

انتقال ژن Enhanced green florescent protein به کلونی

اسپرمتوگونی گوساله با استفاده از Turbofect

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

چکیده

در بالغین، سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی (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 اسپرمتوزوآ 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 اسپرمتوگونی گاوی از طریق نوعی حامل پلی مری به نام Turbofect و تعیین بهترین روز انکوباسیون در جذب ژن توسط کلونی‌های اسپرمتوگونی بررسی شد. کارایی انتقال ژن خارجی EGFP به SSCs از طریق حامل Turbofect در سه روز از شروع کشت کلونی‌های اسپرمتوگونی (روز ۶، ۷ و ۸) توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوفلورسنت 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 ($P < 0.05$). کلونی‌های ترانسفکت شده با Turbofect در مقایسه با گروه‌هایی که تنها حاوی ژن خارجی بدون حامل بودند نیز بالاتر بود (معنی دار). بیشترین میزان کلونی‌های ترانسفکت شده زمانی بدست آمد که ترانسفکشن در روز ۷ کشت انجام شد. نتایج بدست آمده از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که Turbofect می‌تواند به منظور انتقال مستقیم DNA خارجی به کلونی اسپرمتوگونی به ویژه در روز ۷ کشت به صورت ایمن به کار رود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی، Turbofect، ترانسفکشن

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی پایه و اساس تولید مداوم اسپرمتوزوآ در بزرگسالی هستند. تعداد سلول‌های اسپرمتوگونی بیضه بسیار کم است (تقریباً ۱ سلول در ۳۰۰۰ سلول) و دو وظیفه مهم بر عهده دارند: (۱) تمایز و تولید نسل‌های پیشرفته‌تر

سلول‌های زایا که اسپرمتوزوآ را تکمیل می‌کنند و باروری را حفظ می‌کنند. (۲) خودنوسازی بمنظور حفظ ذخایر سلولی (۵). سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند، زیرا تنها سلول‌های بنیادی هستند که اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعد منتقل می‌کنند. 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 جهش‌هایی که باعث بیماری‌هایی همچون اوتیسم، دیابت، سندرم داون و بیماری قلبی را می‌شود می‌دهد. هم چنین این سلول‌ها مستقیماً در باروری سهیم هستند. اختلال در مسیر این سلول‌ها بر روند اسپرمتوژنز تاثیر منفی دارد و سبب کاهش باروری و ناباروری می‌شود (۰ و 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 ۱۴).

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

^۱ - گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران ptajik@ut.ac.ir

^۲ - گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

اسکروتوم بین ۱۳ تا ۱۵ cm 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 بیوپیسی ۳×۳ mm 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 قبلاً 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، ۱۰۰ unit/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ ug/ml استرپتومایسین و ۴۰ mg/ml جنتامایسین، به صورت مکالیکی توسط قیچی استریل قطعه قطعه شدند. سپس در محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک به همراه ۱ mg/ml کلاژناز تیپ IV، ۱ mg/ml هیالورونیداز تیپ II و ۱ mg/ml تریپسین و ۵ mg/ml DNase (تمام آنزیم‌ها از Sigma) در ۳۷°C در انکوباتور شیکر با ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ 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 جدا شدند. بعد از عبور سوسپانسیون سلولی از فیلتر نایلونی ۵۵ و ۷۷

توسط جابه جایی جزئی ژنوم ویروس با ژن‌های درمانی تولید می‌شود. اگر چه یک حامل ویروسی می‌تواند سلول‌ها را با کارایی نسبتاً 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 کالبدیها 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 و ۱۱، ۴). Turbofect یک محلول استریل از پلیمر کاتیونیک می‌باشد. این پلیمر که مشکل 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 و روش کار

حیوانات: در این مطالعه، ۵ گوساله نر نژاد هلشتاین ۳ تا ۵ ماهه به عنوان دهنده استفاده شدند. در زمان بیوپیسی، محیط

