مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۲۱۳/هفته سوم دی ماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۰ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۸/۲۴

اولین پیوند بین گونه‌ای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد– ذوب شده‌ی گوساله به بیضه‌ی موش در ایران

پیمان رحیمی فیلی[۱]، دکتر پرویز تاجیک[۲]، دکتر سید مرتضی کروجی[۳]، شیوا شفیعی[۱]، ماریا ذهیری[۴]

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در علم بیولوژی سلولی جایگاه مهمی دارند. مهم‌ترین کاربرد این سلول‌ها در درمان نازایی، تولید دام تراریخته و حفظ باروری در بیماران سرطانی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی امکان پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد– ذوب‌شده‌ی گوساله به موش مدل آزوسپرمی بوسولفان پس از ۲ هفته کشت و اثبات ماهیت بنیادی بودن سلول‌های به دست آمده با روش مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر بود.

روش‌ها: در این مطالعه سلول‌های اسپرماتوگونی از بیضه‌ی گوساله‌های ۳ تا ۵ ماهه استخراج شد و پس از انجماد در ضد یخ DMSO (Dimethyl sulfoxide) ذوب گردید و به مدت ۲ هفته در محیط کشت حاوی DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) و FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد در حضور ۴۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) کشت داده شد. سپس به وسیله‌ی پیوند این سلول‌ها به بیضه‌ی ۳ سر موش آزوسپرمی، ماهیت بنیادی بودن این سلول‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: درصد حیات سلول‌های تازه پس از مراحل جداسازی و افزودن محلول انجماد به ترتیب ۲/۴ ± ۸۷/۴ و ۳/۱ ± ۸۱/۸ بود. پس از انجماد این میزان به طور معنی‌داری کاهش یافت و به ۱/۷ ± ۶۵ درصد رسید ($P < ۰/۰۱$). ۱ ماه پس از انجام پیوند، بیضه‌ی پیوندی جدا و مقطع هیستوپاتولوژی از آن تهیه شد و با کمک میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید. سلول‌های اسپرماتوگونی نشاندار شده گوساله، در قاعده‌ی لوله‌های اسپرم‌ساز موش کلونیزه شده بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در میان سلول‌های اسپرماتوگونی کشت داده شده در این مطالعه حضور داشتند. همچنین پیوند بین گونه‌ای سلول‌های منجمد– ذوب‌شده‌ی گاوی به موش موفقیت‌آمیز بوده است. این اولین مورد گزارش پیوند زنوترانسپلنت (بین گونه‌ای گاو و موش) موفقیت‌آمیز در ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی اسپرماتوگونی، پیوند، بیضه، گوساله، موش مدل آزوسپرمی

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گروهی از سلول‌های بیضه‌ی پستانداران هستند که از قابلیت خودنوزایی و تمایز بالایی برخوردار می‌باشند. چنین سلول‌هایی هدف مناسبی برای دستکاری‌های ژنتیکی، تحقیقات درمانی و آزمایش‌های بیولوژیکی محسوب می‌شوند (۱). نکته‌ی قابل توجه درباره‌ی این سلول‌ها، دارا بودن قدرت انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعدی می‌باشد. تنها سلول‌های بنیادی بزرگسالان این خاصیت را دارند (۴-۲). شناسایی و جداسازی این سلول‌ها به دلیل نبود نشانگرهای اختصاصی سطحی سلول و تعداد به نسبت کم این سلول‌ها در بیضه مشکل می‌باشد (۷-۵). تکنیک پیوند یکی از راه‌های شناسایی این سلول‌ها می‌باشد.

[۱] دانشجوی دکتری، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پرویز تاجیک
Email: ptajik@ut.ac.ir

پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تکنیکی به نسبت جدید می‌باشد که در آن سلول‌های بیضه‌ی حیوان دهنده به بیضه‌ی حیوان مبتلا به آزوسپرمی به عنوان گیرنده منتقل می‌شود و سبب اسپرماتوژنز در بیضه‌ی گیرنده می‌گردد (۸، ۲). این تکنیک برای نخستین بار در سال ۱۹۹۴ در موش گزارش شد (۲). پس از موش این تکنیک در رت نیز با موفقیت به کار گرفته شد (۹). در سال ۲۰۰۲ نیز اولین مورد پیوند در حیوانات مزرعه‌ای و در گونه‌ی گاو با موفقیت ثبت گردید (۱۰). با استفاده از این تکنیک در حیوانات آزمایشگاهی نه تنها فرصت خوبی برای گسترش مطالعات جدید در زمینه‌ی اسپرماتوژنز و بیولوژی ریزمحیط (Niche) سلول‌های بنیادی به دست می‌آید، بلکه آزمایشی مناسب برای سنجش پتانسیل بنیادی بودن سلول‌های بنیادی انجام می‌گیرد. علاوه بر این، به عنوان راهکاری مناسب برای حفظ باروری جنس نر و تولید حیوان تراریخته مطرح می‌باشد (۱۲-۱۱).

