انتقال ژن Enhanced green florescent protein به کلونی اسپرماتوگونی گوساله با استفاده از Turbofect

گلشید جاودانی‌شاهدین[۱]، پرویز تاجیک*[۱]، حمید قاسم‌زاده‌نوا[۱]، منصوره موحدین[۲]

چکیده

در بالغین، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی(SSCs) تنها سلول‌های بنیادی هستند که قادر به انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد می‌باشند. با در نظر گرفتن این که یک SSC منفرد می‌تواند به تعداد زیادی از اسپرماتوزوآ تبدیل شود، دستکاری ژنتیکی این سلول‌ها، یک تکنولوژی نوین با کاربردهای عملی در گونه‌های مختلف حیوانی را مهیا می‌سازد. در این مطالعه ارزیابی انتقال ژن Enhanced Green Fluorescent Protein(EGFP) به کلونی‌های اسپرماتوگونی گاوی از طریق نوعی حامل پلی مری به نام Turbofect و تعیین بهترین روز انکوباسیون در جذب ژن توسط کلونی‌های اسپرماتوگونی بررسی شد. کارایی انتقال ژن خارجی EGFP به SSCs از طریق حامل Turbofect در سه روز از شروع کشت کلونی‌های اسپرماتوگونی (روز۸ و ٦، ٤) توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوفلورسنت علیه مارکرهای OCT4 و Vimentin، ماهیت SSCs و سلول‌های سرتولی را تایید کرد. نتایج نشان داد که کلونی‌های ترانسفکت شده از طریق Turbofect در هر سه روز انجام ترانسفکشن در مقایسه با گروه‌های شاهد به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). کلونی‌های ترانسفکت شده با Turbofect در مقایسه با گروه‌هایی که تنها حاوی ژن خارجی بدون حامل بودند نیز بالاتر بود (معنی‌دار). بیشترین میزان کلونی‌های ترانسفکت شده زمانی بدست آمد که ترانسفکشن در روز ٤ کشت انجام شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که Turbofect می‌تواند به منظور انتقال مستقیم DNA خارجی به کلونی اسپرماتوگونی به ویژه در روز ٤ کشت به صورت ایمن به کار رود.

واژگان کلیدی: *سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، Turbofect، ترانسفکشن*

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/٦ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پایه و اساس تولید مداوم اسپرماتوزآ در بزرگسالی هستند. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه بسیار کم است (تقریبا ۱ سلول در ۳۰۰۰ سلول) و دو وظیفه مهم بر عهده دارند: ۱) تمایز و تولید نسل‌های پیشرفته‌تر سلول‌های زایا که اسپرماتوزآ را تکمیل می‌کنند و باروری را حفظ می‌کنند. ۲) خودنوسازی بمنظور حفظ ذخایر سلولی(۵). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند، زیرا تنها سلول‌های بنیادی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می کنند. بنابراین دستکاری رده سلولی زایای جنس نر از طریق دستکاری این سلول‌ها امکان پذیر می‌شود. این قابلیت به ما امکان دستکاری و تغییر فنوتیپ نتاج از جمله تصحیح جهش هایی که باعث بیماریهایی همچون اوتیسم، دیابت، سندرم داون و بیماری قلبی را می‌شود می‌دهد. هم چنین این سلول‌ها مستقیما در باروری سهیم هستند. اختلال در مسیر این سلول‌ها بر روند اسپرماتوژنز تاثیر منفی دارد و سبب کاهش باروری و ناباروری می‌شود (۱۰و ۷، ۱).

تراریخت کردن شامل انتقال یک توالی DNA خارجی به داخل ژنوم یک موجود خاص است که پس از آن در بیشتر سلول‌های آن موجود وجود داشته باشد و به نسل بعد منتقل شود. موجود تراریخت ممکن است با اهداف درمانی و یا تحقیقاتی ایجاد شود. هدف از تولید یک حیوان تراریخت ممکن است ساخت یک پروتئین جدید در آن موجود، افزایش تولید یک پروتئین از قبل موجود، و یا سرکوب یک ژن داخلی و جلوگیری از تولید یک پروتئین باشد(۱۸ و ۱٤).

