مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹٦

مطالعه بیان ژن‌های شاخص مرحله‌ی اسپرمیوژنز(*Acrosin, Protamine1*) در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال انسانی القا شده برای تمایز به اسپرم

شیما کرمی .M.Sc، مسعود ملکی .Ph.D*

- **گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تبریز، تبریز، ایران**

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Maleki.masoud@iau,ac.ir,Maleki.masoud@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

چکیده

هدف: هدف این مطالعه بررسی توان تمایزی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال به اسپرم می‌باشد .

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال پس از جداسازی آنزیمی از نمونه‌های بیوپسی بیضه افراد آزواسپرمیای غیر انسدادی در فلاسک T25 کشت داده شدند. در پاساژ سوم سلول‌ها در ۴ گروه مختلف به‌مدت ۱ الی ۴ هفته تحت تاثیر محیط کشت حاوی عصاره‌ی بافت بیضه گوسفندی به‌عنوان القا کننده قرار داده شدند و پس از آن بیان ژن‌های بلوغ اسپرم: Acrosin و Protamine1 با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ بررسی شد .

نتایج: پس از القای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال توسط عصاره‌ی بافت بیضه گوسفندی در این سلول‌ها شکل تغییر یافته به‌صورت شبه اسپرم در آمدند و همچنین بیان ژن پروتامین ۱و آکروزین تایید شد.

نتیجه‌گیری: بررسی سلول‌های القا شده نشان داد که آکروزین و پروتامین ۱ بیان شده اند، از آنجایی‌که آکروزین و پروتامین عمده ترین پروتئین‌های اسپرمیوژنز هستند می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که این سلول‌ها مرحله‌ی اسپرماتوژنز را کامل نموده و وارد مرحله‌ی اسپرمیوژنز شده‌اند.

واژگان کلیدی: آکروزین، آزواسپرمی، پروتامین۱ ،سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال

مقدمه

به ناتوانی زوج‌ها در بارداری پس از یک سال مقاربت منظم بدون پیشگیری، ناباروری گفته می‌شود (۱). ناباروری به دو صورت اولیه و ثانویه وجود دارد که در ناباروری اولیه، باروری اصلا رخ نداده است ولی در ناباروری ثانویه، ناباروری بعد از یک یا چند حاملگی موفق رخ داده است (۲). بر اساس آمار جهانی ۷۲/۴ میلیون زوج دچار مشکلات ناباروری هستند (۳). ۳۰ تا ۵۵ درصد تمام ناباروری‌ها عامل مردانه می‌باشد. که اغلب جز سخت‌ترین شکل‌های ناباروری می‌باشد (۴). روش‌های درمانی که برای درمان ناباروری مردان انجام می‌شود عبارتند از: IUI (Intrauterine insemination)، IVF (In Vitro Fertilization) و ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) (۵-۱۱) . با این وجود حتی این روش‌ها هم محدودیت‌هایی دارد و برای همه بیماران کاربرد نخواهد داشت، از جمله بیماران، آزواسپرمی، که هیچ‌گونه اسپرمی در لوله‌های اسپرم‌ساز آن‌ها وجود ندارد. در سال‌های اخیر برای برطرف کردن مشکل اینگونه افراد نیز راه دیگری پیشنهاد شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی و ساختن اسپرم برای این بیماران یکی از روش‌های انتخابی امروزه می‌باشد.

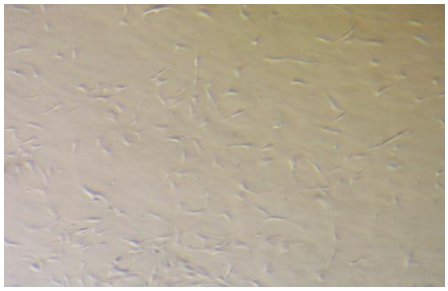
سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی هستند که در تمامی موجودات پرسلولی وجود دارند. این سلول‌ها دارای توانایی تقسیم شدن و تمایز (Differentiation) به انواع مختلف رده‌های سلولی خاص می‌باشند. خصوصیات سلول‌های بنیادی قابلیت خودنوزایی (Self-renewal) و پتانسیل تمایز (Differentiation potential) است. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال، جمعیت سلول‌های بنیادی بالغ از بافت بیضه هستند که فعالیت زیستی آن‌ها پایه و اساس اسپرماتوژنز را فراهم می‌کند (۱۲-۱۵).

طی هر مرحله از اسپرماتوژنز ژن‌های خاصی بیان می‌شوند، از جمله این مراحل اسپرمیوژنز است که مرحله نهایی اسپرماتوژنز به‌حساب می‌آید، ژن‌هایی از قبیل ACR و Protamine در این مرحله بیان می‌شوند. آکروزین یک سرین پروتئاز (Serine protease) است که به‌حالت غیرفعال (پروآکروزین) در آکروزوم اسپرم وجود دارد، وظیفه‌ی آن شناسایی و هضم زونا پلوسیدا است (۱۶). پروتامین‌ها پروتئین‌هایی هستند که وزن مولکولی کم و بار مثبت زیادی دارند و با ایجاد باندهای دی-سولفیدی در بین ریشه‌های سیستئین خود تراکم کروماتین اسپرم را افزایش می‌دهند این افزایش تراکم به‌وسیله‌ی جایگزینی ۸۵ درصد از هیستون‌های اسپرم توسط پروتامین‌ها انجام می‌شود (۱۷, ۱۸). در این مطالعه، بیان این دو ژن در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال تمایز یافته به سمت اسپرم بررسی شده است.

