

تغییرات ژنی طی تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به سلول‌های الیگوپروژنیتور

مریم نظم بجنوردی (PhD)*، منصوره موحدین (PhD)، تقی طریحی (PhD)

۱- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۹۶/۳/۳۱، اصلاح: ۹۶/۶/۱۵، پذیرش: ۹۶/۷/۱۱

خلاصه

سابقه و هدف: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و تولید سلول‌های پر توان (Embryonic Stem cells (ES like cells)، این سلول‌ها را به عنوان منبع کافی و جدیدی برای سلول درمانی و ترمیم بیماری‌ها از جمله بیماری‌های نورو دژنراتیو پیشنهاد می‌دهد. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی الگوی تغییرات ژنی طی تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی به سلول‌های پیش ساز الیگودندروسیت می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه موش نوزاد (۶-۲ روزه) هر بار ۱۰-۶ عدد موش توسط دو مرحله هضم آنزیمی جداسازی شدند. سلول‌های مورد مطالعه به سه گروه سلول‌های بنیادی شبه جنینی، نورو پروژنیتور و پیش ساز الیگودندروسیت تقسیم و مارکرهای اختصاصی *C-piwi2*, *mvh*, *stra8*, *Real Time-PCR* و روش *NG2*, *Olig2*, *Nestin*, *NF68*, *myc*, *Nanog* و روش ایمونوسیتوشیمی در هر مرحله تمایز بررسی شدند.

یافته‌ها: بررسی‌های مولکولی نشان داد که میزان افزایش بیان ژن *Nestin* در سلول‌های پیش ساز عصبی نسبت به سلول‌های شبه جنینی ۱/۳ برابر بود. در بررسی مولکولی در پایان مرحله دوم تمایز مشخص شد کشت در پایان مراحل القا منجر به افزایش معنی دار بیان ژنهای *Olig2* و *NG2* و کاهش بیان ژن *Nestin* می‌شود ($p < 0.05$). بررسی‌های مولکولی نشان داد که این افزایش در سلول‌های شبه الیگودندروسیت نسبت به سلول‌های پیش ساز عصبی به ترتیب ۱/۴ و ۱/۶ برابر بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که سلول‌های شبه جنینی پس از پیش القا توانایی بیان مارکرهای نرونی *NF68* و *Nestin* را دارند. سلول‌های بنیادین شبه جنینی ژن‌های *NG2* و *Olig2* پس از مرحله القا در سلول‌ها بیان شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرماتوگونی، تمایز، سلول‌های بنیادی جنینی، نورون، الیگودندروسیت.

مقدمه

ویژگی‌های پلوری پوتنسی به عنوان منبع کافی برای تولید سلولی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و ضایعات ژنتیکی پیشنهاد می‌دهند (۸-۱۰). سلول‌های اسپرماتوگونی قادر به تولید ES like cells هستند که ویژگی‌های مولکولی مشترکی با سلول‌های بنیادی جنینی داشته و از نظر پر توانی مانند سلول‌های بنیادی جنینی هستند و قادر به تولید ساختارهای شبه جنینی و تمایز به هر سه نوع لایه زایا می‌باشند (۲و۵). اما برخلاف سلول‌های بنیادی جنینی، استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، محدودیت‌های اخلاقی ندارد (۱۰). این ویژگی‌های اسپرماتوگونی استفاده این سلول‌ها را برای درمان‌های ترمیمی میسر می‌سازد (۳). همچنین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌توانند به عنوان منبع کافی و جدیدی برای سلول درمانی و ترمیم بیماری‌ها از جمله بیماری‌های نوروژنراتیو مانند دمیلینیشن (از بین رفتن غشاء سلول عصبی) اعصاب باشند (۲و۴). تولید سلول‌های گلیالی مرحله کلیدی در سلول درمانی بیماری‌های دمیلینیشن اعصاب است. منابع سلولی متنوعی به منظور ارتقا ترمیم میلین در این میان معرفی شده اند (۱۱ و ۱۲). خاصیت پرتوانی سلول‌های اسپرماتوگونی و قابلیت تمایز آنها به سلول‌های مختلف از جمله الیگودندروسیت، کار برد این سلول‌ها را جهت استفاده ترمیمی و بازسازی میلین در فیبرهای عصبی آسیب دیده پیشنهاد می‌دهد (۱۳). به طور مثال Shinohara و همکاران در سال