در حال حاضر از Microinjection پیش هسته و انتقال هسته برای تولید حیوانات تراریخته استفاده می‌شود. هر دو روش دارای ضعف‌هایی هستند. دستکاری جنین، زمان‌بر بودن، افزایش احتمال تولید جنین‌های موزاییک و غول پیکر، عملکرد تا حدودی غیر انتخابی، کارایی ضعیف در بیان ژن انتقال یافته و درصد بالای نتایج غیر طبیعی از جمله ضعف‌های این دو روش هستند. بنابراین می‌توان تکنیک پیوند را به عنوان روشی بالقوه کم خطرتر، آسان‌تر و کاراتر برای تولید حیوانات تراریخته مطرح کرد (۱۵-۱۳). تکنیک پیوند کاربردهای مهمی در زمینه‌ی مطالعه و دستورزی در اسپرماتوژنز در بسیاری از گونه‌ها را فراهم می‌آورد. در سال‌های اخیر در تکنولوژی‌های مربوط به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، پیشرفت‌های چشمگیری روی داده و اغلب این پیشرفت‌ها مربوط به مطالعات روی حیوانات آزمایشگاهی بوده است. با وجود اهمیت اقتصادی صنعت پرورش گاو، دستیافت‌های مربوط به گاو در زمینه‌ی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی محدود بوده است. به همین دلیل زمینه‌ی گسترده‌ای جهت تحقیق در این مورد فراهم است (۱۶).

علاوه بر تولید حیوانات تراریخته (۱۷، ۵)، درمان سرطان (حفظ سلول‌های بنیادی در بیماران انکولوژیک)، درمان ناباروری و کنترل باروری در انسان (۵)، حفظ گونه‌ها و نژادهای حیوانی کمیاب و نادر و در حال انقراض (۱۷، ۵) و دستکاری‌های ژنتیکی و ایجاد حیوانات (گاوهای) دو رگه به منظور قابلیت سازگاری زیاد با شرایط اقلیمی متفاوت (۱۷) از دیگر کاربردهای تکنیک پیوند سلول‌های بنیادی است. دسترسی به تکنیک‌های جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی و ارزیابی پتانسیل بنیادی بودن آن‌ها به وسیله‌ی پیوند بدون شک راه‌های رسیدن به تحقیقات جدید در زمینه‌ی بیولوژی این سلول‌ها را هموارتر می‌کند و در نهایت منجر به درک بیشتر ما از فیزیولوژی اسپرماتوگونی و پیشرفت‌های بیشتر در زمینه‌ی تکنولوژی تولید مثلی و تومورشناسی خواهد شد (۵). این سلول‌ها از دیدگاه بیوتکنولوژی اهمیت ویژه‌ای دارند؛ چرا که تنها سلول‌های بنیادی بالغی هستند که می‌توانند اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل نمایند. بر اساس این قابلیت، امکان دستکاری‌های ژنتیکی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در خارج از بدن به منظور انتقال ژن‌های خاص به نسل بعد فراهم می‌شود و می‌تواند راهی برای ایجاد حیوانات تراریخته باشد. این روش از روش‌های انتقال

هسته و دستکاری سلول‌های بنیادی رویانی برای ایجاد حیوانات تراریخته، ساده‌تر و کاراتر به نظر می‌رسد (۱۶). تاکنون انواع مختلفی از پیوندها گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به پیوند درون گونه‌ای (۲۰-۱۸، ۱۰، ۳-۲)، خارج گونه‌ای (۲۱) و حتی پیوند اتولوگ (۱۰) در حیوانات مختلف اشاره کرد.

توسعه و پیشرفت در تکنیک انجماد آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات مزرعه‌ای، لازمه‌ی انجام تکنیک پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی در این گونه‌ها می‌باشد. انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، امکان بقای طولانی مدت این سلول‌ها را بدون ایجاد اثرات مخرب آشکار بر عملکردشان فراهم می‌سازد. انجماد بهترین روش برای حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است (۲۲). بازگرداندن و حفظ باروری برخی از حیوانات و گونه‌های با ارزش که قبل از رسیدن به بلوغ می‌میرند و یا دسترسی به اسپرم نریانی که اخته شده‌اند و در مراحل بعدی زندگی صفات برتر را نشان می‌دهند، اما دیگر دسترسی به اسپرم آن‌ها وجود ندارد، از جمله کاربردهای بالقوه و مهم تکنیک انجماد و پیوند بافت بیضه می‌باشد (۲۳).

هدف از انجام این مطالعه، اثبات بنیادی بودن سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد- ذوب‌شده‌ی گوساله به وسیله‌ی پیوند به موش مدل آزوسپرمی پس از گذراندن یک دوره‌ی کشت ۱۴ روزه‌ی موفقیت‌آمیز در محیط آزمایشگاه بود. لازم به یادآوری است که این اولین مورد پیوند بین گونه‌ای در ایران بود.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

موش‌های نر بالغ نژاد NMRI از مؤسسه‌ی رازی کرج خریداری شدند و در حیوان‌خانه‌ی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب نور و تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری گردیدند.

گوساله‌های نر ۵-۳ ماهه‌ی نژاد هولشتاین در مؤسسه‌ی تحقیقات دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری شدند. جیره‌ی غذایی آن‌ها استاندارد بود و در سلامت کامل به سر می‌بردند.