در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه‌ی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه اسپرم انجام شده است، از جمله: در مطالعه‌ای توسط جسیکا نولت و همکاران (۱۹) با استفاده از پروتوکل تمایزی مشابه کار قبل، موفق به تولید سلول‌های زایای نر هاپلوئید از سلول‌های بنیادی رده‌ی زایشی بسیار توان بالغ در in vitro شدند. مظاهری و همکاران (۲۰) گزارش کردند که با استفاده از یک پروتوکل جدید از فاکتور رشد ترکیبی، سلول‌های شبه زایای اولیه‌ی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های شبه اسپرماتوگونیال بنیادی تمایز یافتند. محمد بربرستانی و همکاران (۲۱) نشان دادند که کشت همزمان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال موش و سلول‌های سرتولی به‌همراه ویتامین‌ها و هورمون‌ها منجر به تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال موش به سلول‌های شبه اسپرماتید (Spermatid-like) می‌شود. در مطالعه دیگری که توسط منصفی و همکاران (۲۲) انجام گرفته، نشان داده شده است که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان موش نژاد ویستار به بیضه‌های موش گیرنده‌ای که اسپرماتوژنز در آن‌ها متوقف شده است، منجر به تمایز این سلول‌ها به رده سلول‌های زایشی در کنام جدید آن‌ها می‌شود. در تحقیقات اولیه، ملکی و همکاران (۲۳) از تکه‌های بیوپسی شده بیماران آزواسپرم سلول‌های اسپرماتوگونیال را جداسازی کرده و مارکرهای بنیادی مزانشیمی را مورد آنالیز قرار دادند. هدف از این مطالعه تمایز دادن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال بیضه افراد آزواسپرمی به سلول‌های اسپرمی می‌باشد

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی بنیادی عمل بیوپسی تشخیصی از بیضه بیماران آزواسپرمی با رضایت بیماران در اتاق عمل توسط متخصص اورولوژیست انجام گرفت که در صورت مشخص شدن شرایط آزواسپرمی، بافت بیوپسی شده درون ظرف حاوی سرم فیزیولوژیک قرار داده شد. تکه کوچکی از بافت بیضه در داخل پتری دیش حاوی HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (D-Glucose ۱gr ، gr ۰/۱۴ ،Cacl2 ۰/۱۴gr ،Kcl ۰/۰۶ gr ،KH2PO4 ۰/۱gr ،Mgcl2.6H2O ۰/۱gr ،MgSO4.7H2O ۸ gr ،Nacl ۰/۳۵gr ،NaHCO3 ۰/۰۹gr ،Na2HPO4.7H2O ۰/۰۱gr ،Phenol Red، با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده و pH را بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم می‌کنیم) با استفاده از تیغ جراحی به قطعات کوچکتر برش داده شد. بافت با تریپسین ۰/۲۵ درصد (Sigma- Aldrich, USA) به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار گردید. سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده در دور rpm ۱۵۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی را به فلاسک کشت T25 حاوی DMEM-F12 (Gibco, USA)، 10%FBS (Gibco Company) ، Pen/Strep 1% (Gibco, USA) انتقال داده، و فلاسک در انکوباتور Co_2 دار در رطوبت ۸۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مقدار Co_2، ۵ درصد نگه‌داری شد. پس از اولین روز کشت سوسپانسیون، هر روز فلاسک کشت مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. از روز دوم کشت به بعد سلول‌های سوسپانسیون در جای خود ثابت شده و به کف فلاسک کشت اتصال یافتند و دیگر در محیط کشت شناور نبودند (شکل۱).



شکل ۱: رشد اولین سلول‌ها پس ازگذشتن ۲ روز سلول‌ها به کف فلاسک چسبیده اند و شروع به رشد و تکثیر نمودند.، بزرگ‌نمایی ۴۰،

مشاهدات میکروسکوپی در روزهای آینده نیز ادامه یافت و محیط کشت فلاسک هر ۴ روز یک‌بار با محیط کشت تازه تعویض می شد. بعد از ۵ تا ۷ روز کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال به‌صورت کم تراکم در فلاسک دیده شدند (شکل۲).

شکل ۲: پس از گذشت ۵ تا ۷ روز از کشت ، کلونی سلول‌های بنیادی در فلاسک دیده می‌شوند (با فلش نشان داده شده) که بعد از گذشت ۱۴ روز تراکم آن‌ها افزایش پیدا کرد. این سلول‌ها به‌روش مکانیکی جدا شده و در فلاسک جدید کشت داده شد، بزرگ‌نمایی ۴۰

پس از ۱۴ روز که به تراکم بالا رسیدند کلونی‌ها به‌صورت مکانیکی جدا سازی و در فلاسک جدید با محیط کشت کامل کشت داده شد. در روز بیستم بعد از اولین کشت تمام کف فلاسک کشت توسط سلول‌ها پر شده بود، در این مرحله سلول‌ها پاساژ داده شدند، این کار تا رسیدن به پاساژ سوم ادامه یافت و سلول‌های پاساژ سوم برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

طرز تهیه عصاره‌ی بافت بیضه گوسفندی: بافت بیضه گوسفندی درون سرم فیزیولوژیک و یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. بافت را وزن کرده و بعد از بردن به زیر هود لامینار، ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد جهت میکروب زدایی وارد شد. پس از جدا کردن اپی‌دیدیم و کیسه بیضه، بافت بیضه توسط دستگاه آسیاب شد و در داخل HBSS قرار داده شد. سپس به داخل فالکون ۵۰ ml ریخته و ۱۰ دقیقه با دور 4000 rpm در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و پس از اتمام زمان سانتریفیوژ محیط بالایی جمع آوری و به فالکون‌های جدید انتقال یافت، در این مرحله به عصاره، Pen/Strep به فالکون‌های حاوی عصاره اضافه و ۵ دقیقه در دمای محیط نگه داشته شد سپس سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ محیط بالایی درون فالکون جداسازی و توسط کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر، سپس مواد فیلتر شده به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل شد و میکروتیوب‌ها ۵ دقیقه 12000 rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ میکروتیوب‌ها مواد درون آن‌ها به‌صورت سه لایه دیده شد، لایه وسط به‌عنوان عصاره بیضه گوسفندی جداسازی و در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتر الیکوت گردید و در یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