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی غشاء پایه لوله‌های اسپرم ساز قرار داشته و اطلاعات ژنتیکی را به نسل دیگر منتقل می‌کنند (۱). اگرچه گامتوژنیز نقش اصلی این سلول‌ها می باشد ولی نتایج اخیر الگوی ویژگی دیگری را نیز به این سلول‌ها مرتبط می‌دانند (۲). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد بدون نیاز به ایجاد تغییر ژنتیکی و پس از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط کشت آزمایشگاهی، کلنی‌های سلولی ES like cells (شبه سلول‌های بنیادی جنینی) ایجاد می‌شود که مشابه سلول‌های بنیادی جنینی بوده و دارای قابلیت خودترمیمی و تمایز به هر سه نوع لایه زایای جنینی (اکتودرمی، مزودرمی و آندودرمی) می‌باشند (۳). نظریه خاصیت پر توانی سلول‌های اسپرماتوگونی برای نخستین بار در سال ۲۰۰۴ پس از کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد عنوان شد به طوریکه که کلنی‌های سلولی ES like cells حاصله ویژگی‌های مولکولی مشترکی با سلول‌های بنیادی جنینی داشته و از نظر پر توانی مانند سلول‌های بنیادی جنینی بودند (۴-۶). کشت سلول‌های اسپرماتوگونی و تولید سلول‌های پر توان ES like cells منجر به افزایش بیان ژن‌های پر توانی نظیر *Oct4* و *C-myc*, *SOX2* می‌شود (۷). امروزه استراتژی‌های سلول درمانی متعددی با استفاده از منابع مختلف سلولی متنوع در دست بررسی اند (۹). مطالعات اخیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را با داشتن فعالیت تکثیر فراوان

این مقاله حاصل پایان نامه مریم نظم بجنوردی دانشجوی دکتری رشته علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر مریم نظم بجنوردی

آدرس: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی. تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۳۵۶۲

E-mail: bojnordim@yahoo.com

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت DMEM (ES medium) بوده که پس از بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ، در صورت نیاز تعویض محیط کشت انجام شد. سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی در محیط حاوی Fetal Bovine Serum = FBS، DMEM، Luckemia Inhibitory Factor = LIF، اسیدهای آمینه غیر ضروری ۱ درصد، بتا مکرانوتانول ۱mM و پنی سیلین/ استرپتومایسین ۱ درصد کشت داده شدند (۵). سلول‌ها هر هفته دو بار پاساژ داده شده و در پاساژ پنجم معادل هفته ۳ کشت جهت شکل‌گیری اجسام شبه جنینی استفاده شد.

شکل‌گیری اجسام شبه جنینی (EBs): جهت تولید اجسام شبه جنینی، با بکارگیری تریپسین، کلنی‌های حاصله از سلول‌ها به صورت سلول‌های مجزا شد و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. پس از شمارش سلولی تعداد 2×10^4 سلول به هر خانه از ظروف کشت ۶ خانه غیرچسبیده منتقل شد. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم FBS کشت داده شدند. LIF از محیط کشت حذف شد و سلول‌ها به مدت ۱ روز در 37°C انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت اجسام شبه جنینی تشکیل شده و جهت استفاده آماده بودند (۵).

تمایز سلول‌های شبه جنینی (EBs) به سلول‌های شبه الیگودندروسیت: جهت تمایز سلول‌های شبه جنینی به سلول‌های شبه الیگودندروسیت از یک پروتکل تمایزی ۲ مرحله‌ای استفاده شد (۵).

مرحله اول تمایز: القا سلول‌های نوروپروژنیاتور

مرحله دوم تمایز: القا سلول‌های شبه الیگودندروسیت

در مرحله اول، جهت القا سلول‌های پیش ساز عصبی از رتینوئیک اسید استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۴ روز در محیط DMEM حاوی رتینوئیک اسید ۱ میکرومولار و سپس به مدت ۴ روز دیگر در محیط DMEM فاقد رتینوئیک اسید کشت داده شد. جهت القا پری کاسور الیگودندروسیت سلول‌های پیش ساز عصبی حاصله به مدت ۸-۱۲ روز در محیط نوروبازال حاوی bFGF=basic EGF=Epidermal Growth factor 10 ng/ml Fibroblast Growth factor 20ng/ml کشت داده شد.