انواع روش‌های انتقال ژن به سلول‌های زایا شامل روش‌های ویروسی و روش‌های غیرویروسی است. تا به حال از حاملینی بر پایه رتروویروس، لنتی ویروس، آدنو/هرپس ویروس در انتقال ژن استفاده شده است. عموما حامل ویروسی نوترکیب

۱*ـ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران ptajik@ut.ac.ir
۲ـ گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

Archive of SID
www.SID.ir

توسط جابه جائی جزئی ژنوم ویروس با ژن‌های درمانی تولید می‌شود. اگر چه یک حامل ویروسی می‌تواند سلول‌ها را با کارایی نسبتا خوب آلوده کند، ریسک رونویسی از ژن‌های ویروسی و اتصال این ژن‌ها به ژنوم میزبان هم چنان وجود دارد. همچنین تولید ذرات ویروسی نیازمند تخصص و مهارت بالایی است. حاملین غیر ویروسی همانند پلاسمیدهایی که می‌توانند به داخل سلول‌ها از طریق انتقال لیپوزوم یا الکتروپورشن وارد شوند در دسترس‌اند. این حاملین در بدن موجود زنده بدون خطر بوده و کاربرد راحت دارند. ترانسفکشن موفقیت‌آمیز با حاملین غیر ویروسی به ویژه در پیوند به کار گرفته شده است. بهترین کاندیدها به عنوان هدف برای انتقال ژن غیر ویروسی، سلول‌هایی با پتانسیل تکثیر و خودنوزایی می‌باشند. بنابراین، سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ به عنوان منابع جالب برای سازوکارهای غیرویروسی در نظر گرفته می‌شوند(۱۵ و۱۱، ٤).

Turbofect یک محلول استریل از پلیمر کاتیونیک می‌باشد. این پلیمر که متشکل از کمپلکس‌هایی پایدار و فشرده است با شارژ مثبت با DNA خارجی باعث تسهیل ورود ژن به داخل سلول‌های یوکاریوتیکی می‌شوند. پروتئین فلورسنت سبز (GFP) یکی از پروتئین‌های ثانویه است که اولین بار از چتر دریایی بدست آمده است. ویژگی‌های منحصر بفرد این پروتئین باعث شده تا پروتئین سبز فلورسنت بیش از هر ژن گزارشگر دیگری در مطالعات مولکولی استفاده شود(۳).

هدف از انجام این طرح، بررسی انتقال ژن Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) به کلونی اسپرماتوگونی توسط روش غیرویروسی لیپوفکشن و بدست آوردن بهترین روز انکوباسیون در بالاترین میزان جذب ژن خارجی توسط سلول‌های اسپرماتوگونی گاوی می‌باشد.

مواد وروش کار

حیوانات: در این مطالعه، ۵ گوساله نر نژاد هلشتاین ۳تا۵ ماهه به عنوان دهنده استفاده شدند. در زمان بیوپسی، محیط اسکروتوم بین cm ۱۳ تا ۱۵ بود. حیوانات طبق آیین‌نامه کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه تهران نگهداری و رفتار شدند.

بدست آوردن نمونه بیضه

در این مطالعه با استفاده از روش استخراج اسپرم از بیضه (TESE)، نمونه بیوپسی mm ۳×۳ از بیضه ۵ راس گوساله نر گرفته شد و این نمونه‌ها داخل محیط کشت DMEM در عرض ۲ ساعت همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی سلول

سلول‌های لوله‌های منی‌ساز در دو مرحله هضم آنزیمی که قبلا توسط Izadyar و همکاران در ۲۰۰۲ توصیف شده بود، جدا شدند(۸). به طور خلاصه، نمونه‌ها پس از شستشو به میزان ۳ بار در محیط کشت DMEM حاوی اسید آمینه‌های غیرضروری، ۱۰۰unit/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین و ٤۰mg/ml جنتامایسین، به صورت مکانیکی توسط قیچی استریل قطعه قطعه شدند. سپس در محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک به همراه 1mg/ml کلاژناز تیپ IV، 1mg/ml هیالورونیداز تیپ II و 1mg/ml تریپسین و۵mg/ml DNase (تمام آنزیم‌ها از Sigma) در $۳۷^{°C}$ در انکوباتور شیکر با ۸۰ دور در دقیقه به مدت ٦۰ دقیقه انکوبه شدند. در این مرحله قسمت اعظم بافت همبند و بینابینی هضم شده و بعد از سه تا چهار بار شستشو با DMEM، اکثر لوله‌های منی‌ساز رسوب کردند. این لوله‌ها دوباره در DMEM حاوی آنتی بیوتیک شامل آنزیم‌های بالا ولی این بار بدون حضور تریپسین انکوبه شدند. این مرحله تا زمانی پیش رفت که قطعات لوله‌های منی‌ساز از بین رفته و سلول‌های همراه آن (برای مثال سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی) از هم جدا شدند. سلول‌های جدا شده از باقیمانده قطعات لوله‌های منی‌ساز توسط سانتریفیوژ **۳۰g** به مدت ۲ دقیقه جداشدند. بعد از عبور سوسپانسیون سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ و۷۷

www.SID.ir

میکرومتری، این سوسپانسیون سلولی در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS پلیت گذاری شد. سلول‌های تشکیل دهنده پلیت (متشکل از سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی) در محلول DMEM حاوی آنتی بیوتیک و۱۰٪ FBS قرار گرفتند.