گروه‌های تحقیق: برای این مطالعه چهار گروه تجربی تعریف شد که به‌ترتیب گروه اول یک هفته، گروه دوم دو هفته، گروه سوم سه هفته و گروه چهارم چهار هفته در محیط القائی حاوی ۵۰ درصد عصاره ی بافت بیضه‌ی گوسفندی قرار گرفتند، برای هرگروه یک گروه کنترل بدون القا درنظر گرفته شد.

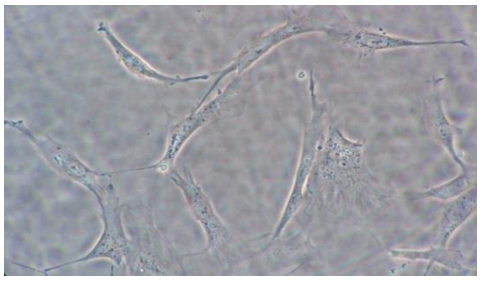
تهیه عصاره سلولی و تعیین غلظت پروتئین: از سلول‌های همه‌ی گروه‌های تجربی به این‌صورت عصاره‌ی سلولی تهیه شد، محیط داخل فلاسک کشت خالی شده و سلول‌های فلاسک با محلول PBS (*phosphate buffered saline*) (Gibco, USA) دو تا سه بار شستشو داده شدند. بقیه‌ی مراحل همگی در ۴ درجه سانتی‌گراد یعنی روی یخ انجام گرفت. به سلول‌های داخل فلاسک کشت ۰/۶ میلی‌لیتر بافر RIPA (Radio-Immune Precipitation Assay) (۱۵۰ mM سدیم کلرید، ۵۰ mM Tris pH 8، ۱درصد حجم کل NP-40، ۰/۵ درصد حجم کل سدیم داکسی کولات، ۱ درصد حجم کل SDS) اضافه شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگه‌داری شد. در طی این مدت سلول‌های کف فلاسک بوسیله یک اسکراپر از کف فلاسک جدا شد و سپس روی آن ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PMSF (Phenylmethane Sulfonyl Fluoride) (Sigma- Aldrich, USA) اضافه شد. سپس محتوای فلاسک هموژن شده و وارد میکروتیوب شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور 12000 rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد . محیط رویی به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. غلظت پروتئین هرکدام از نمونه‌ها توسط تکنیک بردفورد محاسبه شد.

انجام عمل وسترن بلات برای بررسی بیان ژن‌های Acrosin و Protamine1 : برای شناسایی پروتئین‌های مورد نظر در نمونه‌ی سلولی با استفاده از آنتی بادی، از تکنیک وسترن بلات (Western blotting) استفاده شد. به این‌صورت که بر اساس تکنیک بردفورد مقدار مشخصی از هر نمونه برروی چاهک‌های ژل آکریل‌آمید بارگذاری و به‌مدت یک ساعت الکتروفورز انجام گردید، سپس زمانی که الکتروفورز ژل آکریل آمید به پایان رسید، ژل از کاست ژل خارج شد و Stacking gel از ژل اصلی جدا شد. ژل با استفاده از بافرالکتروفورز شستشو داده شد و سپس در ظرفی حاوی western blotting transfer buffer (Tris ۳/۰۳gr، Glycin ۱۴/۴۱۹gr، ۲۰۰ml متانول، ۱ لیتر آب مقطر) به‌مدت نیم ساعت قرار داده شد. ساندویچ وسترن بلات داخل ظرفی شیشه‌ای قرار داده شد و روی آن ترانسفر بافر ریخته شد. پس از اتمام سرهم کردن ساندویچ آن را برداشته و در حالی‌که ژل به طرف قطب منفی دستگاه است، وارد دستگاه انتقال دهنده‌ی وستر بلات شد. داخل دستگاه با محلول Transfer buffer پر