بررسی مولکولی تمایز به سلول‌های شبه الیگودندروسیت: پس از پایان مرحله اول تمایز جهت شناسایی سلول‌های پیش ساز عصبی، ژن nestin بررسی شد. همزمان در این مرحله تغییرات بیان ژنهای اختصاصی اسپرماتوگونی (stra8، mvh، piwil2) و مارکرهای پرتوانی Nanog و C-My نیز بررسی شدند. پس از پایان مرحله دوم تمایز نیز ژنهای خاص الیگودندروسیت شامل NG2 و Olig2 به همراه ژنهای اختصاصی اسپرماتوگونی (piwil2، mvh، stra8) و ژنهای Nanog و C-Myc و ژن nestin بررسی شدند.

بررسی ایمونوسیتوشیمی تمایز به سلول‌های شبه الیگودندروسیت: پس از پایان مرحله اول تمایز، قابلیت بیان مارکرهای پیش ساز عصبی، NF68 و Nestin و پس از پایان مرحله دوم تمایز، مارکرهای خاص الیگودندروسیت شامل NG2 و Olig2 با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند. در بررسی ایمونوسیتوشیمی مراحل کار مشابه قبل انجام شد.

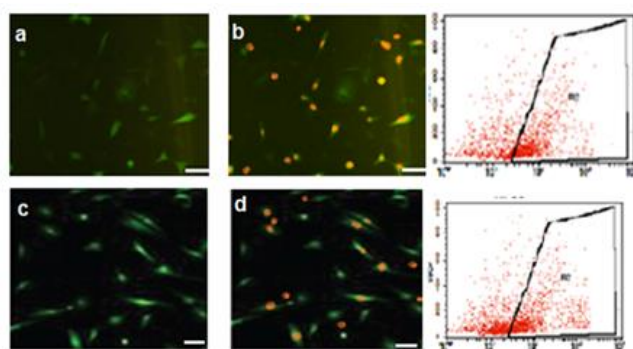
تجزیه و تحلیل آماری: تمام مقادیر بر حسب $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده است. اطلاعات به دست آمده توسط Student T-test و روش آماری آنالیز واریانس

۲۰۰۴، سلول‌های اسپرماتوگونی را به الیگودندروسیت تمایز داده و توانایی بازسازی میلین توسط آنها را تایید کردند (۴). در سال ۲۰۰۸، Glaser و همکارانش نشان دادند که سلول‌های الیگودندروسیت مشتق از اسپرماتوگونی توانایی ترمیم و بازسازی میلین را دارد (۱۳). با توجه به افزایش روز افزون بیماری‌های نورودژنراتیو مانند دمی‌لینیشن اعصاب نیاز مبرمی به شناسایی منابع جدیدی از سلول‌های بنیادی جهت ترمیم وجود دارد. در این زمینه سلول درمانی بر پایه استفاده از انواعی از سلول‌های بنیادی بنا نهاده می‌شود که به راحتی به دست آمده و همچنین بتوانند در محیط کشت تحت القاگرهای مناسب به سلول‌های پروژنیاتور میلین ساز تمایز یابند. با توجه به فعالیت تکثیری گسترده و خاصیت پرتوانی سلول‌های اسپرماتوگونی و قابلیت تمایز آنها به سلول‌های مختلف بویژه رده عصبی در تحقیق حاضر سعی شده است از سلول‌های اسپرماتوگونی موش به عنوان یکی از جدیدترین منابع سلول‌های بنیادی پرتوان در تولید سلول‌های پیش ساز الیگودندروسیت استفاده شود. از آنجاییکه این روند تمایزی همراه با طیف وسیعی از تغییرات ژنتیکی می‌باشد لذا هدف این پژوهش ارزیابی تغییرات ژنی طی این روند تمایزی سلول‌های اسپرماتوگونی موش به سلول‌های پیش ساز الیگودندروسیت می‌باشد.