شمارش و ارزیابی درصد حیات

برای ارزیابی وضعیت حیات سلول‌ها، رنگ آمیزی تریپان بلوانجام گرفت وتعداد کل سلول‌ها و همچنین سلول‌های زنده و مرده حاضر درسوسپانسیون سلولی، توسط هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری بدست آمد.

کشت کوتاه مدت

در این روش از پلیت های ۲٤ خانه (TPP Switzerland) پوشیده از ۵ µg/ml لکتین داچور استرامونیوم آگلوتینین در بافر فسفات استفاده شد. تعلیق سلولی حاصل از مرحله قبل به این پلیت‌ها منتقل شده و در دمای ۳۷ °C و میزان ۵٪ CO2، انکوبه شد. در این روش سلول‌های سرتولی به کف پلیت چسبیده و سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی سلول‌های سرتولی تشکیل کلونی می‌دهند.

ارزیابی کلونیزاسیون سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

کلونی‌های اسپرماتوگونی در هر گوده با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX71 inverted microscope) در روزهای ۱۱ و ۱۰، ۹، ۸، ۷، ٦، ۵، ٤ پس از کشت شمارش شد.

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت علیه vimentine و OCT4 که به ترتیب مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها هستند تایید شد. بدین منظور سلول‌ها (سوسپانسیون سلولی حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی) در گوده‌های ٤ خانه ای پوشیده شده از ۵۰۰۰۰ سلول در DMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۱۰٪ FBS در۳۷°C در **رطونت جو** با ۵٪ CO2 انکوبه شدند. کشت بعد از ۵ روز متوقف و سلول‌ها فیکس شدند. آنتی بادی های اولیه وثانویه مورد استفاده برای شناسایی OCT4 **در** SSCs، (polyclonal rabbit anti-OCT4 antibody ab18976, Abcam, Cambridge, UK) **و** FITC-conjugated goat anti rabbit IgG می‌باشند. آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای مشاهده vimentine در سلول‌های سرتولی (monoclonal antibody anti-vimentin (ab8069, Abcam, Cambridge, UK) و fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep anti mouse IgG می‌باشند. رنگ آمیزی سلول‌ها براساس مطالعات گذشته توسط Qasemi-Panahi و همکاران در ۲۰۱۱ انجام شد(۱٦).

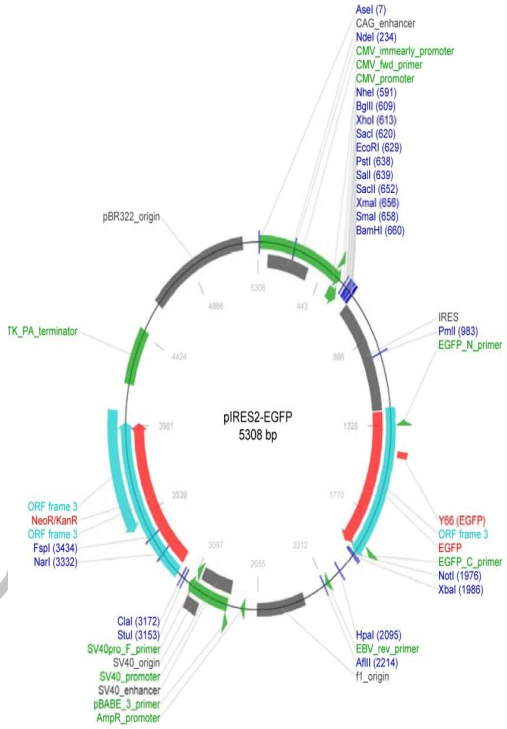
استخراج پلاسمید

در این مطالعه از سازه ژنی PIRES۲ –EGFP خطی شده با آنزیم stu1 و نشان دار شده با تترامتیل رودامین استفاده شد(آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران). (نگاره۱). طول کلی این سازه ۵/۳ کیلو جفت باز است. این سازه دارای ریبوزوم اینتری سایت (IRES) (Internal ribosome entry site) متعلق به ویروس آنسفالومیوکاردیت (ECMV)است که در بین قطعه مالتیپل کلونینگ سایت (MCS)و انهنسد گرین فلورسنت پروتئین (EGFP) (Enhanced Green Fluorescent Protein) قرار گرفته است. این سازه هم چنین دارای یک ژن مقاومت نسبت به نئومایسین/کانامایسین می‌باشد. این پلاسمید دارای ماکزیمم برانگیختگی در ٤۸۸ nm و بیشترین باز**تاب** درnm ۵۰۷ می‌باشد. برای خالص سازی پلاسمید از پروتکل

Archive of SID

www.SID.ir

تجاری DNA-midi™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotecnology, INC. Version 2.0) استفاده شد.