شد، سپس عمل انتقال به‌مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۹۰ تا ۱۲۰ ولت و در دمای اتاق انجام گرفت. پس از پایان عمل انتقال، ساندویچ باز شده و کاغذ نیتروسلولز به‌مدت یک ساعت در بافر بلوکه کننده قرار گرفت. پس از اتمام زمان بلوکه کردن کاغذ نیترو سلولز، آنتی بادی اولیه به‌میزان ۱:۱۰۰۰ (Acrosin sc-46284 و Protamine1 sc-23107, Santa Cruze Biotechnology) در محلول بلوکه کننده رقیق شده و روی کاغذ نیترو سلولز ریخته شد. ظرف حاوی کاغذ نیترو سلولز با آنتی بادی اولیه، به‌مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد روی شیکر قرار گرفت پس از اتمام زمان ۱۲ ساعته ظرف حاوی کاغذ نیترو سلولز در دمای اتاق قرار گرفت و ۳ بار و هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با محلول TBST (۱۰۰ml TBS10x (*Tris-buffered Saline*) ، ۹۰۰ml آب مقطر، ۱ml Tween20، تنظیم pH برروی ۷/۵) شستشو شد و سپس آنتی بادی ثانویه horseradish peroxidase-labeled donkey anti-goat IgG (sc-2020, Santa Cruze Biotechnology) به‌میزان ۱:۷۰۰۰ در محلول بلوکه کننده رقیق شد و روی کاغذ نیترو سلولز اضافه شد و ظرف حاوی کاغذ نیترو سلولز در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت روی شیکر قرار گرفت. پس از اتمام این مرحله نیز کاغذ نیترو سلولز ۳ بار به‌مدت ۵ دقیقه با محلول TBST شستشو داده شد. برای رنگ آمیزی کاغذ نیترو سلولز از western blotting Luminal reagent(sc- 2048, Santa Cruze Biotechnology) استفاده شد. ابتدا به نسبت مساوی دو محلول A , B باهم مخلوط شدند و کاغذ نیترو سلولز به‌مدت ۱ دقیقه در معرض این محلول قرار گرفت و اثر آن بر روی فیلم X-ray به این صورت ظاهر شد که، کاغذ نیترو سلولز پس از قرار گرفتن در معرض Luminal reagent، به‌داخل X-ray film Cassette انتقال داده شد. در اتاق تاریک یک فیلم X-ray به‌مدت ۱ تا ۱۵ دقیقه در معرض کاغذ نیترو سلولز قرار گرفته و سپس ۵ دقیقه در محلول ظهور قرار داده شد. سپس لکه‌های ظاهر شده بر روی فیلم X-ray توسط نرم‌افزار image J نسخه 1.44p مورد آنالیز قرار گرفت.

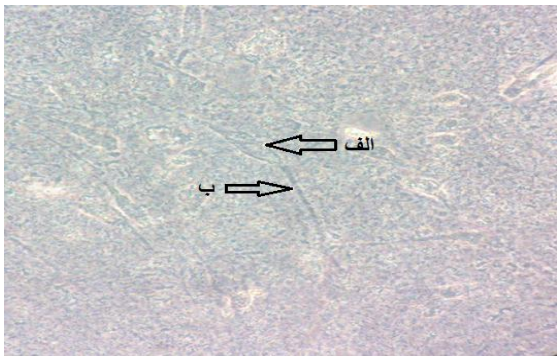
نتایج

همان طور که در شکل ۱مشاهده می شود، پس از گذشت ۲ روز از کشت، سلول‌ها به کف فلاسک چسبیده اند. این سلول‌ها پس از چند روز کلونی سلولی ایجاد نمودند. بعد از ۵ تا ۷ روز کلونی‌های سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال به‌صورت کم تراکم در فلاسک دیده شدند. پس از ۱۴ روز که به تراکم بالا رسیدند (شکل ۲) به‌صورت مکانیکی جدا شده و در فلاسک جدید کشت داده شد. سلول‌های جداسازی شده ۲۵ روز بعد از کشت تا حدود ۷۰ درصد کف فلاسک را پر می‌کنند. پس از این حالت سلول‌ها پاساژ داده شده و بین دو فلاسک تقسیم شدند. شکل ۳ سلول‌ها را در اولین روز پس از پاساژ ۱ نشان می‌دهد که سلول‌ها به‌شکل فیبروبلاستی تغییر شکل داده و کاملا کشیده شدند و به کف فلاسک چسبیده و حدود ۴۰ درصد کف فلاسک را پر نمود.



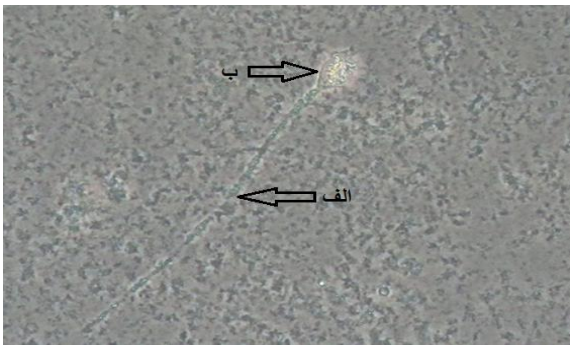
شکل ۳: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال جدا بعد از اولین پاساژ. این سلول‌ها یک روز پس از پاساژ به کف فلاسک چسبیده و شکل فیبروبلاستی به خود گرفتند، بزرگ‌نمایی ۲۰۰

پس از تهیه ی رده ی سلولی از کشت اولیه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال و رسیدن فلاسک کشت به ۱۰۰ درصد رشد ، محیط کشت حاوی عصاره‌ی بیضه گوسفند به کشت سلولی اضافه شد و هر چهار روز این محیط تعویض شد. شکل ۴ نشان می دهد که یک هفته بعد از کشت سلول در محیط القائی، سلول‌ها از حالت کشیده‌ی کامل تغییر شکل داده و یک‌طرف سلول‌ها متورم شده و سلول شکل شبه اسپرم به خود می‌گیرد و زائده ای در اطراف سلول کشیده می شود.



شکل ۴: سلول ها پس از قرار گیری در معرض محیط القائی به‌مدت یک هفته تغییر شکل می دهند. محل هسته به‌صورت یک برآمدگی درآمده (الف) و سلول کشیده تر شده و سیتوپلاسم کاهش می‌یابد. بیشتر سلول‌ها دارای چند زائده در اطرافشان هستند (ب). (پاساژ سوم)، بزرگ‌نمایی ۲۰۰.

بعد از دو هفته، تغییر شکل سلول‌ها ادامه یافته و سلول‌ها بیشتر به اسپرم شبیه بودند و تعداد کشیدگی‌های اطراف سلول کاهش یافته بودند. با توجه به شکل ۵ می‌توان گفت در مدت ادامه تیمار همچنان که زوائد اطراف سلول کمتر می شوند ، کشیده تر شده ، هسته نیز فشرده تر و قسمت سرمانند سلول کوچکتر می شود.