مرحله دوم هضم آنزیمی) در گوده‌های ۴ خانه ای پوشیده شده از ۵۰۰۰۰ سلول در DMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۱۰٪ FBS در ۳۷°C در رطوبت جو با ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. کشت بعد از ۵ روز متوقف و سلول‌ها فیکس شدند. آنتی بادی های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای شناسایی OCT4 در (polyclonal rabbit anti-OCT4، SSCs در FITC- antibody ab18976, Abcam, Cambridge, UK) و conjugated goat anti rabbit IgG می‌باشند. آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای مشاهده vimentine در سلول‌های سرتولی anti-vimentin (monoclonal antibody fluorescein و ab8069, Abcam, Cambridge, UK isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep anti mouse IgG می‌باشند. رنگ آمیزی سلول‌ها براساس مطالعات گذشته توسط Qasemi-Panahi و همکاران در ۲۰۱۱ انجام شد (۱۶).

استخراج پلاسمید

در این مطالعه از سازه ژنی PIRE5₂-EGFP خطی شده با آنزیم stuI و نشان دار شده با ترامتیل رودامین استفاده شد (آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران). (نگاره ۱). طول کلی این سازه ۵/۳ کیلو جفت باز است. این سازه دارای ریبوزوم اینتری سایت (IRES) (Internal ribosome entry site) متعلق به ویروس آنفالومیوکاردیت (ECMV) است که در بین قطعه مالتیل 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 ۴۸۸ nm و بیشترین بازتاب در ۵۰۷ nm می‌باشد. برای خالص سازی پلاسمید از پروتکل

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 و ۱۰٪ FBS قرار گرفتند.

شمارش و ارزیابی درصد حیات

برای ارزیابی وضعیت حیات سلول‌ها، رنگ آمیزی تریپان بلوانجام گرفت و تعداد کل سلول‌ها و همچنین سلول‌های زنده و مرده حاضر در سوسپانسیون سلولی، توسط هموستومتر و میکروسکوپ نوری بدست آمد.

کشت کوتاه مدت

در این روش از پلیت های ۲۴ خانه (TPP Switzerland) پوشیده از ۵ µg/ml لکتین داجور استرامونیم 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، ۶، ۵، ۴ پس از کشت شمارش شد.

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

ماهیت سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت علیه vimentine و OCT4 که به ترتیب مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها هستند تایید شد. بدین منظور سلول‌ها (سوسپانسیون سلولی حاصل از

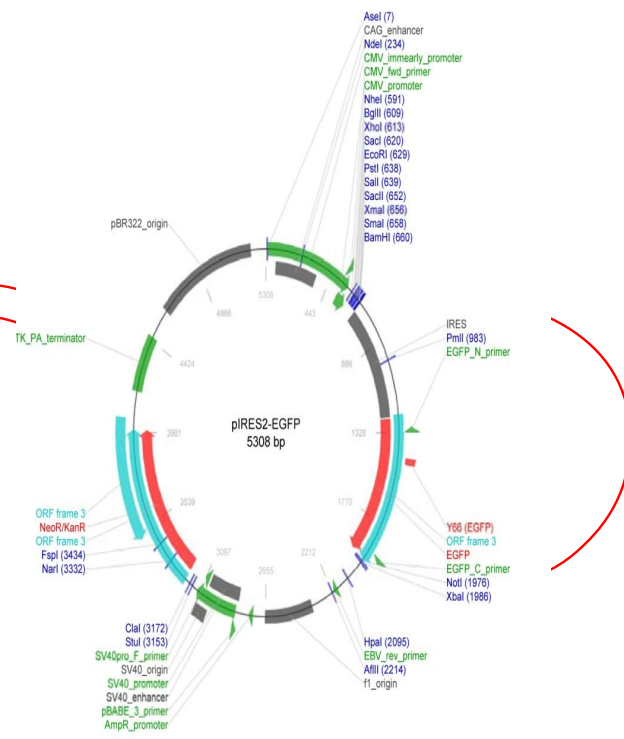
تجاری DNA-midi™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, INC. Version 2.0) استفاده شد.