نمونه‌های آزمایشگاهی و جداسازی سلول‌های زاینده

هر بار نمونه‌گیری از پارانشیم بیضه‌ی ۱ رأس گوساله‌ی ۳ تا ۵ ماهه به روش بیوپسی باز (Testicular sperm extraction یا TESE) انجام شد (۴ گوساله). میانگین اندازه‌ی محیط دور بیضه‌ی گوساله‌ها ۱/۴ ± ۱۴/۲۵ سانتی‌متر بود. پس از اعمال ۱۲ ساعت منع غذایی با ایجاد آرام‌بخشی و بی‌حسی به وسیله زایلازین و لیدوکایین یک برش روی بیضه‌ی گوساله داده شد و نمونه (یک قطعه‌ی بافت ۱× ۱ × ۱ سانتی‌متر مکعب از لوله‌های منی‌ساز) در محیط DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Gibco, Paisley, UK) قرار گرفت و در مجاورت یخ در زمانی کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه حدود ۲۰ گرم از بافت بیوپسی‌شده در محیط کشت DMEM حاوی اسید آمینه‌ی غیر ضروری و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (Gibco, Paisley, UK)، به وسیله‌ی سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه شستشو داده شد. سپس محیط رویی دور ریخته شد. مرحله‌ی شستشو چند بار تکرار شد. پس از آن بافت به قطعات کوچک تقسیم شد و برای انجام مرحله‌ی اول هضم آنزیمی، محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز

نوع ۴ (Sigma-Aldrich, USA)، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ترپسین (Sigma-Aldrich, USA) و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیالورونیداز نوع ۲ (Sigma-Aldrich, USA) روی آن ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور لرزاننده (Wisecube®, Korea) با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی این مرحله محیط حاوی سلول‌ها و قطعات بافت بیضه به مدت ۱ دقیقه با دور g ۳۰۰ (معادل ۱۲۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ گردید. سپس محیط رویی رسوب سلول‌ها با DMEM تازه جایگزین شد تا وارد مرحله‌ی دوم هضم آنزیمی شود. در این مرحله نیز رسوب سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در محیطی مشابه مرحله‌ی اول در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن به کمک پیپت کردن به مدت ۵ دقیقه تجمعات سلولی موجود در تعلیق تا حد امکان خرد شد (۲۴).

طی مرحله‌ی اول هضم آنزیمی، بافت بینابینی از لوله‌های منی‌ساز و در مرحله‌ی دوم، سلول‌های تشکیل دهنده از لوله‌های منی‌ساز آزاد می‌گردند. مرحله‌ی آنزیمی با ریختن سرم (FBS, Gibco, Paisley, UK) خنثی شد. مرحله‌ی هضم آنزیمی، شستشو و سانتریفوژ با دور g ۳۰ (معادل ۴۰۰ دور در دقیقه) انجام گرفت و تعلیق سلولی آماده‌ی انجماد شد.

کشت، انجماد و ذوب سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوساله

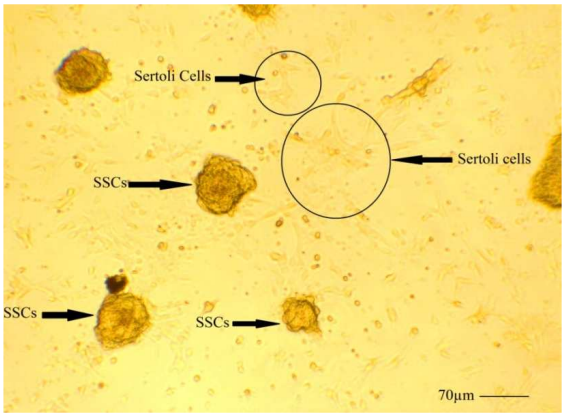
انجماد بر اساس روش ایزدیار و همکاران با کمی تغییرات انجام شد (۲۲)؛ بدین صورت که سوسپانسیون سلولی از قبل در حجم‌های ۰/۵ میلی‌لیتر الیکوت و آماده شد. سپس محلول مادر انجماد که متشکل از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۱/۴ مول دی متیل سولفوکسید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) و ۰/۰۷ مول سوکروز (Sigma-Aldrich, USA) بود و با غلظت X ۲ مهیا شده بود، بسیار آرام طی ۱۵-۱۰ دقیقه به شکل قطره قطره به تعلیق سلولی اضافه شد و به لوله‌های انجماد (Cryovial, TPP, Switzerland) ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس لوله‌ها به صورت خیلی آرام تکان داده شد تا محیط با سلول‌ها مخلوط شود. سپس ارزیابی درصد حیات سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو ۴ درصد و لام هموسایتومتر انجام شد. در مرحله‌ی بعد لوله‌ی انجماد حاوی سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ تا ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت به تانک نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال داده شد. برای دفریز کردن تعلیق سلولی منجمد، لوله‌ی انجماد از تانک نیتروژن مایع خارج شد و به مدت ۲ دقیقه در بن‌ماری ۳۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آرام آرام روی تعلیق سلولی محیط DMEM ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰۰ (معادل ۳۲۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ گردید و محیط رویی دور ریخته شد تا محلول انجماد که در این دما برای سلول‌ها حالت سمی داشت، خارج شود.