شکل ۵ : سلول‌ها پس از دو هفته قرار گیری در محیط القائی شروع به ایجاد ساختارهای سر و دم می‌کنند و کشیدگی‌های اطراف سلول به‌صورت یک‌طرفه شروع به افزایش طول می‌کنند. یعنی زوائد اطراف سلول به تعداد یک عدد کاهش می‌یابند و زائده‌ی باقی مانده نیز در مقایسه با زوائد سلول‌های گروه تجربی اول طویل تر می شود (الف). قسمت هسته سلول‌ها نیز به فشردگی خود ادامه می‌دهند (ب). (پاساژ سوم)، بزرگ‌نمایی ۲۰۰

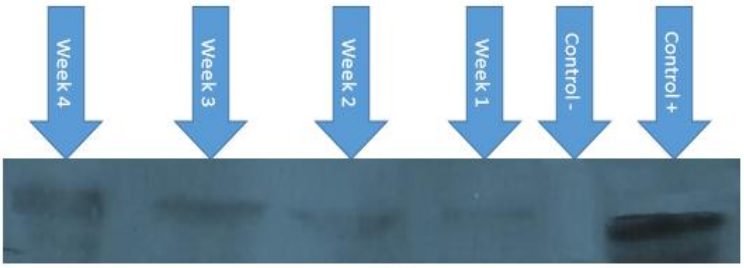
در هفته سوم همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود هسته‌ی سلول فشرده شده و سلول‌ها دارای سر بیضی شکل و سیتوپلاسمی کشیده بودند. در شکل ۷ سلول‌های القا شده ی هفته چهارم مشاهده می شود، سلول‌ها فقط یک زائده‌ی دراز دم مانند داشتند. قسمت گردن که مابین

سر و دم قرار داشت قطور تر از دم و به‌طور کامل قابل مشاهده بود.

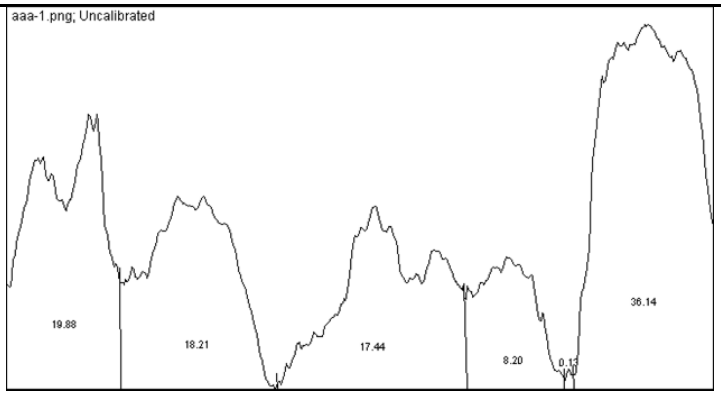
شکل ۶: در هفته‌ی سوم تغییر شکل سلول‌ها بیشتر شده و قسمت دم کوتاه‌تر از هفته‌ی قبل می‌باشد. (پاساژ سوم)، بزرگ‌نمایی ۲۰۰،

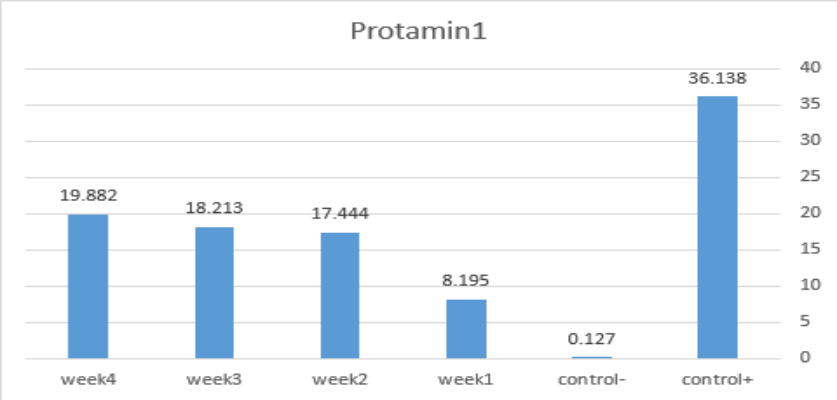
شکل ۷: در هفته چهارم سلول‌های شبه اسپرم به‌طور کامل قابل مشاهده بودند .سلول‌ها ،سری بیضی شکل داشته که هسته فشرده در مرکز آن قابل مشاهده بود (الف). ساختار دم کامل شده (ب) و در برخی از سلول‌ها گردن نیز قابل مشاهده بود (پ). (پاساژ سوم)، بزرگ‌نمایی ۲۰۰،

نتایج بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش وسترن بلاتینگ نشان می‌دهند که میزان بیان Protamin1 از هفته اول تا چهارم افزایش داشته است (شکل ۸ و نمودار۱).