نگاره۱ـ نقشه ژنی پلاسمید PIRES۲ –EGFP

تریپسینه کردن کوتاه مدت (هضم نسبی): قبل از فرآیند انتقال ژن، لازم است که کلونی‌های اسپرماتوگونی تا حد امکان پخش شده و از تراکم آن ها کاسته شود. بدین منظور از تلفیق روش مکانیکی و هضم شیمیایی درست روز قبل از ترانسفکشن استفاده شد. بدین منظور بعد از خالی کردن محیط کشت سلول‌ها و شستشوی ظرف کشت با محیط کشت فاقد سرم یا PBS، بین**۰/۵ تا ۱** ml از آنزیم تریپسین **۰/۵** ٪ حاوی EDTA (invitrogen) به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳ دقیقه انکوبه شدند. در طی این زمان، با ضربات آهسته مکانیکی به کف ظرف کشت، روند کاهش تراکم و جداسازی نسبی کلونی‌ها تسهیل شد. به محض کنده شدن کلونی‌ها از کف ظرف، به منظور خنثی سازی روند هضم شیمیایی ۱/۳ حجم تریپسین FBS اضافه شد.

انتقال ژن GFP با استفاده از Turbofect : در این مطالعه به منظور انتقال ژن به سلول‌های اسپرماتوگونی گوساله با استفاده از حاملین غیر لیپوزومی از محلول استریل پلیمر کاتیونیک در آب TurboFect Transfection Reagent ساخت شرکت Thermo Scientific استفاده شد. این پلیمر با DNA تشکیل کمپلکس پایدار با شارژ مثبت کرده که ساختمان DNA را از هضم مصون نگه داشته و باعث تسهیل ورود ژن بداخل سلول‌های یوکاریوتی می‌شود. این پروتکل برای ترانسفکشن در پلت ۲٤ خانه ای بهینه شده است. در هنگام ترانسفکشن پوشش مناسب سلول‌های چسبنده بین ٦۰ تا ۹۰ درصد می‌باشد. به طور خلاصه به منظور ترانسفکشن با استفاده از Turbofect، در هر گوده، DNA ۵µg در ۱۰۰µl محیط DMEM یا هر محیط کشت فاقد سرم در یک اپندورف استریل رقیق شد. محلول توربوفکت به صورت مختصر ورتکس شد و ۲µl از آن به DNA رقیق شده اضافه شد. سپس اپندورف فوق شامل کمپلکس Turbofect-DNA به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در انکوباتور C ° ۳۷ گرمخانه گذاری شد. سپس ۱۰۰µl از کمپلکس فوق به هر گوده آماده ترانسفکشن بدون خالی کردن محیط هر گوده اضافه شد. پلت ۲٤ خانه به آرامی زیر هود تکان داده شد تا توزیع مناسبی از کمپلکس با سلول‌ها در هر گوده بدست آید و سپس داخل انکوباتور قرار گرفت. در این مطالعه به منظور بررسی بهترین روز که در آن بیشترین میزان آلوده سازی کلونی‌های اسپرماتوگونی به واسطه Turbofect به دست آید در سه روز ۸ و ٦، ٤ از کشت، ترانسفکشن انجام و نتایج تا ۳ روز متعاقب هر ترانسفکشن تعقیب شد. قبل از ارزیابی میزان نفوذ پلاسمید به کلونی اسپرماتوگونی در هر روز، تعداد کلونی اسپرماتوگونی در هر گروه آزمایشی با استفاده از میکروسکوپ معکوس شمارش شد. به منظور تعیین وجود ژن

Archive

www.SID.ir

انتقالی در کلونی اسپرماتوگونی با قرار دادن سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانت معکوس NIKON(ECLIPSE E600) و با استفاده از اشعه UV طول موج ٤٦٠-٥٠٠nm (فیلتر آبی) بررسی گردید. اگر انتقال ژن موفقیت آمیز باشد رنگ سبز فلورسانتی از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به چشم می خورد که تایید تقریبی انتقال ژن است.