سپس رسوب سلولی در ۲ میلی‌لیتر DMEM و FBS ۱۰ درصد حل شد و به طور مجدد ارزیابی درصد حیات سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو ۴ درصد و لام هموسایتومتر انجام شد. پس از آن سلول‌ها در پتری دیش (Nunclon®, Denmark) استریل کشت داده

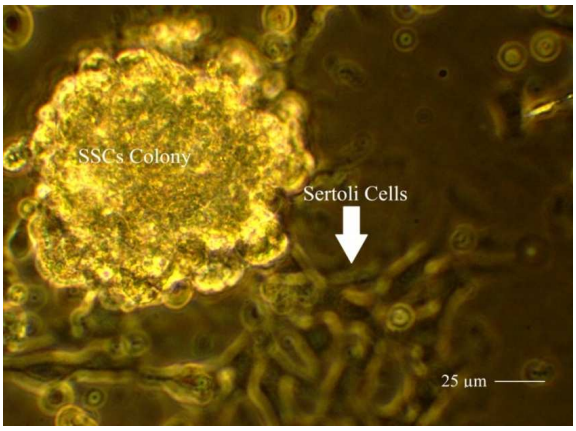
شدند (در هر ظرف حدود ۱۰ میلیون سلول ریخته شد) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ CO_2 درصد قرار داده شدند. هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد و محیط کشت تازه‌ی حاوی ۱۰ درصد سرم و ۴۰ نانوگرم در میلی‌لیتر GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) نوترکیب انسانی (Sigma, USA)، روی آن‌ها ریخته شد. در طی این مدت نیز وضعیت ظاهری کلونی‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japan) بررسی شد (شکل‌های ۱ و ۲). سلول‌ها در روز ۱۴ کشت از کف پتری دیش به وسیله‌ی ترپسین (۰/۲۵ درصد) کنده شد و پس از شمارش تعداد و ارزیابی درصد حیات به وسیله‌ی تریپان بلو ۴ درصد، به داخل لوله‌ی فالکون منتقل شد تا مراحل آماده‌سازی برای پیوند روی آن‌ها انجام شود.

نشان‌دار کردن سلول‌ها و پیوند بین گونه‌ای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گوساله

برای انجام پیوند از روش Ogawa و همکاران استفاده شد (۲۵). اسپرماتوژنز درون‌زاد موش‌ها به وسیله‌ی تزریق داخل صفاقی بوسولفان (به عنوان ماده‌ی آلکالین کننده) که در DMSO حل شده بود و هم حجم آن آب اضافه شده بود تا در نهایت به دوز ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برسد، متوقف شد. ۳۵ روز پس از تزریق بوسولفان، از بیضه‌ی موش‌های گیرنده، مقطع تهیه و به روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. حفره‌های ایجادشده در لوله‌های منی‌ساز، نشان‌دهنده‌ی از بین رفتن اسپرماتوژنز در بیضه است. شش هفته پس از تزریق بوسولفان از این موش‌های پذیرنده، جهت پیوند سلولی استفاده گردید. تعداد



شکل ۱. کلونی اسپرماتوگونی (Spermatogonial stem cells یا SSCs) و سلول‌های سرتولی (Sertoli cells) گاوی در روز دهم کشت. در سیستم هم‌کشتی، سلول‌های سرتولی فاکتورهای رشد و سایتوکاین مورد نیاز را برای تغذیه و رشد کلونی اسپرماتوگونی فراهم می‌کنند.



شکل ۲. کلونی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی گاوی با بزرگنمایی بیشتر

۱ میلیون سلول درون ۱ میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرم ریخته شد، سپس ۵ میکرولیتر محلول نشان‌دار کننده‌ی سلول (VybrantDiI cell-labeling solution™, USA) به تعلیق سلولی اضافه شد. بعد از آن لوله‌ی حاوی محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. لوله‌ی حاوی تعلیق سلولی به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی سلول‌ها با محیط تازه

جایگزین گردید (مرحله‌ی سانتریفوژ ۳ بار تکرار شد). لوله‌های حاوی سلول تا زمان پیوند، روی یخ نگهداری شدند.

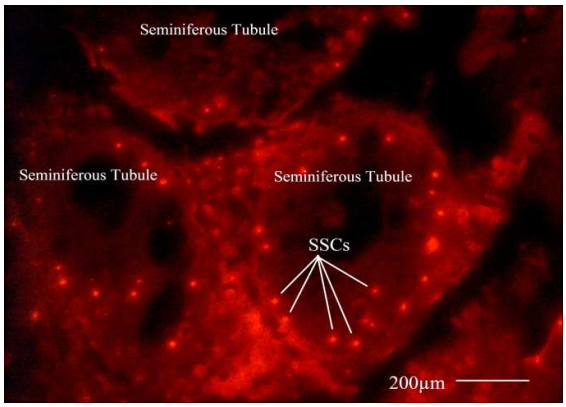
۰/۲ میلی‌لیتر از تعلیق سلولی به کمک میکروپیپت شیشه‌ای به Rete testis بیضه‌ی چپ موشی که از قبل تحت بیهوشی عمومی قرار گرفته بود، در زیر لوپ تزریق شد و بیضه‌ی راست به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و تزریقی داخل آن انجام نشد. موش‌ها یک ماه پس از پیوند Euthanize شدند و بیضه‌ی آن‌ها برای تهیه‌ی مقطع بافت‌شناسی جهت بررسی وضعیت پیوند برداشت شد. کلونیزاسیون سلول‌های اسپرماتوگونی گاوی از قبل نشان‌دار شده در قاعده‌ی لوله‌های منی‌ساز موش به وسیله‌ی میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