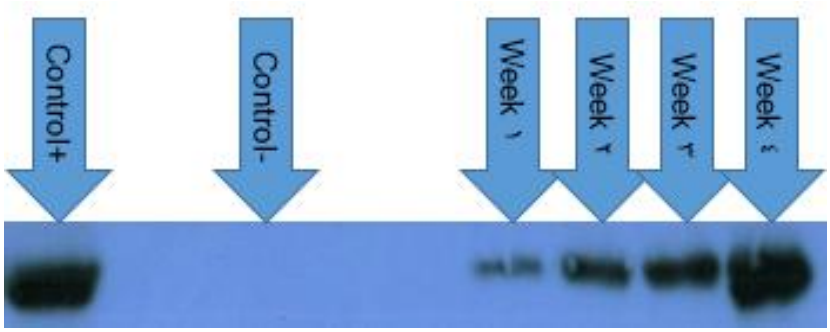
شکل ۸: نتیجه‌ی Immuno luminescence فیلتر نیتروسلولز در کشت‌های ۱ تا ۴ هفته‌ای به‌منظور بررسی پروتئین سطحی Protamine1 . در چاهک‌ها، عصاره‌ی کشت سلولی القاء شده با ۵۰ درصد محیط القائی و ۵۰ درصد محیط کشت که به‌ترتیب به‌مدت ۱، ۲، ۳ و ۴ هفته القاء شده‌اند بارگذاری شده بود. پس از نمونه‌ی هفته‌ی چهارم، گروه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت قرار گرفته‌اند.



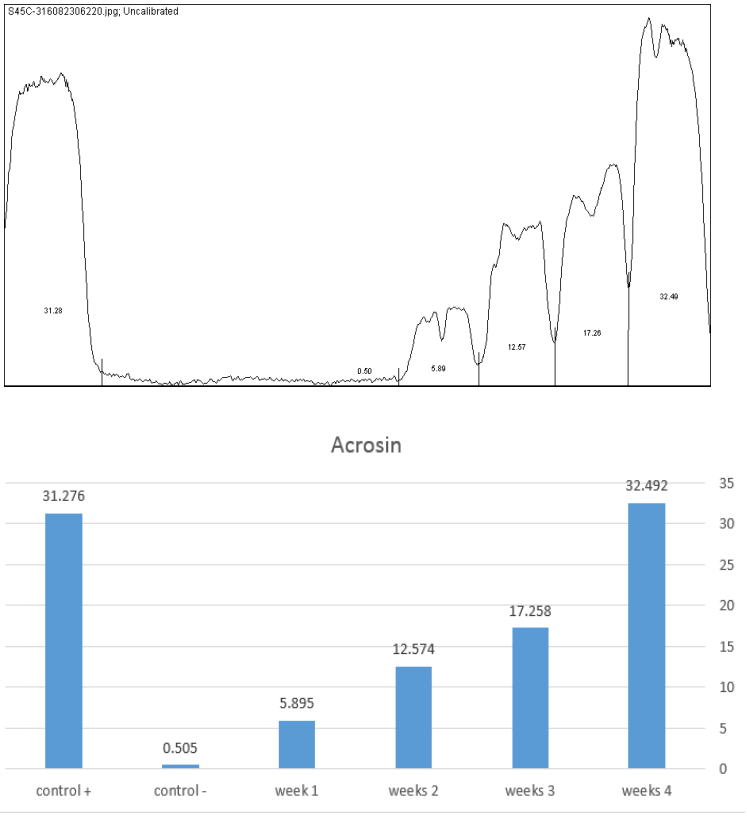


نمودار ۱: آنالیز بیان پروتئین Protamine1 بوسیله نرم افزار Imagej روند افزایشی بیان این پروتئین، از هفته اول تا چهارم را نشان می‌دهد. پروتئین Protamine1 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال (کنترل منفی) بیان نداشته و در گروه‌های تجربی اول تا چهارم بیان آن افزایش می‌یابد . این نتیجه نشان دهنده‌ی جایگزین شدن پروتامین به‌جای هیستون و بنابراین می‌باشد.

بررسی بیان ژن Acrosin هم همان‌طور که از قطر باندها در (شکل ۹) و روند افزایشی در (نمودار ۲) قابل مشاهده است، از هفته‌ی اول تا چهارم افزایشی است. در گروه کنترل منفی بیان نداشته و در گروه کنترل مثبت بیان بسیار بالایی دارد.



شکل ۹: نتیجه‌ی Immuno luminescence فیلتر نیتروسلولز در کشت‌های ۱ تا ۴ هفته ای به‌منظور بررسی پروتئین سطحی Acrosin . در چاهک‌ها ، عصاره‌ی کشت سلولی القا شده با ۵۰ درصد محیط القائی و ۵۰ درصد محیط کشت که به‌ترتیب به‌مدت ۱، ۲، ۳ و ۴ هفته القا شده اند لود شده بود. پس از نمونه‌ی هفته‌ی چهارم، گروه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت قرار گرفته اند.



نمودار ۲: آنالیز بیان پروتئین Acrosin به‌وسیله نرم افزار Imagej روند افزایشی بیان این پروتئین، از هفته اول تا چهارم را نشان می‌دهد. این پروتئین در کنترل منفی که همان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال بودند بیان نشده‌اند.