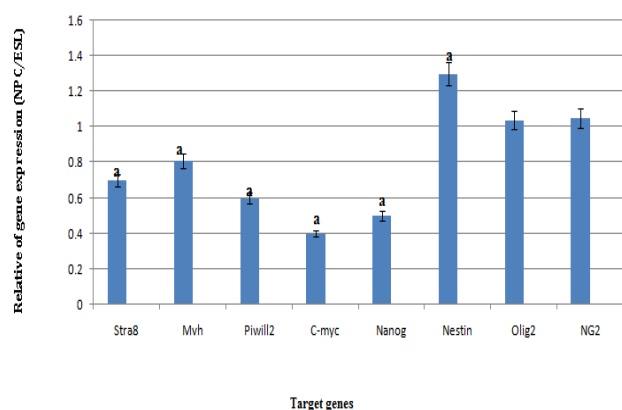
مواد و روش‌ها

استخراج سلول‌های اسپرماتوگونی: مطالعات این تحقیق در زمینه حیوانات آزمایشگاهی پس از تصویب کد اخلاق در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در این تحقیق تجربی از سلول‌های اسپرماتوگونی موش نوزاد (۲-۶ روزه) هر بار ۶-۱۰ عدد موش استفاده شد. سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه موش نوزاد توسط دو مرحله هضم آنزیمی و مکانیکی جداسازی شدند. در این مرحله پس از جداسازی کپسول، بیضه‌های موش‌های نوزاد ۲ تا ۴ روزه نژاد NMRI در محیط کشت حاوی آنزیم‌های لازم جهت هضم آنزیمی به طور مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. پس از ۱ ساعت، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی ساز به مدت ۵ دقیقه با سرعت 1200 RPM سانتریفیوژ شده و محیط بالای رسوب ته لوله با محیط DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) تازه جایگزین شد. این کار باعث حذف بینابینی، از قطعات بیضه شد (۱۰).

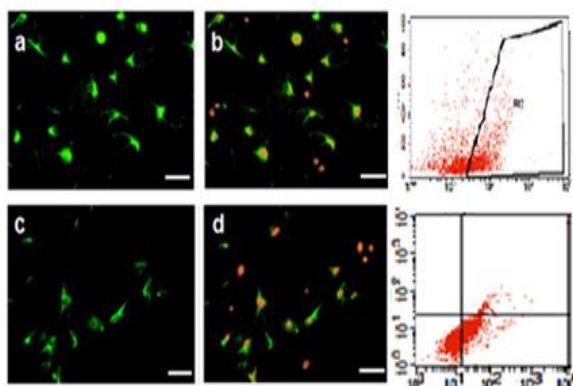
حاصل اولین مرحله هضم آنزیمی در انتهای این مرحله قطعات لوله‌های منی ساز بودند که برای هضم بیشتر وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شدند. به منظور جدا شدن سلول‌ها از قطعات لوله‌های منی ساز حاصل از اولین مرحله هضم آنزیمی، لوله‌ها در محیطی مشابه مرحله اول به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. در انتهای زمان انکوباسیون تعلیق فوق جهت جداسازی قطعات هضم نشده با سرعت معادل 400 RPM و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. قطعات هضم نشده لوله‌های منی ساز در ته لوله رسوب کرده و سلول‌های منفرد و برخی از تجمعات سلولی در بالای تعلیق قرار گرفتند. مایع سلولی بالای رسوب از فیلترهای نایلونی عبور داده شد. تعلیق حاصل عمده‌تاً حاوی سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، و تعداد کمی سلول‌های بافت بینابینی بود که در مراحل بعدی از یکدیگر جدا شدند (۱۰).



شکل ۲. رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی Nestin و NF68 در سلولهای تمایز یافته عصبی پس از مرحله تیمار با اسید رتینوئیک. یافته‌های ایمونوسیتوشیمی: بیان پروتئین‌های Nestin (a) و NF68 (c) در سلولهای تمایز یافته. رنگ آمیزی افتراقی هسته سلولها با اتیدیوم بروماید. 100μm Scale bar = (b,d).



شکل ۳. میزان تغییرات بیان ژن Nestin، ژنهای پلوری پوتنسی Nanog و C-Myc و ژنهای اختصاصی اسپرماتوگونی Stra8, Pivwil2, Mvh در سلولهای پیش ساز عصبی درمقایسه با سلولهای شبه جنینی. هر ستون میانگین ۳ تکرار را نشان می‌دهد و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلاف ها در نظر گرفته شده است. مقدار بیان ژنهای فوق در سلولهای شبه جنینی معادل ۱ در نظر گرفته شده است. a: افزایش یا کاهش معنادار پارامتر در سلولهای پیش ساز عصبی درمقایسه با سلولهای شبه جنینی



شکل ۴. رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی Olig2 و NG2 در سلولهای تمایز یافته گلیالی پس از مرحله دوم تمایز. یافته‌های ایمونوسیتوشیمی: بیان پروتئین‌های Olig2 (a) و NG2 (c) در سلولهای تمایز یافته. رنگ آمیزی افتراقی هسته سلولها با اتیدیوم بروماید. 100μm Scale bar = (b, d)