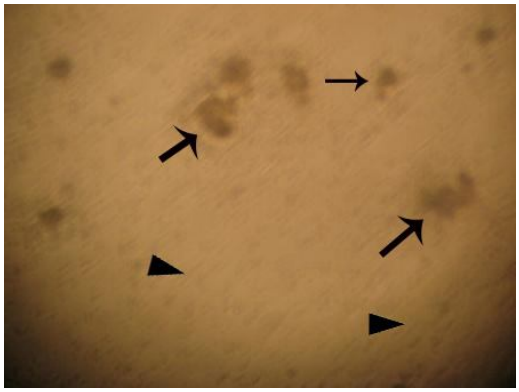
ارزیابی آماری: اطلاعات بدست آمده از ۵ نمونه‌گیری مستقل توسط آزمون‌های آماری One-way ANOVA و Duncan's multiple range test آنالیز شد. نرم‌افزار آماری مورد استفاده SPSS (SPSS Inc, Chicago, version 16) بوده و $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

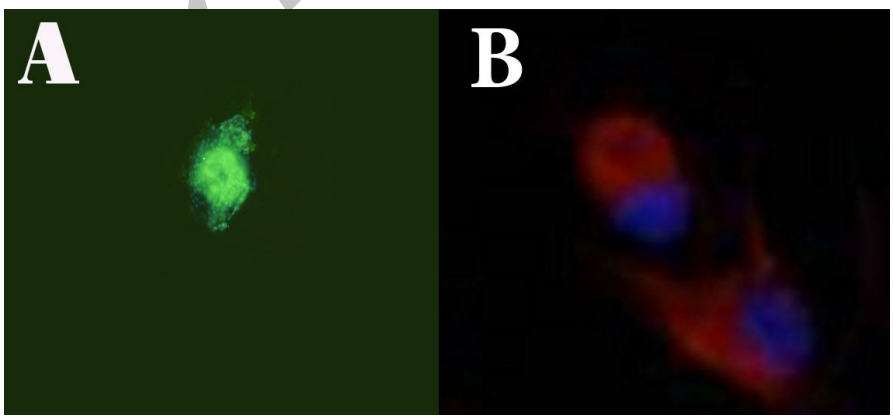
ارزیابی درصد حیات: پس از جداسازی سلول‌های انفرادی از باقیمانده لوله‌های منی‌ساز، توسط رنگ آمیزی تریپان بلو مشخص گردید که حدود ۸۸% این سلول‌ها زنده بودند.

کشت کوتاه مدت: جمعیت سلولی جدا شده از لوله‌های سمینی فروس بیضه گوساله ۳ تا ۵ ماهه حاوی اغلب دو نوع سلولی با ویژگی‌های ریخت شناسی متفاوت بود. اولین نوع سلولی که تکثیر می‌یابند تک لایه‌ای از سلول‌ها به وجود می‌آورند در حالیکه نوع دیگر سلول بعد از تکثیر، تشکیل کلونی می‌دهد.(نگاره۲)

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی: در روز ۵ کشت، vimentin در سلول‌های سرتولی و OCT4 در کلونی‌های اسپرماتوگونی دیده شد (نگاره ۳)



نگاره۲ـ سلول‌های سرتولی یک لایه تکی از سلول را تشکیل می‌دهند(مثلث). چند کلونی کوچک اسپرماتوگونی نیز دیده می‌شود (پیکان) (بزرگنمایی× ۱۰۰)

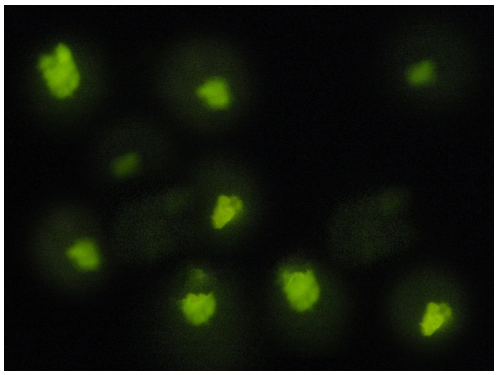


نگاره۳ـ (A) رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاوی برای OCT4. (B) رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت سلول‌های سرتولی گاوی برای Vimentin در روز ۵ کشت (بزرگنمایی× ٤۰۰)