کلونی‌ها تسهیل شد. به محض کندن 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 مصنوعی نگه داشته و باعث تسهیل ورود ژن بداخل

سلول‌های یوکاریوتی می‌شود. این پروتکل برای ترانسفکشن در پلت ۲۴ خانه ای بهینه شده است. در هنگام ترانسفکشن پوشش مناسب سلول‌های چسبنده بین ۶۰ تا ۹۰ درصد می‌باشد. به طور خلاصه به منظور ترانسفکشن با استفاده از Turbofect، در هر گوده، ۵μg DNA در ۱۰۰μl محیط DMEM یا هر محیط کشت فاقد سرم در یک اپندورف استریل رقیق شد. محلول توربوفاکت 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 ۳۷ °C گرمخانه گذاری شد. سپس ۱۰۰μl از کمپلکس فوق به هر گوده آماده ترانسفکشن بدون خالی کردن

محیط هر گوده اضافه شد. پلت ۲۴ 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 دست آید در سه روز ۸ و ۶، ۴ 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

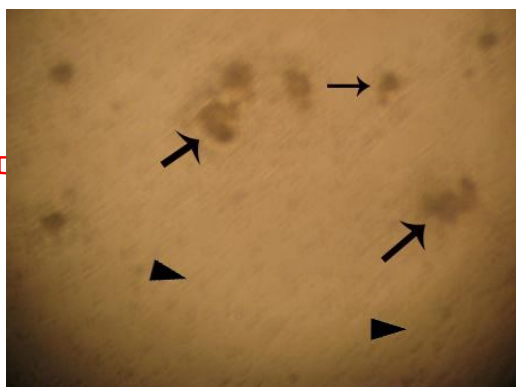


نگاره ۱- نقشه ژنی پلاسمید PIRESE-EGFP

تریپسینه کردن کوتاه مدت (هضم نسبی): قبل از فرآیند انتقال ژن، لازم است که کلونی‌های اسپرماتوگونی تا حد امکان پخش شده و از تراکم آن‌ها 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

سلولی که تکثیر می‌یابند تک لایه‌ای از سلول‌ها به وجود می‌آورند در حالیکه نوع دیگر سلول بعد از تکثیر، تشکیل کلونی می‌دهد. (نگاره ۲)

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)



نگاره ۲- سلول‌های سرتولی یک لایه تکی از سلول را تشکیل می‌دهند (مثلث). چند کلونی کوچک اسپرماتوگونی نیز دیده می‌شود (پیکان) (بزرگنمایی $\times 100$)

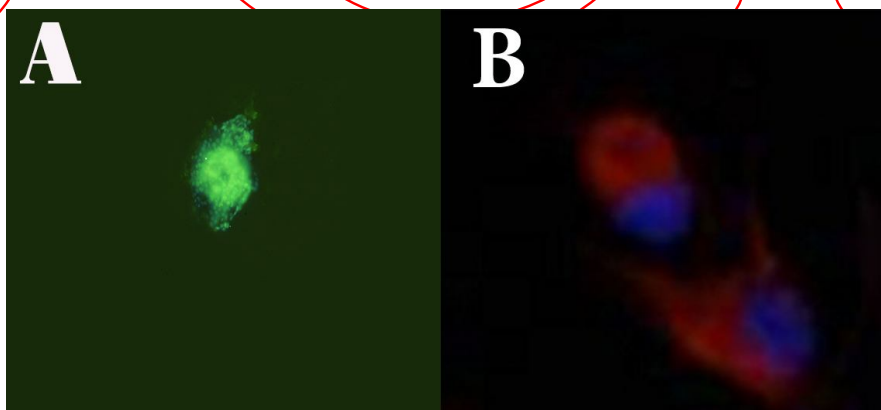
انتقالی در کلونی اسپرماتوگونی با قرار دادن سلول‌ها زیر میکروسکوپ فلورسانت معکوس (NIKON (ECLIPSE E600) و با استفاده از اشعه UV طول موج ۴۶۰-۵۰۰ nm (فیلتر آبی) بررسی گردید. اگر انتقال ژن موفقیت آمیز باشد رنگ سبز فلورسانتی از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ به چشم می‌خورد که تایید تقریبی انتقال ژن است.