بحث

امروزه در سراسر جهان آزواسپرمی در ۱ درصد کل مردان دیده می‌شود (۲۴) و ۱۰ تا ۱۵ درصد از کل موارد ناباروری در مردان را تشکیل می‌دهد (۲۵, ۲۶) . هم اکنون روش‌های کمک باروری برای یاری افراد مبتلا به آزوسپرمی وجود دارد که علاوه بر امتیازاتشان برای همه‌ی موارد این بیماری کارساز نبوده و در صورت موفقیت نیز، هر روش بازده خاص خود را دارد که در تمام کشورها و تمام افراد به یک اندازه نیست. علاوه بر این در درمان‌های موجود برای سرطان‌های دستگاه تناسلی بیشتر از روش های شیمی درمانی استفاده می‌شود که خود این روش‌ها باعث از دست رفتن سلول‌های زایای موجود در بافت بیضه شده که به نوبه‌ی خود باعث ایجاد آزوسپرمی در افراد می شود (۲۷). روش‌های نگه‌داری از اسپرم و انجماد آن نیز همیشه قابل اتکا نبوده و امکان آسیب دیدن اسپرم در زمان انجماد وجود دارد (۲۷). به‌دلیل بازده پایین روش‌های مرسوم کمک باروری در درمان آزوسپرمی، توجه محققین به زمینه‌ی سلول‌های بنیادی جلب شده است، چرا که کاربردهای زیادی در زمینه مهندسی بافت (Tissue engineering)، پزشکی ترمیمی (Regenerative medicine)، سلول درمانی (Cell therapy) و ژن درمانی (Gene therapy) دارند که همگی ناشی از پتانسیل درمانی بالای این سلول‌هاست (۲۸). روش های درمانی که از سلول‌های بنیادی بهره می‌برند آزادی عمل بیشتری داشته و با این‌که مدت زمان نسبتا کمی است که در این زمینه تحقیق به عمل می‌آید ولی پروژه‌های تحقیقاتی پیشرفت‌ها و موفقیت‌های فراوانی به‌دست آورده اند. در طی مطالعاتی که در سال‌های اخیر بر روی سلول‌های بنیادی انجام گرفته است، همیشه یکی از جنبه‌های مورد بحث، منبع سلول‌های بنیادی استفاده شده در طرح های تحقیقاتی است. سلول‌های بنیادی بالغ

که در تمام مدت زندگی فرد در بدن انسان وجود دارند و در مناطق مختلفی از بافت‌ها استقرار دارند نیازهای آن بافت را برای جایگزینی سلول‌های مرده یا پیر یا آسیب دیده، برطرف می کنند (۲۹). تحقیقات انجام شده بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال نشان داده است که این سلول‌ها کاندید مناسبی برای سلول درمانی می‌باشند. . در این مطالعه از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال استفاده شد که ملکی و همکاران (۲۳) با جدا کردن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال از بیوپسی بیضه‌ی مردان، مارکرهای بنیادی آن‌ها را بررسی کرده‌اند، اهمیت این کار در این است که سلول از بافت خود بیمار جداسازی شده و مربوط به فرد دیگری نمی‌باشد، همچنین منبع جداسازی این سلول‌ها بافت بیضه انسانی می‌باشد که به‌طور طبیعی محل تولید اسپرم است، قدرت تمایزی بالایی دارند و منبعی سهل الوصول‌تر و مناسب‌تر از منابع استفاده شده در مطالعات قبلی می‌باشد از جمله مطالعات ایزدیار و همکاران (۳۰) که اسپرماتوگونیال نوع A گوساله را جداسازی نموده و برای بررسی، آن‌را به بیضه‌ی موش دارای نقص ایمنی تزریق کردند و مطالعات مظاهری و همکاران (۲۰) گزارش کردند با استفاده از یک روش جدید از فاکتور رشد ترکیبی، سلول‌های شبه زایای اولیه‌ی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، به سلول‌های شبه اسپرماتوگونیال بنیادی تمایز یافتند. در این تحقیق از عصاره‌ی بیضه گوسفند برای القا سلول‌های بنیادی به سمت اسپرم استفاده شد که تمام فاکتورهای مورد نظر برای تولید اسپرم را دارا می‌باشد، اما در تحقیقات مشابه که توسط گیجسن (Geijsen) و همکارانش (۳۱) و توسط نیرنیا و همکاران (۳۲) صورت گرفت از رتینوئیک اسید به‌عنوان القاگر استفاده شده بود. بیان ژن‌های Proramine1 و Acrosin تاکنون در هیچ مطالعه‌ای مورد بررسی قرار نگرفته بود، افزایش بیان ژن Proramine1 در گروه‌های تجربی مورد مطالعه طی ۴ هفته نشان دهنده‌ی جایگزین شدن هیستون‌ها توسط پروتامین و افزایش بیان Acrosin در مدت مشابه تشکیل کیسه‌ی آکروزومی را نشان می‌دهد که این نتایج حاکی از پیشرفت مراحل تولید اسپرم تا مرحله‌ی بلوغ اسپرم یا همان اسپرمیوژنز هستند، در صورتی‌که دروسنهیمر (Drusenheimer) و همکاران (۳۳) از سلول‌های بنیادی مغز قرمز استخوان انسان با بیان مارکرهای سلول زایای اولیه و مارکرهای خاص سلول‌های زایشی نر، توانستند سلول‌های زایشی مردانه را به‌دست آورند. در مشاهدات میکروسکوپی این مطالعه تغییرات مورفولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال از شکل فیبروبلاستی به‌شکل شبه اسپرم دارای سر بیضی شکل با هسته فشرده، گردن و دم مشهود بود که در مقایسه با سلول القا شده در مطالعه‌ی نیرنیا و همکارانش (۳۲) از نظر ظاهری بسیار شبیه‌تر به اسپرم بالغ بوده و مارکرهای مرحله‌ی اسپرمیوژنز بیان

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان این ژن‌ها به روش وسترن بلات، حاکی از بیان هر دو ژن پروتامین ۱ و آکروزین بود که خود پیشروی مراحل اسپرماتوژنز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال القا شده را تا مرحله‌ی اسپرمیوژنز نشان می‌دهد. همچنین در مشاهدات میکروسکوپی تغییر مورفولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال از شکل فیبروبلاستی به‌شکل شبه اسپرم کاملا مشهود است. پس سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال یکی از مناسب‌ترین منبع سلولی جهت تولید اسپرم برای افراد آزواسپرمی می‌باشند.