www.SID.ir

انتقال ژن EGFP به کلونی‌های اسپرماتوگونی با استفاده از Turbofect

قبل از مشاهده میزان ترانسفکشن در کلونی اسپرماتوگونی در هر سه روز مطالعه، تعداد کلونی اسپرماتوگونی شمارش شد. (جدول۵ و ۳، ۱) در هر سه روز ۸ و ٦، ٤ کشت که ترانسفکشن انجام شد، تعداد کلونی‌های آلوده شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. این تفاوت معنی دار نیز در گروهی که هیچ حاملی برای انتقال ژن خارجی به کلونی اسپرماتوگونی وجود نداشت به چشم می‌خورد (p<۰/۰۵) (جدول ٦ و ٤، ۲) از طرفی در روز ٦ و ٤ تعدادی از کلونی‌ها نیز در گروه بدون حامل ژن خارجی آلوده شده بودند. (جدول ٤ و ۲) در حالی که در روز ۸ هیچ کلونی جذب خودبه خودی نداشت (جدول٦). نرخ آلوده‌سازی کلونی زمانیکه ترانسفکشن در روز ٤ کشت انجام شد بالاتر از روز ۸ و ٦ بود (جدول۲). رنگ سبز فلورسنت بیانگر انتقال ژن EGFP به کلونی اسپرماتوگونی است (نگاره ٤).



نگاره ٤ـ رنگ سبز فلورسنت که به صورت پراکنده در کلونی‌های اسپرماتوگونی گاوی در روز ٤ ترانسفکشن مشاهده می‌شود.

جدول ۱ـ تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ٤ کشت

روزهای بررسی / گروههای آزمایش	۵	٦	۷
شاهد	۱۸/٦	۱۹/۲	۲۰
DNA همراه	۲۰/۸	۲۱/۸	۲۲
Turbofect + DNA همراه	۲۱	۲۲	۲۳

جدول ۲ـ میزان نفوذDNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط Turbofect هنگامیکه آزمایش از روز ٤ شروع شد (±SD).

روزهای بررسی / گروه‌های آزمایش	۵	٦	۷
شاهد	۰a	۰a	۰a
DNA همراه	a۱/٦ ±۱ / ٦	a۲/٤±۱/ ٦	a۲/۸ ± ۲/۱
Turbofect+ DNA همراه	b٤٦ ±٦/٤	b٥۲/۷±۷	b٥٤/٦±۸/۱

a-b ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنادار است. (p<۰/۰۵)

جدول ۳ـ تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ٦ کشت

روزهای بررسی / گروه‌های آزمایش	۷	۸	۹
شاهد	۳۲	۳۳/۲	۳٤/٤
DNAهمراه	۳۵/۸	۳۸/۲	۳۸/۸
Turbofect+ DNAهمراه	۳۲	۳۲/۵	۳۵/۷

جدول ٤ـ میزان نفوذDNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط Turbofect هنگامیکه آزمایش از روز ٦ شروع شد (±SD)

روزهای بررسی / گروه‌های آزمایش	۷	۸	۹
شاهد	۰a	۰a	۰a
DNAهمراه	۰a	a۱ ±۱	a ۱±۱
Turbofect+ DNAهمراه	b۲/٤±۲۳/۸	b ۳±۲۳/٦	b ۲/۷±۲٦

a-b ارزش های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنادار است. (p<۰/۰۵)

جدول ۵ـ تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۸ کشت

روزهای بررسی / گروه‌های آزمایش	۹	۱۰	۱۱
شاهد	٤۳	٤٤	٤٤/٦
DNA همراه	۳۸/٤	۳۹/٤	٤۰
Turbofect+ DNA همراه	٤۱	٤۱/۹	٤۲/٤

جدول ٦ـ میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط Turbofect هنگامیکه آزمایش از روز ۸ شروع شد (± SD)

روزهای بررسی / گروه‌های آزمایش	۹	۱۰	۱۱
شاهد	۰a	۰a	۰a
DNA همراه	۰a	۰a	۰a
Turbofect+DNA همراه	b۸ ±۵/۲	b۰/۹ ±٦/٤	b۰/۹±۷

a-b ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنادار است. (p<۰/۰۵)

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

به طور معمول جمعیت متراکمی از سلول بنیادی اسپرماتوگونی با خلوص بالای حدود ۱×۱۰^۶سلول بنیادی در هر گرم بافت بیضه با میزان زنده مانی > ۸۰% می‌باشد (۹). میزان زنده مانی به دست آمده در مطالعه حاضر ۸۸٪ مشاهده شد که با مطالعات انجام شده برروی موش نابالغ با میزان زنده مانی ۸۰٪ ، موش صحرایی با میزان زنده مانی ۷۵٪، و گوساله با میزان زنده مانی۸۲٪ قابل مقایسه می‌باشد(۱۲ و ۹، ۲، ۱).

در این مطالعه سلول‌های جدا شده از لوله‌های منی‌ساز گوساله ۳ تا ۵ ماهه دو نوع سلول با ویژگی‌های ایمنوسیتوشیمی متفاوت، مشابه سلول‌های سرتولی و تیپ A سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارا بودند. این یافته در مطابقت با گزارشات Kourji و همکاران در ۲۰۰۷ که ویژگی‌های ایمنوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در موش نشان دادند بود(۳).