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 $p < 0.05$ 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 فرس بیضه گوساله ۳ تا ۵ ماهه حاوی اغلب دو نوع سلولی با ویژگی‌های ریخت شناسی متفاوت بود. اولین نوع



نگاره ۳- (A) رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاوی برای OCT4. (B) رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های سرتولی گاوی برای Vimentin در روز ۵ کشت (بزرگنمایی $\times 400$)

جدول ۲- میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط Turbofect هنگامیکه آزمایش از روز ۴ شروع شد (±SD).

روزهای بررسی	۵	۶	۷
شاهد	۰a	۰a	۰a
DNA همراه	1/6 ± 1/6 a	1/6 ± 2/8 a	2/1 ± 2/8 a
Turbofect+ DNA همراه	7/4 ± 6/6 b	7/5 ± 2/5 b	7/1 ± 5/6 b

a-b ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنادار است. (p<0/05)

جدول ۳- تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۶ کشت

روزهای بررسی	۷	۸	۹
شاهد	۳۲	۳۳/۲	۳۴/۴
DNA همراه	۳۵/۸	۳۸/۲	۳۸/۸
Turbofect+ DNA همراه	۳۲	۳۲/۵	۳۵/۷

جدول ۴- میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط Turbofect هنگامیکه آزمایش از روز ۶ شروع شد (±SD)

روزهای بررسی	۷	۸	۹
شاهد	۰a	۰a	۰a
DNA همراه	1 ± 1 a	1 ± 1 a	1 ± 1 a
Turbofect+ DNA همراه	8/8 ± 4/2 b	6/6 ± 3/3 b	6/2 ± 7/2 b

a-b ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنادار است. (p<0/05)

جدول ۵- تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۸ کشت

روزهای بررسی	۹	۱۰	۱۱
شاهد	۴۳	۴۴	۴۴/۶
DNA همراه	۳۸/۴	۳۹/۴	۴۰
Turbofect+ DNA همراه	۴۱	۴۱/۹	۴۲/۴

جدول ۶- میزان نفوذ DNA به کلونی اسپرماتوگونی گاوی توسط Turbofect هنگامیکه آزمایش از روز ۸ شروع شد (±SD)

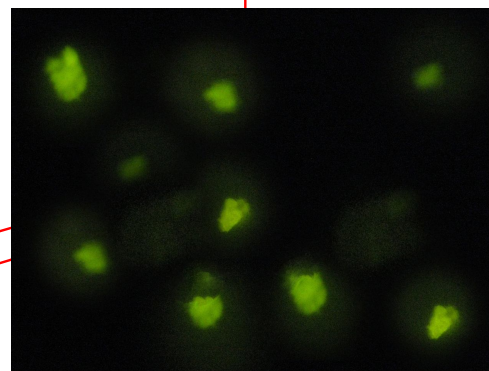
روزهای بررسی	۹	۱۰	۱۱
شاهد	۰a	۰a	۰a
DNA همراه	۰a	۰a	۰a
Turbofect+ DNA همراه	2/2 ± 8/8 b	4/4 ± 9/9 b	7/7 ± 9/9 b

a-b ارزش‌های در یک ستون با نمای متفاوت از لحاظ آماری اختلاف آنها معنادار است. (p<0/05)