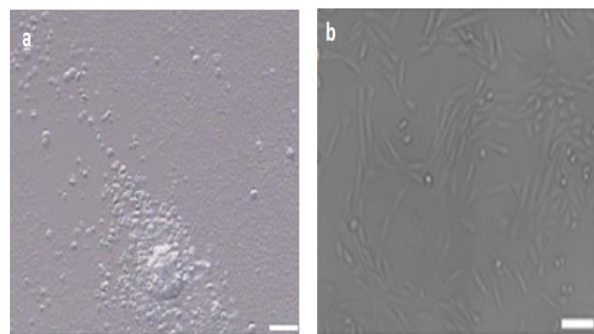
یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مورد مقایسه قرار گرفت. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی تمایز سلولهای بنیادی شبه جنینی به فنوتیپ سلولهای پیش ساز عصبی تحت اثر القایی اسید رتینوئیک: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای اسپرماتوگونیا در صورت انتقال به ظروف کشت غیر چسبنده و در غیاب لایه تغذیه کننده قادر به تولید اجسام شبه جنینی (EB) بودند (شکل ۱a). سلولهای بنیادی شبه جنینی، پس از پایان مرحله القا با RA ساختار شبه عصبی به خود گرفته، به طوریکه جسم سلولی آنها برجسته شده و دارای زواید و استطاله‌های سلولی شدند (شکل ۱b). لیکن بدون حضور RA درصد کمی از سلولها در نتیجه تمایز خود به خودی این فنوتیپ سلولی را نشان دادند؛ ولی در نتیجه اثر القایی RA تعداد این سلولها به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد.

ارزیابی میزان تمایز تحت اثر القایی اسید رتینوئیک به روش Real time-PCR: بررسی کمی بیان ژنها توسط ارزیابی های Real time PCR نشان داد تیمار سلول ها با اسید رتینوئیک منجر به افزایش بیان ژن Nestin و کاهش بیان ژنهای پرتوانی Nanog و C-Myc در سلولهای تمایز یافته (پیش ساز عصبی) می‌شود. بررسی‌های مولکولی نشان داد که میزان افزایش بیان ژن Nestin در سلول های پیش ساز عصبی نسبت به سلول های شبه جنینی ۱/۳ برابر بود (شکل ۳).

ارزیابی میزان تمایز تحت اثر القایی اسید رتینوئیک به روش ایمونوسیتوشیمی: به منظور ارزیابی میزان تمایز بعد از مرحله تیمار با اسید رتینوئیک بررسی ایمونوسیتوشیمی برای آنتی بادی‌های Nestin، NF68، انجام شد. نتایج تحقیق بیانگر بیان مارکرهای فوق در سلولهای تمایز یافته عصبی بود (شکل ۲). بررسی ایمونوسیتوشیمی پس از پایان مرحله دوم تمایز: در پایان مرحله دوم پروتکل تمایزی مجدداً بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی برای آنتی بادی های Olig2 و NG2 انجام شد. نتایج فوق مشخص کرد که سلولهای تمایز یافته در پایان مرحله القا نسبت به مارکرهای گلیالی Olig2 و NG2 ایمونوپوزیتیو بودند (شکل ۴).



شکل ۵. A: تصویر میکروسکوپ معکوس از اجسام شبه جنینی تشکیل شده از کشت سلولهای اسپرماتوگونیا در شرایط آزمایشگاه. B: Scale bar = 100 μm. C: فنوتیپ سلولهای پیش ساز عصبی پس از پایان مرحله القا با رتینوئیک اسید. Scale bar = 100 μm.

گسترده ای از ژنها را طی تبدیل سلولهای اسپرماتوگونی به ES like cells بررسی و گزارش کردند (۵ و ۱۵). در این تحقیق جهت تمایز سلولهای شبه جنینی به سلول های شبه الیگودندروسایت از القاگر اسید رتینوئیک استفاده شد. استفاده از القاگر اسید رتینوئیک برای تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای پیش ساز عصبی تکنیک رایجی است که به طور متداول مورد استفاده قرار می گیرد (۱۸-۱۶). Glaser و همکاران نتایج مشابهی را در زمینه تمایز فنوتیپ عصبی با استفاده از القاگر اسید رتینوئیک برای تمایز سلولهای بنیادی جنینی گزارش کردند (۱۳). در واقع RA متعلق به خانواده ویتامین A بوده و نقش ضروری در رشد و تکامل و تمایز در سیستم عصبی دارد (۲۰ و ۱۹).