تشکر و قدردانی

از دست اندرکاران و پزشکان متخصص مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی آذربایجان شرقی کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Rowe P CF, Hargreave T, Mellows H. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple
Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1993. 1993(92).
2. Poongothai J, Gopenath T, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 2009;50(4):336-47.
3. Dyer S. International estimates on infertility prevalence and treatment seeking: potential need and demand for medical care. Human reproduction. 2009;24(9):2379-80.
4. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. Fertility and sterility. 2002;77(5):873-82.
5. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A, Borges E. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. The Journal of urology. 2002;167(4):1753-6.
6. Madgar I, Hourvitz A, Levron J, Seidman DS, Shulman A, Raviv GG, et al. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. Fertility and sterility. 1998;69(6):1080-4.
7. Tarlatzis BC, Bili H. Intracytoplasmic sperm injection survey of world results. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000;900(1):336-44.
8. Ubaldi F, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, et al. Indications for and results of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). International journal of andrology. 1995;18:88-90.
9. Schlegel P. Causes of azoospermia and their management. Reproduction, Fertility and Development. 2004;16(5):561-72.
10. Hauser R, Sokol R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. Fertility and sterility. 2008;89(2):e59-e65.
11. Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, et al. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. Human Reproduction. 1999;14(3):628-35.
12. Tagelenbosch RA, de Rooij DG. 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. 1993;290(2):193-200.
13. Ginsburg M, Snow M, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development. 1990;110(2):521-8.
14. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes & development. 1999;13(4):424-36.
15. Ying Y, Qi X, Zhao G-Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(14):7858-62.
16. Klemm U, Müller-Esterl W, Engel W. Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. Human genetics. 1991;87(6):635-41.
17. Carrell DT, LIU L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. Journal of Andrology. 2001;22(4):604-10.
18. McKAY DJ, RENAUX BS, DIXON GH. Human sperm protamines. European Journal of Biochemistry. 1986;156(1):5-8.
19. Nolte J, Michelmann HW, Wolf M, Wulf G, Nayernia K, Meinhardt A, et al. PSCDGs of mouse multipotent adult germline stem cells can enter and progress through meiosis to form haploid male germ cells in vitro. Differentiation. 2010;80(4):184-94.
20. Mazaheri Z, Movahedin M, Rahbarizadeh F, Amanpour S. Generation of in-vitro spermatogonial stem cells following genetic manipulation of primordial germ-like cells. Avicenna journal of medical biotechnology. 2012;4(2):55.
21. Zanganeh BM, Rastegar T, Roudkenar MH, Kashani IR, Amidi F, Abolhasani F, et al.

sertoli cells in the presence of testosterone and FSH improved differentiation via up-regulation of post meiotic genes. Acta Medica Iranica. 2013;51(1):1.
22. Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. International Journal of Reproductive BioMedicine. 2013;11(7):537-44.
23. Maleki M, Ghanbarvand F, Mohammad Reza Behvarz ME, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. International journal of stem cells. 2014;7(2):118-26.
24. Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982–2002. Fertility and sterility. 2006;86(3):516-23.
25. Jarow J, Espeland M, Lipshultz L. Evaluation of the azoospermic patient. The Journal of urology. 1989;142(1):62-5.
26. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. Asian journal of andrology. 2012;14(1):82.
27. Goharbakhsh L, Mohazzab A, Salehkhou S, Heidari M, Zarnani A-H, Parivar K, et al. Isolation and culture of human spermatogonial stem cells derived from testis biopsy. Avicenna journal of medical biotechnology. 2013;5(1):54-61.
28. Chagastelles PC, Nardi NB, Camassola M. Biology and applications of mesenchymal stem cells. Science progress. 2010;93(2):113-27.
29. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell. 2008;132(4):598-611.
30. Izadyar F, Spierenberg G, Creemers L, Den Ouden K, De Rooij D. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction. 2002;124(1):85-94.
31. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 2004;427(6970):148-54.
32. Nayernia K, Nolte J, Michelmann Co-culture of spermatogonial stem cells with HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. Developmental cell. 2006;11(1):125-32.
33. Drusenheimer N, Wulf G, Nolte J, Lee JH, Dev A, Dressel R, et al. Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007;63:69.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2017; 8(2)

Original Article

Survey of expression of marker genes in spermiogenesis (Protamine1, Acrosin) in induced human spermatogonial stem cells for differentiation into sperm cells

Karami Sh, M.Sc, Maleki M, Ph.D *

- Department of Biology, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

* Email corresponding author: Maleki.masoud@gmail.com Maleki.masoud@iau,ac.ir,

Received: 10 Jul. 2017 Accepted: 5 Sep. 2017

Abstract

Aim: The aim of this study is to evaluate the spermatogonial stem cells differentiation into male gametes.

Materia and Methods: Spermatogonial stem cells were cultured in T25 flasks after the enzymatically isolation of the testicular biopsies through azoospermic patients. In the third passage, cells divided into 4 different groups and were treated for 1 to 4weeks under the effect of a medium containing extracts of sheep testes as inducer and then expression of sperm maturation genes: Acrosin and Protamine1 were investigated by using of western blotting technique.

Results: After spermatogonial stem cells treatment by the extracts of sheep testes, variations were seen in cell shape and they convert into sperm- like. Moreover, Acrosin and Protamine1 expression were confirmed.

Conclusion: examination of induced cells showed that Acrosin and Protamin1 were expressed. Since Acrosin and Protamine1 are the major proteins of the spermiogenesis, it could be concluded that these cells had been completed spermatogenesis stage and started the spermiogenesis stage.

Keywords: Acrosin ,Azoospermia, Protamine 1, Stem cells, Spermatogonial stem cells