیار کم سلول‌های سوماتیک و تعداد زیاد کلونی‌های SSC در کشت روی لامینین، این ماتریکس برون سلولی از لحاظ بهبود شرایط تکثیر SSCها مؤثرتر از ژلاتین است و استفاده از پاساژهای متوالی روی ظروف کشت پوشیده با لامینین می‌تواند در خالص‌سازی بهتر SSCs مؤثر باشد. بنابراین در مطالعات پیشرفته مرتبط می‌توان از این روش برای دستیابی به کلونی‌های SSC با تعداد قابل توجه استفاده کرد. البته انتخاب ماتریکس برون سلولی برتر که در مجموع شرایط مناسب‌تری برای کشت SSCs فراهم کند، نیازمند انجام آزمون‌های تکمیلی با رویکرد مولکولی است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از کلیه اساتید و اعضای محترم گروه سلول‌های بنیادی و زیر گروه سلول‌های زاینده در آزمایشگاه تمایز پژوهشکده رویان صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. لازم به ذکر است که کلیه هزینه‌های این طرح توسط پژوهشکده رویان و جهاد دانشگاهی پرداخت شده است.

هویت کلونی‌های حاصل از کشت اولیه در گام اول از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت علیه نشانگرهای $\alpha 6$ - Integrin / $\beta 1$ -Integrin استفاده شد. تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت نشان داد کلونی‌های حاصل در هر دو گروه نشانگرهای SSCs ($\alpha 6$ - integrin, $\beta 1$ -integrin) را بیان می‌کند (شکل ۲). از بین آزمون‌های کمی مقایسه‌ای، آزمون فلوسایتومتری روش مطمئن و ساده‌ای برای بررسی میزان بیان پروتئین‌ها است. کوبوتا (Kubota) در سال ۲۰۰۳ با انجام این آزمون نشان داد که تعداد کمی از سلول‌های اسپرماتوگونی که $\beta 1$ -Integrin مثبت هستند، نشانگر C-kit (خاص سلول‌های تمایز یافته) را بیان می‌کند. به علاوه درصد زیادی از آن‌ها $\alpha 6$ -Integrin مثبت هستند [۳۴]. در این مطالعه میزان بیان کمی نشانگرهای مثبت SSCs ($\beta 1/\alpha 6$ -Integrin) حاصل شده از آزمون فلوسایتومتری نشان می‌دهد که دوگروه در میزان بیان کمی نشانگرهای مثبت SSCs ($\beta 1/\alpha 6$ - integrin) نسبت به هم اثر مشابهی داشتند (شکل ۴). بنابراین از آنجا که SSCها با استفاده از پروتئین‌های سطحی خود به ماتریکس‌های برون سلولی لامینین و ژلاتین متصل می‌شوند. این دو ماتریکس در خالص‌سازی SSCها بر مبنای نشانگرهای سطحی ($\beta 1/\alpha 6$ - integrin) تفاوت معنی‌داری نداشت. محیط کشت مورد استفاده در طرح حاضر بر اساس گزارشی بود که مک لین (McLean) در سال ۲۰۰۳ ارا به کرد. او سیستم‌های کشت مختلف را با هم مقایسه نمود و بهترین محیط کشت را حضور همزمان فاکتورهای رشد GDNF و EGF و Bfgf در محیط کشت با درصد کم سرم دانست [۳۵]. برینستر (Brinster) در سال ۲۰۰۸ گزارش McLean در

References

1. Dym M, Kokkinaki M, Z He. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res C Embryo Today 2009; 87: 27-34.
2. Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton

- SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, et al. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. Biol Reprod 2003; 69:

- 1260-4.
3. **Brinster RL, Zimmermann JW.** Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11298-302.
4. **Kubota H, Brinster RL.** Technology Insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 99-108.
5. **Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL.** Functional Analysis of Spermatogonial Stem Cells in Steel and Cryptorchid Infertile Mouse Models. *Dev Biol* 2000; 220: 401-11.
6. **Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, et al.** GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod* 2005; 73: 1011-6.
7. **Tegelenbosch RA, de Rooij DG.** A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290: 193-200.
8. **Siu MK, Cheng CY.** Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod* 2004; 71: 375-91.
9. **Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL.** beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5504-9.
10. **Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S, et al.** Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 533-42.
11. **Wang YK, Wang YH, Wang CZ, Sung JM, Chiu WT, Lin SH, et al.** Rigidity of collagen fibrils controls collagen gel-induced down-regulation of focal adhesion complex proteins mediated by alpha2beta1 integrin. *J Biol Chem* 2003; 278: 21886-92.
12. **Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP.** Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14: 526-32.
13. **Novin MG, Nouri M.** Effect of matrigel on function and morphology of human endometrial epithelial cell in vitro. *Iran Biomed J* 2007; 11: 87-94.
14. **Bissell MJ, Hall HG, Parry G.** How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982; 99: 31-68.
15. **Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G.** Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc* 2009; 4: 143-54.
16. **Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, DeRooij DG.** Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J Androl* 2002; 23: 537-45.
17. **Ogawa T, Ohmura M, Tamura Y, Kita K, Ohbo K, Suda T, et al.** Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 297-306.
18. **Ko K, Tapia N, Wu G, Kim JB, Bravo MJ, Sasse P, et al.** Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 87-96.
19. **Kuijk EW, van Mil A, Brinkhof B, Penning LC, Colenbrander B, Roelen B.** PTEN and TRP53 independently suppress Nanog expression in spermatogonial stem cells. *Stem Cells Dev* 2009.
20. **Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, et al.** Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J* 2009; 23: 2076-87.
21. **Oatley JM, Brinster RL.** Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol* 2006; 419: 259-282.
22. **Shinohara M, Morimoto T, Toyokuni S, Shinohara T.** Regulation of mouse spermatogonial stem cell self-renewing division by the pituitary gland. *Biol Reprod* 2004; 70: 1731-7.

23. **Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL.** Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8346-51.
24. **Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al.** Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003; 69: 612-6.
25. **Kokil SN, Patil PR, Mahadik KR, Paradkar AR.** Effect of molecular weight of hydrolyzed gelatin on its binding properties in tablets: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 2004; 5: e41.
26. **Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, et al.** Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199-203.
27. **Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciorini I, Kim J, Chavala S, et al.** Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 2007; 449: 346-50.
28. **Kossack N, Meneses J, Shefi S, Nguyen H, N Chavez S, Nicholas C, et al.** Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 2009; 27: 138-49.
29. **Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al.** Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. *Cell* 2004; 119: 1001-1012.
30. **Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, De Rooij DG.** Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reprod Biol Endocrinol* 2002; 124: 85-94.
31. **Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, et al.** Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod* 2008; 78: 681-7.
32. **kalthoff K.** Analysis of Boilological Development. 1996 Texas: McGraw-Hill, Inc.
33. **Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ.** In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 709-20.
34. **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: 6487-92.
35. **McLean DJ.** Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 21-31.
36. **Oatley JM, Brinster RL.** Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24: 263-86.
37. **Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, De Rooij DG.** Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287: 1489-93.