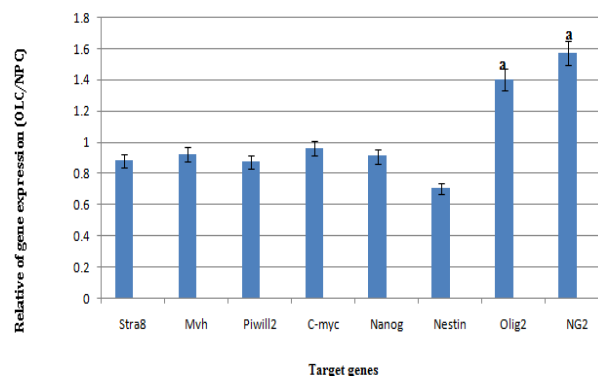
در مجموع تاثیر مثبت القاگر اسید رتینوئیک برای تمایز سلولهای بنیادی شبه جنینی در تحقیق حاضر موید شباهت ماهیت پروتوان این سلولها با سلولهای بنیادی جنینی و شباهت پروتکل آنها می باشد. نتایج بررسی های ژنتیکی در پایان مرحله دوم تمایز نشان دهنده بیان ژنهای Olig2 و NG2 در سلولهای شبه الیگودندروسایت و کاهش بیان ژن Nestin می شود. در واقع مارکرهای Olig2 و NG2 به عنوان مارکرهای اختصاصی سلولهای پیش ساز الیگودندروسیت (الیگوپروژنیاتور) بوده که می تواند موید ماهیت سلولهای گلیال تمایز یافته در تحقیق حاضر باشد. این تحقیق مشابه گزارش Glaser و همکاران در زمینه القا ES like cell در حضور فاکتورهای رشدی به سلولهای شبه عصبی و گلیالی بود (۱۳). پژوهش حاضر نشان دهنده قابلیت های تمایزی مشابهی بین دو تیپ سلولی ES like cells و ES توسط عوامل مختلفی نظیر فاکتورهای رشد سائتوکاینها و RA می باشد (۲۵-۲۱). در این زمینه تحقیقات قبلی نشان می دهد که سلول های بنیادی تحت القا فاکتورهای رشد به سلول های شبه عصبی و گلیالی تمایز می یابند (۲۷ و ۲۶). در تحقیقات دیگر سلول های بنیادی طی یک پروتکل تمایزی دو مرحله ای به سلول های شبه الیگودندروسیت تمایز پیدا کردند (۲۹ و ۲۸). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روند تمایزی سلولهای اسپرماتوگونی به سلولهای پیش ساز الیگودندروسیت در شرایط آزمایشگاهی مشابه تمایز سلولهای بنیادی جنینی بوده و همراه با طیف وسیعی از تغییرات ژنتیکی می باشد. پتانسیل استفاده از این منابع سلولی جدید برای درمان بیماریهای نورودژنراتیو مانند دمیلیتیشن اعصاب می تواند افقی در درمانهای ترمیمی باشد هرچند که تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز می باشد.

کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی منجر به ایجاد سلول های پر توان ES like cells می شود. سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش در محیط کشت توسط القاگر RA به سلول های پیش ساز عصبی تمایز می یابد. سلول های پیش ساز عصبی توسط القاگرهای مناسب به سلول های شبه الیگودندروسیت تمایز پیدا می کنند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از ستاد سلولهای بنیادی معاونت علمی ریاست جمهوری جهت گرنت مالی طرح فوق، کارشناسان محترم آزمایشگاههای علوم تشریحی جناب آقای بیرانوند و سرکار خانم دکتر ابراهیمی، تشکر و قدردانی می گردد.

بررسی کمی بیان ژنها پس از پایان مرحله دوم تمایز: نتایج واکنش زنجیره ای پلیمراز نشان دهنده بیان ژنهای Olig2 و NG2 در سلول های شبه الیگودندروسایت بود. در بررسی مولکولی در پایان مرحله دوم تمایز مشخص شد کشت در پایان مراحل القا منجر به افزایش معنی دار بیان ژنهای Olig2 و NG2 و کاهش بیان ژن Nestin می شود ($p < 0.05$). بررسی های مولکولی نشان داد که این افزایش در سلول های شبه الیگودندروسایت نسبت به سلولهای پیش ساز عصبی به ترتیب $1/4$ و $1/6$ برابر بود. (شکل ۵).



شکل ۵. میزان تغییرات بیان ژنهای Olig2، NG2، Nestin، ژنهای پلوری پوتنسی Nanog و C-Myc و ژنهای اختصاصی اسپرماتوگونی piwil2، mvh، stra8 در سلول های شبه الیگودندروسیت در مقایسه با سلول های پیش ساز عصبی. هر ستون میانگین ۳ تکرار را نشان می دهد و $p \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلاف ها در نظر گرفته شده است. مقدار بیان ژنهای فوق در سلول های پیش ساز عصبی معادل ۱ در نظر گرفته شده است. a: افزایش معنادار با سلول های پیش ساز عصبی.