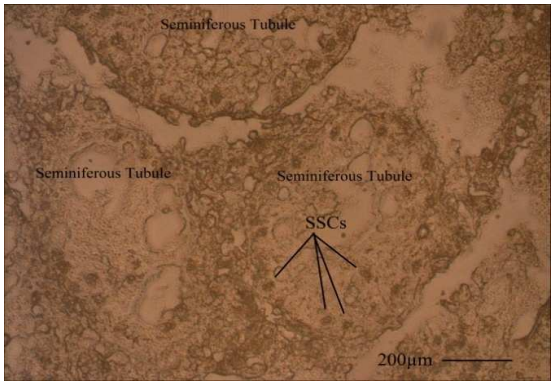
جهت بررسی اختلافات مشاهده شده در نتایج حاصل از درصد حیات سلول‌ها قبل و بعد از انجماد از آزمون آماری ANOVA همراه با آزمون‌های تکمیلی Tukey و Repeated measures با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۱ استفاده گردید.

یافته‌ها

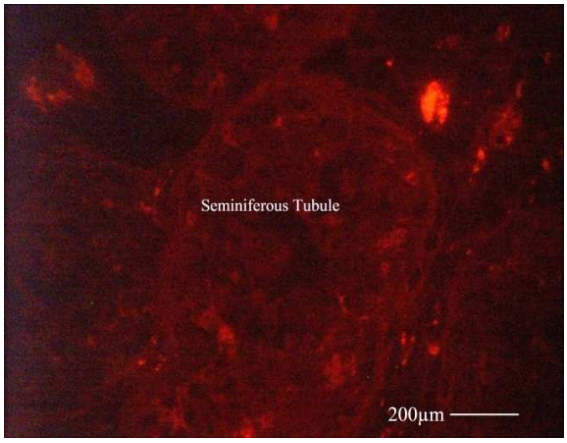
میزان حیات سلول‌های تازه پس از مراحل جداسازی ۲/۴ ± ۸۷/۴ درصد بود. درصد حیات این سلول‌ها پس از اضافه کردن محلول انجماد و قبل از سرد کردن (آزمون میزان سمیت محلول انجماد) به ۳/۱ ± ۸۱/۸ درصد کاهش یافت، اما تفاوت معنی‌داری با درصد حیات سلول‌های تازه نداشت و این نشان از عدم سمیت محلول انجماد برای سلول‌ها بود. همچنین میزان حیات سلول‌ها پس از انجماد به ۱/۷ ± ۶۵ درصد رسید که تفاوت معنی‌داری با درصد حیات سلول‌ها قبل و بعد از اضافه کردن محلول انجماد داشت ($P < ۰/۰۱$). در هر ۳ سر موش پیوند با موفقیت انجام شد. همان طور که در شکل‌های ۳ و ۴ دیده می‌شود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاو پس از پیوند در قاعده‌ی لوله‌های منی‌ساز موش‌های مبتلا به آزوسپرمی جای‌گیری کردند که نشان دهنده‌ی ماهیت بنیادی این سلول‌ها است. همچنین شکل‌های ۵ و ۶ مربوط به بیضه‌ی راست موش است که به عنوان بیضه‌ی شاهد در نظر گرفته شد و خالی از سلول اسپرماتوگونی می‌باشد.



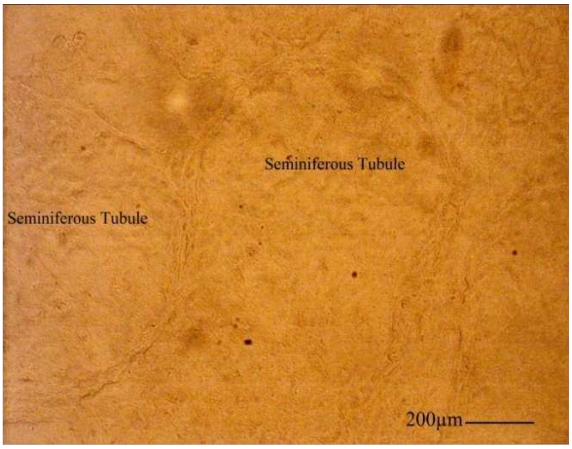
شکل ۳. مقطع هیستوپاتولوژیک بیضه‌ی موش ۱ ماه پس از پیوند. سلول‌های اسپرماتوگونی گاوی (Spermatogonial stem cells یا SSCs) در قاعده‌ی لوله‌های منی‌ساز (Seminiferous tubule) موش جای‌گیری کرده‌اند که نشان دهنده‌ی بنیادینگی این دسته از سلول‌ها است.



شکل ۴. حالت فاز کنتراست شکل ۲



شکل ۵. بیضه‌ی راست موش (گروه شاهد) فاقد سلول‌های زایا می‌باشد.