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. (جدول ۵ و ۳، ۱) در هر سه روز ۸ و ۶، ۴ کشت که ترانسفکشن انجام شد، تعداد کلونی‌های آلوده شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. این تفاوت معنی‌دار نیز در گروهی که هیچ حاملی برای انتقال ژن خارجی به کلونی اسپرماتوگونی وجود نداشت به چشم می‌خورد (p<0/05) (جدول ۶ و ۴، ۲) از طرفی در روز ۶ و ۴ تعدادی از کلونی‌ها نیز در گروه بدون حامل ژن خارجی آلوده شده بودند. (جدول ۴ و ۲) در حالی که در روز ۸ هیچ کلونی جذب خودبه‌خودی نداشت (جدول ۶). نرخ آلوده‌سازی کلونی زمانیکه ترانسفکشن در روز ۴ کشت انجام شد بالاتر از روز ۸ و ۶ بود (جدول ۲). رنگ سبز فلورسنت بیانگر انتقال ژن EGFP به کلونی اسپرماتوگونی است (نگاره ۴).



نگاره ۴- رنگ سبز فلورسنت که به صورت پراکنده در کلونی‌های اسپرماتوگونی گاوی در روز ۴ ترانسفکشن مشاهده می‌شود.

جدول ۱- تعداد کلونی اسپرماتوگونی در روز ۴ کشت

روزهای بررسی	۵	۶	۷
شاهد	1/6	19/2	20
DNA همراه	20/8	21/8	22
Turbofect + DNA همراه	21	22	23

بحث

همکاران در ۲۰۰۷ با استفاده از حامل آدنو ویروسی در گونه موش مطابقت دارد (۱۹). از طرفی در روز ۴ بالاترین میزان جذب DNA بدون حامل توسط کلونی اسپرماتوگونی نیز مشاهده شد.

در روز ۶ 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 ترانسفکشن علاوه بر اینکه درصد کلونی‌های آلوده به ژن خارجی بسیار کم بود، هیچ گونه جذب DNA بدون حامل در کلونی‌های اسپرماتوگونی مشاهده نشد، که این امر می‌تواند نشان دهنده سیر نزولی تعداد و نیز زنده ماندن 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 ۲۰۰۱، ژن نشانگر GFP را به داخل بیضه‌های موش جوان ۷ روزه برای بررسی‌های بعدی روش TMGT و محدودیت‌های احتمالی وارد کردند. سپس در هفته‌های ۲۴ و ۱۲، ۶ 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 (۶).

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

به طور معمول جمعیت متراکمی از سلول بنیادی اسپرماتوگونی با خلوص بالای حدود $10^6 \times 10^6$ سلول بنیادی در هر گرم بافت بیضه با میزان زنده ماندن $< 80\%$ می‌باشد (۹). میزان زنده ماندن به دست آمده در مطالعه حاضر ۸۸٪ مشاهده شد که با مطالعات انجام شده بر روی موش نابالغ با میزان زنده ماندن ۸۰٪، موش صحرائی با میزان زنده ماندن ۷۵٪، و گوساله با میزان زنده ماندن ۸۲٪ 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 ایمونوسیتوشیمی 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 ایمونوسیتوشیمی سلول‌های سرتولی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در موش نشان دادند بود (۳). مارکر اختصاصی برای شناسایی سلول‌های سرتولی، رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی vimentin بود (۲۰ و ۱). کلونی‌ها ریخت شناسی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاوی را داشتند (۷). نتیجه نتایج این مطالعه نشان داد که کلونی‌ها از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منشأ 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 ۶ و ۴، ۲) یافته‌های 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 ۴ کشت بیشترین نرخ ترانسفکشن مشاهده شد که به پیک فاز رشد لگاریتمی سلول‌ها اشاره دارد. این یافته با مطالعه Takehashi و

- 2- Dirami, G., Ravindranath, N., Pursel, V., Dym, M. (1999): Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulation 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, S.H., 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 within 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 for 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.

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 Turbofect می‌پردازد. 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. شناسه گر Turbofect کارایی بهتر آلوده‌سازی و حداقل سمیت را زمانی که با سایر شناسه گرهای آلوده سازی سلول‌ها بر پایه لپیدی 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 نسبتاً 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.

- 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-Driven synthetic enhanced the efficiency of sperm-mediated gene transfer using liposome-peptid-DNA complex. J. Reprod. Dev. 48: 281-286.

JCP