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلول های اسپرماتوگونی در شرایط کشت آزمایشگاهی قادر به تولید اجسام شبه جنینی هستند. سلولهای پر توان فوق، پس از پایان مراحل القا فنوتیپ شبه عصبی و گلیالی را از خود نشان دادند که موید قابلیت تمایز نوروگلیالی آنها می باشند. تحقیقات انجام شده موجود نشان می دهد پس از کشت سلول های اسپرماتوگونی در محیط کشت، کلنی های سلولی شبه سلول های بنیادی جنینی ایجاد می شود که این سلول ها دارای قابلیت خود ترمیمی و تولید هر سه نوع لایه زایا می باشند (۶ و ۴). Guan و همکاران قابلیت تکثیر و تمایز سلول های قلبی حاصل از سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی را پس از پیوند در مدل های حیوانی گزارش کردند (۱۴).

پیشرفت های بعدی به حدی رسید که نظیر Kossak و همکاران و Mizrak و همکاران ظهور ES like cells را پس از کشت سلول های اسپرماتوگونی انسانی و تمایز آنها به هر سه نوع لایه زایای جنینی تایید کردند (۱۵ و ۶). افزایش بیان ژنهای پرتوانی نظیر Nanog و C-Myc و کاهش میزان بیان ژنهای اختصاصی اسپرماتوگونی نظیر piwil2، mvh، stra8 در سلول های شبه جنینی نسبت به سلولهای اسپرماتوگونی در پژوهش حاضر مشابه با نتایج Guan و همکاران و Kossak و همکاران می باشد که تغییرات طیف

Genetic Changes during Differentiation of Spermatogonial Stem Cells into Oligoprogenitor Cells

M. Nazm Bojnordi (PhD)*¹, M. Movahedin (PhD)¹, T. Tiraihi (PhD)¹

1. Department of Anatomical sciences, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 19(10); Oct 2017; PP: 35-41

Received: Jun 1st 2017, Revised: Sep 6th 2017, Accepted: Oct 3rd 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The culture of spermatogonial cells and the production of embryonic stem cells (ES-like cells), suggest these cells as a sufficient new source for cell therapy and for the treatment of diseases, including neurodegenerative diseases. The aim of this study is to evaluate the pattern of genetic changes during differentiation of spermatogonial cells into oligodendrocyte precursor cells.

METHODS: In this experimental study, spermatogonial cells were isolated from the testicles of 2 – 6 days old newborn mice (6 – 10 mice each time) through two stages of enzymatic digestion. The cells were divided into three groups of quasi-embryonic stem cells, neuro-progenitive and oligodendrocyte precursor. Specific markers *stra8*, *mvh*, *piwil2*, *C-myc*, *Nanog*, *NF68*, *Nestin*, *Olig2*, and *NG2* were evaluated using Real Time-PCR and immunocytochemistry method at each differentiation step.

FINDINGS: Molecular evaluations showed that increase in *Nestin* gene expression in neuronal precursor cells was 1.3 times more than quasi-embryonic stem cells. In the molecular evaluations at the end of the second stage of differentiation, it was determined that culture at the end of the induction steps resulted in a significant increase in the expression of the genes of *Olig2* and *NG2* and decrease in the expression of *Nestin* gene ($p < 0.05$). Molecular evaluations showed that this increase in oligodendrocyte-like cells was respectively 1.4 and 1.6 times more than neuronal precursor cells.

CONCLUSION: In this study, it was demonstrated that quasi-embryonic stem cells have the potential to express the *NF68* and *Nestin* neuron markers. The quasi-embryonic stem cells of *NG2* and *Olig2* genes were expressed in the cells after the induction stage.

KEY WORDS: *Spermatogonia, Differentiation, Embryonic Stem Cells, Neurons, Oligodendrocytes.*

Please cite this article as follows:

Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T. The Relationship between Tea and Coffee Consumption and Glioma: a systematic review. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(10):35-41.