شکل ۶. حالت فاز کنتراست شکل ۴

بحث

انجماد بهترین روش برای حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است (۲۲). امروزه پروتکل‌های متفاوتی برای انجماد SSCs (Spermatogonial stem cells) در گونه‌های گاو (۲۶، ۲۲)، خوک و اسب (۲۶)، جوندگان (۲۸-۲۷)، انسان (۳۱-۲۹) صورت گرفته و میزان زنده ماندن و تزاید این سلول‌ها پس از انجماد به وسیله‌ی پیوند به موش ارزیابی شده و تا حدودی نتایج دلخواه در این زمینه به دست آمده است.

در این مطالعه نیز درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی از بافت بیضه ۲/۴ ± ۸۷/۴ بود و پس از اضافه کردن محلول انجماد این میزان به ۳/۱ ± ۸۱/۸ رسید؛ اگر چه روند کاهشی داشت، اما اختلاف معنی‌دار نبود. این مسأله نشان دهنده‌ی این است که محلول انجماد برای سلول‌ها حالت سمی نداشته است. به دلیل این که دی متیل سولفوکسید در دمای اتاق برای سلول‌ها حالت سمی دارد، همیشه باید پس از اضافه کردن محلول انجماد درصد حیات را سنجید، اما پس از انجماد درصد حیات سلول‌ها به ۱/۷ ± ۶۵ رسید که تفاوت معنی‌داری با درصد حیات سلول‌های تازه داشت. به طور معمول در بهترین حالت درصد حیات ۷۰ درصد گزارش شده است (۲۲). با توجه به این که در این مطالعه سلول‌ها پس از انجماد به مدت دو هفته کشت و برای پیوند با موفقیت استفاده شدند، صحت پروتکل انجماد تأیید می‌گردد.

در موفقیت تکنیک پیوند سه عامل مهم ایفای نقش می‌کنند: ۱- تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی موجود در تعلیق سلولی تا حد امکان زیاد باشد، ۲- بیضه‌ی حیوانات گیرنده تا حد امکان عاری از اسپرماتوژنز درون‌زاد باشد و در عین حال سلول‌های سوماتیک آن سالم باشند تا بتوانند سلول‌های دریافتی را از نظر غذایی و ساختاری حمایت کنند و ۳- سلول‌ها با روشی مناسب به درون لوله‌های گیرنده منتقل شوند (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر از گوساله‌ی ۵-۳ ماهه به عنوان دهنده استفاده شد. در این سن، اغلب سلول‌های موجود در بیضه، اسپرماتوگونی نوع A می‌باشند که ۱/۳ درصد آن‌ها سلول بنیادی اسپرماتوگونی است. انتظار می‌رود از هر گرم بافت بیضه‌ی گاو، ۱۰ هزار سلول بنیادی اسپرماتوگونی تخلیص شود (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر پیوند سلول‌های بنیادی

اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده‌ی گوساله در قاعده‌ی لوله‌های منی‌ساز موش مشاهده شد که با نتایج تحقیقات محققین دیگر در این زمینه همخوانی دارد؛ از جمله، Oatley و همکاران سلول‌های تازه‌ی بیضه‌ی گاو را به موش‌های Nude پیوند زدند و پس از ۲ هفته دیده شد که سلول‌های اسپرماتوگونی گاو در لومن لوله‌های منی‌ساز موش کلونیزه شدند (۳۲). در مطالعه‌ی Aponte و همکاران سلول‌های اسپرماتوگونی گاو ۲ ماه پس از پیوند در غشای پایه‌ی لوله‌های منی‌ساز موش ردیابی شد (۳۳).

ایزدیار و همکاران نیز طی یک مطالعه، سلول‌های تازه‌ی بیضه‌ی گوساله‌های ۷-۵ ماهه را به موش مدل پیوند زدند و ۳ ماه بعد، کلونی سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A را در بیشتر مقاطع بافت‌شناسی تهیه شده از بیضه‌ی موش‌های گیرنده مشاهده کردند (۲۱). همچنین آن‌ها در مطالعه‌ای دیگر کارایی پیوند اتولوگ و همولوگ را در گونه‌ی گاو بررسی کردند و نتیجه گرفتند که پیوند اتولوگ با موفقیت انجام شده است، در حالی که پیوند همولوگ کارایی لازم را نداشته است (۱۰). در حالی که در جایی دیگر میزان موفقیت پیوند اتولوگ و همولوگ در بز (۳) و خوک (۱۸) برابر بوده است. ممکن است عدم موفقیت پیوند همولوگ در گاو به علت پس زدن پیوند به وسیله‌ی دستگاه ایمنی باشد؛ چرا که در این سن سد خونی- بیضوی شکل گرفته است. در موش نیز چنانچه گیرنده‌ی پیوند همولوگ بالغ باشد، پیوند رد می‌شود؛ اما اگر گیرنده نابالغ باشد، اسپرماتوژنز به طور کامل برقرار می‌شود.

Herrid و همکاران با پیوند سلول‌های بیضه‌ی گاو نژاد Bos Taurus ۷-۵ ماهه به گاو نژاد BosIndicus ۱۱-۵ ماهه، نتیجه‌ی این پیوند هترولوگ را موفقیت‌آمیز اعلام کردند (۳۴) و دلیل عدم موفقیت ایزدیار و همکاران را در انجماد سلول‌ها پیش از پیوند و استفاده از رادیوتراپی برای از بین بردن اسپرماتوژنز برون‌زاد عنوان کردند. با توجه به مطالعه‌ی حاضر این دلیل نمی‌تواند قانع کننده باشد؛ چرا که ما در این تحقیق از سلول‌های منجمد- ذوب‌شده‌ی گوساله با موفقیت برای پیوند در موش استفاده کردیم و با توجه به فاصله‌ی فیلوژنیک گاو و موش بعید به نظر می‌رسد که دلیل رد پیوند در مطالعه‌ی ایزدیار و همکاران استفاده از سلول‌های منجمد باشد.