مارکر اختصاصی برای شناسایی سلول‌های سرتولی، رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی vimentin بود(۲۰و۱). کلونی‌ها ریخت شناسی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاوی را داشتند(۷). نتیجه نتایج این مطالعه نشان داد که کلونی‌ها از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منشا گرفتند.

در این مطالعه، از Turbofect به منظور جذب ژن خارجی EGFP به کلونی‌های اسپرماتوگونی استفاده شد. نتایج نشان داد جذب ژن خارجی توسط حامل لیپوزومی در هر سه روز ترانسفکشن نسبت به بدون حامل افزایش معنی داری دارد. (جدول ٦ و ٤، ٢) یافته های این بررسی در تعیین بهترین روزی که بیشترین میزان جذب پلاسمید در کلونی‌های اسپرماتوگونی وجود داشته باشد، نشان داد که پیک فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها در زمان ترانسفکشن دارای اهمیت فوق العاده ای می‌باشد. در مقایسه با سه روز، در روز ٤ کشت بیشترین نرخ ترانسفکشن مشاهده شد که به پیک فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها اشاره دارد. این یافته با مطالعه Takehashi و همکاران در ۲۰۰۷با استفاده از حامل آدنو ویروسی در گونه موش مطابقت دارد(۱۹). از طرفی در روز ٤ بالاترین میزان جذب DNA بدون حامل توسط کلونی اسپرماتوگونی نیز مشاهده شد.

در روز ٦ ترانسفکشن، میزان جذب DNA بدون حامل به طور ثابت و تنها در دو روز مشاهده شد. این یافته در مغایرت با بررسی صورت گرفته روی جذب DNA بدون حامل در اسپرم موش بود(۲۰).

در روز ۸ ترانسفکش علاوه بر اینکه درصد کلونی‌های آلوده به ژن خارجی بسیار کم بود، هیچ گونه جذب DNA بدون حامل در کلونی‌های اسپرماتوگونی مشاهد نشد، که این امر می‌تواند نشان دهنده سیر نزولی تعداد و نیز زنده مانی کلونی‌های اسپرماتوگونی می‌باشد(۳).

مطالعات صورت گرفته بر تولید سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تراریخت، بیشتر بر پایه مطالعات درون تنی یعنی تزریق ژن خارجی به داخل بیضه صورت گرفته است. (testis-mediated gene transfer TMGT). در همین رابطه، Hui ming و همکاران در ۲۰۱۱، ژن نشانگر GFP را به داخل بیضه‌های موش جوان ۷ روزه برای بررسی‌های بعدی روش TMGT و محدودیت‌های احتمالی وارد کردند. سپس در هفته‌های ٢٤ و ١٢، ٦ این موش‌های مذکر TMGT شده با موش‌های مونث آمیزش داده شدند و بیان و الحاق ژن EGFP معرفی شده در نوزادان تراریخت نسل اول ارزیابی شد(٦).

Nagona و همکاران در ۲۰۰۱، نشان دادند که اگر چه حاملین رترو ویروسی به عنوان روش موثر در ورود ژن‌ها به داخل طیف وسیعی از سلول‌ها به کار گرفته می‌شود، اما سلول‌های بنیادی زایای پس از تولد نوعی مقاومت در مقابل آلوده‌سازی به ژن خارجی توسط این ویروس‌ها از خود نشان می‌دهند. به علاوه، بیان ژن وارد شده به داخل انواع متفاوت سلول بنیادی، همانند سلول بنیادی جنینی یا سلول بنیادی خونساز اغلب بسیار ضعیف یا خاموش است. آنها نشان دادند که انتقال ژن به وسیله حامل رترو ویروسی در شرایط آزمایشگاهی به داخل سلول‌های