* Corresponding author: M. Nazm Bojnordi(PhD)

Address: Department of Anatomical sciences, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 82883562

E-mail: bojnordim@yahoo.com

References

- 1.Olive V, Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *Int J Biochem Cell Bio.* 2005;37:246-50.
- 2.Mardanpour P, Guan K, Nolte J, Lee J, Hasenfuss G, Nayernia K, Wolfgang E. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *J Ana.* 2008;213(1):26-9.
- 3.Nayernia K, Lee J, Wolfgang E, Nolt J, Drusenheim From stem cells to germ cells and from germ cells to stem cells. *Iran J Reprod Med.* 2005;4:241-44.
- 4.Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell.* 2004;119(7):1001-12.
- 5.Guan G, Nayernia K, Lars M, Wagner S, Dressel R, Lee J H, Nolte J, Wolfgan E. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 2006;440:1199-203.
- 6.Mizrak SC, Chikhovskaya JV, Sadri Ardekani H, Van Daalen S, Korver C M. Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Reprod Biol.* 2010;25(1):158-67.
- 7.Nayernia K. Stem cells derived from testis show promise for treating a wide variety of medical conditions. *Cell Res.* 2007;17:895-7.
- 8.Ehmcke J, Wistuba J, Schlatta S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod.* 2006;12(3):275-82.
- 9.Donovan P, Miguel M. Turning germ cells into stem cells. *Gen Dev.* 2003;13:463-71.
- 10.Bojnordi MN, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. A simple co-culture system for generation of embryonic stem-like cells from testis, Iran. *Red Crescent Med J.* 2012;14(12):811-5.
- 11.Christoph H, Axel Z, Roland M. Stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008;255(6):43-7.
- 12.Karussis D, Kassis I. The potential use of stem cells in multiple sclerosis: An overview of the preclinical experience. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008;110(9):889-96.
- 13.Glaser T, Optis T, Kischlati T, Konang T, Sasse T, Bernd K, Engel W, Nayernia K, Brustle O. Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells.* 2008;26(9):2434-43.
- 14.Guan K, Wanger S, Unsold B, Lars S, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Hasenfuss G. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res.* 2008;100:1615-25.
- 15.Kossack N, Meneses J, Sheifi S, Nguyen H, Chavez S, Cory N, Gromoll G, Turek P, Reijo-pera R. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem cells.* 2009;27:138-49.
- 16.Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JI, Gottlieb D I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168(2):342-57.
- 17.Wagner M, Han B, Jessell T M. Regional differences in retinoid release from embryonic neural tissue detected by an in vitro reporter assay. *Dev.* 1992;116(1):55-66.
- 18.Maden M, Sonneveld E, Van der Saag PT, Gale E. The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Dev.* 1998;125(21):4133-44.
- 19.Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR. Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1044-51.
- 20.Bogler O. Isolation and purification of primary oligodendrocyte precursors. *Curr Protoc Neurosci.* 2001;18(2):45-9.
- 21.Rachel H, Woodruff R, Franklin J M. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. *Glia.* 1999;25(3):216-28.
- 22.Guazzo EP. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *J Clin Neurosci.* 2005;12(1):54-8.
- 23.Aditya GS, Chakrabarty A. Multiple sclerosis and demyelination. *Curr Diagn Pathol.* 2007;13(3):193-202.
- 24.Ghasemi Hamidabadi H, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, Forouzandeh M, Sobhani A. Functional Concentrations of BMP4 on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Primordial Germ Cells. *Int J Fertil Steril*, 2011; 5(2): 104–109

- 25.Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJ. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia*. 2001;35(3):204-12.
- 26.Sherafat MA, Heibatollahi M, Mongabadi S, Moradi F, Javan M, Ahmadiani A. Electromagnetic field stimulation potentiates endogenous myelin repair by recruiting subventricular neural stem cells in an experimental model of white matter demyelination. *J Mol Neurosci*. 2012;48:144-53.
- 27.Darabi S, Tiraihi T, Noori-zadeh A, Rajaei F, Abbaszadeh H, Darabi L. Creatine and retinoic acid effects on the induction of autophagy and differentiation of adipose tissue-derived Stem cells into GABAergic-like neurons. *J Babol Univ Med Sci*. 2017;19(8):41-9.[In Persian].
- 28.Ebrahimie M, Asgharzadih S, Shirzad H, Ebrahimie N, Hoseini M, Karimian kakolake M, et al. An evaluation of the influence of royal jelly on differentiation of stem cells into neuronal cells invitro. *J Babol Univ Med Sci*. 2016;18(3):38-44.
- 29.Nazm Bojnordi M, Ghasemi HH, Akbari E. Remyelination after lysophosphatidyl choline-induced demyelination is stimulated by bone marrow stromal cell-derived oligoprogenitor cell transplantation. *Cells Tissues Organs*. 2015;200(5):300-6.