ممکن است دستگاه ایمنی گاو در رد پیوند پیشرفته‌تر و اختصاصی‌تر از موش عمل کند و این موضوع بی‌ربط با آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی نباشد. حتی می‌توان اظهار کرد روش انجمادی که در این مطالعه به کار رفت، به صورت اختصاصی برای اسپرماتوگونی‌های A تنظیم شده است و میزان زنده ماندن این سلول‌ها پس از انجماد با این روش بهتر از روش‌های دیگر بود و خواه ناخواه به موفقیت پیوند که تابعی از تعداد سلول‌های بنیادی است کمک کرد. تاکنون موارد متعددی از پیوندها گزارش شده است که هر یک به دلیلی موفقیت‌آمیز یا ناکارامد بوده‌اند. اما قابل ذکر است که تنها در پیوند موش به موش (۳۶-۳۵، ۲)، رت به رت (۳۷، ۲۰) و بز به بز (۳) توانسته‌اند به نتاج تراریخته برسند؛ اگرچه مطالعات در پیوند گوسفند به گوسفند (۳۸) نیز نتایجی به دست آورده‌اند، اما هنوز به مرحله‌ی تراریخته نرسیده‌اند.

در پیوند گاو به گاو (۱۰)، سگ به سگ (۱۹)، خوک به خوک (۳۹)، رت به موش (۴۰) و همستر به موش (۴۱) هم یک مرحله از گوسفند عقب هستند؛

یعنی اسپرماتوزوا تولید شده است، اما هنوز به نتایج نرسیده‌اند. پیوند خرگوش (۴۲)، اسب (۲۶)، سگ (۴۲)، گاو (۲۶)، خوک (۲۶) و بابون (۴۳) به موش هنوز در مرحله‌ی کلونیزاسیون در قاعده‌ی لوله‌ها باقی مانده است و اسپرماتوژنز تا مراحل پیشرفته‌تر پیشروی نکرده است، اما امیدها در این زمینه همچنان باقی است و شواهد دال بر این است که در آینده کارایی این عمل بهتر می‌شود. انتظار می‌رود که تحقیقات در این زمینه بیشتر بر روی عوامل مرتبط با درصد موفقیت تکنیک و تبدیل آن به روشی کاربردی محدود شود، به خصوص تمرکز بر روی بازدهی بیشتر اسپرم تولیدی با این روش مهم‌ترین درخواست از محققان می‌باشد. زمینه‌ی دیگر که جای تقویت آن وجود دارد تلاش برای انتقال سلول‌های ژرم بدون استفاده از ویروس است که در تولید حیواناتی که مصرف انسانی دارند مهم می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و موفقیت پیوند سلول‌های منجمد- ذوب شده، ماهیت بنیادی سلول‌های اسپرماتوگونی استخراج شده با این روش اثبات می‌شود.

همچنین امیدها برای پیوند موفقیت‌آمیز زنوژنیک (بین گونه‌ای) با استفاده از سلول‌های منجمد که حتی به صورت طولانی مدت نگهداری شده‌اند تا مرحله‌ی تولید اسپرم کارا قوت می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیریت محترم قطب کاربرد سلول‌های بنیادی در سلول درمانی و مهندسی بافت دانشگاه تهران که هزینه انجام این طرح را متقبل شدند و همچنین از آقایان مهندس موسوی مدیر داخلی واحد مؤسسه تحقیقاتی دانشکده‌ی دامپزشکی تهران، مهندس عیسی‌نژاد کارشناس بخش جراحی، دکتر لکزیان، دکتر زمانی و دکتر راغ که در امر نمونه‌گیری و انجام این تحقیق ما را یاری کردند، کمال تشکر را به جا آورند.

References

1. Hofmann MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. Mol Cell Endocrinol 2008; 288(1-2): 95-103.
2. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(24): 11303-7.
3. 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(4): 1260-4.
4. Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. Methods Cell Biol 2008; 86: 59-84.
5. Meachem S, von S, V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective. Reproduction 2001; 121(6): 825-34.
6. Shinohara T, Brinster RL. Enrichment and transplantation of spermatogonial stem cells. Int J Androl 2000; 23 (Suppl 2): 89-91.
7. Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL. Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Development 2009; 136(7): 1191-9.
8. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(24): 11298-302.
9. Jiang FX, Short RV. Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. Int J Androl 1995; 18(6): 326-30.
10. Izadyar F, Den OK, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DP, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduction 2003; 126(6): 765-74.

11. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. Science 2002; 296(5576): 2174-6.
12. Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. Science 2007; 316(5823): 404-5.
13. Clark AJ, Bissinger P, Bullock DW, Damak S, Wallace R, Whitelaw CB, et al. Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. Reprod Fertil Dev 1994; 6(5): 589-98.
14. Wilmut I, Paterson L. Somatic cell nuclear transfer. Oncol Res 2003; 13(6-10): 303-7.
15. Dinnyes A, de Sousa P, King T, Wilmut I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. Cloning Stem Cells 2002; 4(1): 81-90.
16. Aponte PM, De Rooij DG. Biomanipulation of bovine spermatogonial stem cells. Anim Reprod 2008; 5(1/2): 16-22.
17. Hill JR, Dobrinski I. Male germ cell transplantation in livestock. Reprod Fertil Dev 2006; 18(1-2): 13-8.
18. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod 2002; 66(1): 21-8.
19. Kim Y, Turner D, Nelson J, Dobrinski I, McEntee M, Travis AJ. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. Reproduction 2008; 136(6): 823-31.
20. Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, et al. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(23): 14931-6.
21. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, Den OK, De Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction 2002; 124(1): 85-94.
22. Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, Den OK, Creemers LB, Woelders H, De Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. J Androl 2002; 23(4): 537-45.
23. Honaramooz A, Yang Y. Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. Vet Med Int 2010; 2011.
24. van Pelt AM, Morena AR, van Dissel-Emiliani FM, Boitani C, Gaemers IC, De Rooij DG, et al. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. Biol Reprod 1996; 55(2): 439-44.
25. Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. Int J Dev Biol 1997; 41(1): 111-22.
26. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. Mol Reprod Dev 2000; 57(3): 270-9.
27. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell 1998; 30(4): 389-97.
28. Brinster RL. Embryo culture, stem cells and experimental modification of the embryonic genome. An interview with Professor Ralph Brinster.. Interview by Juan Arechaga. Int J Dev Biol 1998; 42(7): 861-78.
29. Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. Fertil Steril 2001; 75(2): 269-74.
30. Keros V, Hultenby K, Borgstrom B, Fridstrom M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. Hum Reprod 2007; 22(5): 1384-95.
31. Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Hoyer PE, Mollgard K, Yding AC. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. Hum Reprod 2006; 21(2): 484-91.
32. Oatley JM, de Avila DM, McLean DJ, Griswold MD, Reeves JJ. Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. J Anim Sci 2002; 80(7): 1925-31.
33. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, De Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. Theriogenology 2006; 65(9): 1828-47.
34. Herrid M, Vignarajan S, Davey R, Dobrinski I, Hill JR. Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. Reproduction 2006; 132(4): 617-24.
35. Honaramooz A, Megee S, Zeng W, Destrempes MM, Overton SA, Luo J, et al. Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. FASEB J 2008; 22(2): 374-82.
36. Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(23): 13090-5.
37. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Lin CC, Chang LJ, Avarbock MR, et al. Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. J Androl 2007; 28(2): 353-60.
38. Herrid M, Olejnik J, Jackson M, Suchowerska N, Stockwell S, Davey R, et al. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell

transplantation in sheep. Biol Reprod 2009; 81(5): 898-905.
39. Mikkola M, Sironen A, Kopp C, Taponen J, Sukura A, Vilkki J, et al. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. Reprod Domest Anim 2006; 41(2): 124-8.
40. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. Nature 1996; 381(6581): 418-21.
41. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. Biol Reprod 1999; 60(2): 515-21.
42. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. Biol Reprod 1999; 61(5): 1331-9.
43. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. Biol Reprod 2001; 64(5): 1409-16.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 213, 3rd week, January 2013 Received: 10.9.2012 Accepted: 14.11.2012

Successful Transplantation of Frozen-thawed Calf Spermatogonial Stem Cells to the Mouse Testis

Peyman Rahimi-Feyli MSc[1], Parviz Tajik PhD[2], Morteza Koruji PhD[3], Shiva Shafiei MSc[1], Maria Zahiri MSc[4]

Abstract

Background: Spermatogonial stem cells (SSCs), the only adult stem cells capable of transferring genetic information to the next generation, are important in cell biology. The most important applications of these cells include the treatment of infertility, fertility preservation of oncological patients, and the creation of transgenic animals. The aim of this study was to evaluate the possibility of transplantation of frozen-thawed bovine spermatogonial cells to the testis of an azoospermic mouse model and to prove the presence of spermatogonial stem cells among bovine spermatogonial cells isolated and proliferated by methods used in the study.

Methods: Spermatogonial cells were isolated from 3 to 5 month-old bull calves and then were frozen-thawed. Subsequently, the cells were cultured in the presence of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF 40 ng/ml) for 2 weeks. The stemness of these cells was evaluated by transplanting them to the testis of azoospermic mouse models.

Findings: The viability rate of fresh cells and frozen cells after thawing were 87.4 ± 2.4 and 65 ± 1.7, respectively, that corresponds to a significant difference ($P < 0.01$). After one month, the mice were euthanized and the histopathological evaluation of their testes with fluorescent microscope showed the colonization of marked bovine SSCs in the mouse seminiferous tubules.

Conclusion: In our knowledge, this is the first reported case of xenotransplantation in Iran. The results of this study showed that the xenogeneic transplantation of calf frozen-thawed spermatogonial cells to the mouse testis has been successful and SSCs were present among the transplanted cells.

Keywords: Spermatogonia, Stem cell transplantation, Testis, Animal models

[1] PhD Student, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Cellular and Molecular Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] PhD Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Parviz Tajik PhD, Email: ptajik@ut.ac.ir