Archive of SID

www.SID.ir

بنیادی اسپرماتوگونی موش‌های نابالغ و نیز بالغ، منتج به انضمام پایدار و بیان یک ترانسژن تنها در ۲۰-۲ درصد سلول‌های بنیادی شد(۱۳). این اولین مطالعه‌ای است که به بررسی ورود ژن به کلونی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاهی با استفاده از Turbofectمی‌پردازد. شناسه گر Turbofect می‌تواند جهت انتقال ژن خارجی به طیف وسیعی از سلول‌ها شامل سلول‌های اولیه و سلول‌هایی که به سختی آلوده می‌شوند بسیار ایده آل باشد. آلوده سازی می‌تواند در حضور یا غیاب سرم انجام شود. شناسه‌گر Turbofect کارایی بهتر آلوده‌سازی و حداقل سمیت را زمانی که با سایر شناسه گرهای آلوده سازی سلول‌ها بر پایه لیپیدی یا بر پایه پلی مری مقایسه می‌شود از خود نشان داده است(۳). مزایای این روش شامل: کارایی بالاتر آلوده سازی طیف وسیعی از سلول‌ها، کارایی بالاتر آماده سازی در حضور یا عدم حضور سرم، حداقل سمیت سلولی و آماده به استفاده بدون نیاز به رقیق یا دستکاری کردن می‌باشد(۱۷). در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از حاملی از جنس پلیمر کاتیونیک یک روش کم خطر، ایمن و با کارایی نسبتا بالا در انتقال ژن خارجی به کلونی اسپرماتوگونی می‌باشد. هم چنین به فراهم شدن شرایط تمایز در محیط آزمایشگاهی به منظور تولید اسپرم تراریخت از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تقویت می‌شود.

تشکر و سپاسگزاری

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 کمال تشکر را به جا آورند.

REFERENCES

1- Brinster, R.L., Avarbock, M.R. (1994): Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1130-1137.

2- Dirami, G., Ravindranath, N., Pursel, V., Dym, M. (1999): Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulationg factor on survival of porcine type A spermatogonia culture in KSOM. Biol. Reprod. 61: 225-230.

3- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R. (1987): Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Sci. 84:7413-7417.

4- Garrett, F.E., Goel, SH., Yasul, J., Koch, R.A. (1999): Liposome fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermant agents. Biochimica et Biophysica Acta. 1417:77-88.

5- Horfmann, M. C. Gdnf signaling pathways whitin the mammalian spermatogonial stem cell niche. (2008): Mol. Cell. Endocrinol. 288:95-103.

6-Hui-ming, J., Bal, L., Ren, H., MU, Y. (2011): Production of transgenic mice by type A spermatogonia-mediated gene transfer. Agriculture Sciences in China. 10:431-437.

7- Izadyar, F., Creemers, L.B., Van Dissel-Emiliani, F.M. (2000): Spermatogonial stem cell transplantation. Mol. Cell. Endocrinol. 169: 21-26.

8- Izadyar, F., Sepierenberg, G.T., Creemers, L. B., Ouden, K., Rooij, D.G. (2002): Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction. 124: 85-94 .

9- Koruji, S.M., Movahedin, M., Mowia, S.J. (2007): Colony formation ability of frozen thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. Iran. J. Reprod. Med. 5: 109-115.

10- Kubota, H., Brinster, R.L. (2008): Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. Methods Cell Biol. 86: 59-84.

11- Lai, Y., Drobinskaya, I., Chuguang L. (2008): Genetic modification of cells fpr transplantation. Advanced Drug Delivery Reviews. 60: 146-159.

12- Morena, A.R., Boitani, C., Pesce, M., De felici, M., Stefanini., M. (1996): Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. J. Androl. 17: 708-717.

Archive of SID
www.SID.ir

13-Nagona, M., Clayton, J., Kley, E., Mary, R. (2001): Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. PNAS. 98: 13090-13095.
14- Niu, Y., Liang, SH. (2008). Progress in gene transfer by germ cells in mammals. J. Genet. Genomics. 35: 701-714.
15- Ogachi, S., Kamihira, M., You, J., Tachibana, A., Lijima, Sh. (1998) Exogene gene transfection into quail embryo using cationic lipid vesicles. J. Fermentation and Bioengineering. 86: 118-120
16- Qasemi-Panahi, B., Tajik, P., Movahedin, M., Moghaddam, G., Barzgar, Y., Heidari-vala, H. (2011): Differentiation of bovine spermatogonial stem cells into osteoblasts. Avicenna J Med Biotechnol. 3: 149-153.
17- Sciamanna, I. (2002): DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. Mol. Reprod. Dev. 56: 301-305 .
18- Tajik, P., Barin, A., Movahedin, M. (2012): Nestin, a neuroectodermal stem cell marker, is expressed by bovine sertoli cells. Comp. Clin. Pathol. 21: 395-399.
19- Takehashi, M., Kanatusa-Shinohara M., Ogonuki N., Miki, H., Toyokuni, SH., Shinohara, T. (2007): Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. PNAS. 104: 2596-2601.
20- Younezawa, T., Furahata, Y., Hirabayashi, K., Suzuki, M., Yamanouchi, K. (2002): Protamine-Drived synthetic enhanced the efficiency of sperm-mediated gene transfer using liposome-peptid-DNA complex. J. Reprod. Dev. 48: 281-286.

Archive of SID

www.SID.ir