Sarem Journal of Reproductive Medicine. Volume 5, Issue 1, Spring 2020: 18-26

The evaluation of retinoic acid and estrogen on mouse induced pluripotent stem cells differentiation into female germ cells

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors

Javad Amini Mahabadi [1,2], PhD
Hossein Nikzad [3], PhD*
Hassan Hassani Bafrani [4], PhD
Zahra Karami [5], MSc
Vajihe Taghdiri Nooshabadi [6], PhD

[1] Sarem Fertility and Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran.
[2] PhD of reproductive biology, Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
[3] Full professor of Anatomical science, Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[4] Associate professor of Anatomical science, Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[5] PhD Student of developmental biology, Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[6] Assistant Professor of tissue engineering and applied cell science, Nervous System Stem Cells Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Science, Semnan, Iran.

Corresponding Author
Address: Ghotb Ravandi boulevard, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.
Phone: +98 9131616689 & +98 155621158
hosseinnikzad43@yahoo.com; nikzad_h@kaums.ac.i

Article History
Received: April 24, 2020
Accepted: May 25, 2020
e Published: January 14, 2021

ABSTRACT

Aims: The use of stem cells has been able to treat patients with genetic and induced abnormalities and diseases such as non-obstructive azoospermia. Today, more attention has been paid to self-induced induced pluripotent stem cells (iPSCs). The aim of this study was to investigate the role of estrogen with retinoic acid on the differentiation of mouse iPSCs towards female germ cells.
Methods: In this study, mouse embryonic fibroblast cells were extracted as feeding cells and inactivated. The target groups were adjusted for estrogen with retinoic acid at intervals of days 0, 4 and 7. Expression of these genes was performed by Real Time PCR technique.
Results: In this study, the expression of genes such as *Stra8*, *Stella*, *Ddx4* and *GDF9* was evaluated. Real-time data showed that the expression of these genes increased in estrogen group on day 4 of embryoid bodies culture, while the differences were not significant on other days.
Conclusion: It is very difficult to control the differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (miPSCs) and the role of estrogen was carefully investigated in vitro in this study. Evidence suggests that female germ cells can differentiate from miPSCs in vitro. Treatment of cells with estrogen showed a greater effect on the differentiation process on day 4.

Keywords: Differentiation; Mouse induced pluripotent stem cells; Female germ cells; Estrogen; Retinoic Acid.

Copyright© 2021, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

بررسی اثر رتینوئیک اسید و استروژن بر تمایز سلول های بنیادی پرتوان القایی موش به سمت سلول های زایای ماده

جواد امینی مهابادی [۱و۲]، حسین نیک زاد [۳]*، حسن حسنی بافرانی [۴]، زهرا کرمی [۵]، وجیهه تقدیری نوش آبادی [۶]

[۱] مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۲] دکتری تخصصی بیولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقات گامتوژنزیس دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
[۳] استاد تمام آناتومی و تشریح، مرکز تحقیقات گامتوژنزیس دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
[۴] دانشیار آناتومی و تشریح، مرکز تحقیقات گامتوژنزیس دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
[۵] دانشجوی دکتری زیست شناسی تکوین،مرکز زیست شناسی دانشگاه آزاد کرج ،کرج ،ایران.
[۶] استادیار مهندسی بافت و علوم سلولی - کاربردی، مرکز تحقیقات سلول های بنیادی عصبی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

چکیده

اهداف: : استفاده از سلول های بنیادی توانسته است بیمارانی که دچار ناهنجاری های ژنتیکی و القایی و بیماری هایی از قبیل آزواسپرمی غیر انسدادی هستند، را درمان کنند. امروزه، توجه زیادی به سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) تهیه شده از خود فرد شده است. هدف از این مطالعه، بررسی نقش هورمون استروژن به همراه رتینوئیک اسید بر تمایزiPSCs موش به سمت سلول های زایای ماده می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، سلول های فیبروبلاست جنینی موش بعنوان بستری از سلول های تغذیه کننده استخراج شدند و غیر فعال گردیدند. گروه بندی های مورد نظر برای هورمون استروژن به همراه رتینوئیک اسید و در بازه های زمانی روزهای صفر، ۴ و ۷ تنظیم شد. بیان ژن های مورد نظر با تکنیک Real Time PCR انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه، بیان ژن هایی از قبیل *Stra8*، *Stella*، *Ddx4* و *GDF9* مورد بررسی قرار گرفت. داده های ریل تایم مشخص کرد که بیان این ژن ها در گروه استروژن و در روز ۴ کشت اجسام امبروئیدی افزایش یافت در حالی که در روزهای دیگر تفاوت ها معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: کنترل تمایز سلول های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) بسیار سخت است و در این مطالعه نقش هورمون استروژن در شرایط آزمایشگاهی با دقت بررسی شد. شواهد نشان می دهد که سلول های زایای ماده می توانند از miPSCs در شرایط درون آزمایشگاهی تمایز یابند. تیمار سلول ها با هورمون استروژن بر روند تمایز در روز ۴ اثر بیشتری را از خود نشان داد.

کلید واژه‌ها: تمایز؛ سلول های بنیادی پرتوان القایی موش؛ سلول های زایای ماده؛ استروژن؛ رتینوئیک اسید.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۵
تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۰۵
*نویسنده مسئول: حسین نیک زاد

مقدمه

بسیاری از زوجین دارای مشکلات ناباروری با عوامل محیطی و ژنتیکی روبرو هستند. امروزه، فناوری کمک باروری (ART) به بیماران کمک می کند تا مشکلات ناباروری خود را درمان کنند، در غیر این صورت با درمان های معمول امکان پذیر نیست [۱]. با این حال، در بیمارانی که مبتلا به تخمک های غیرطبیعی یا آزواسپرمیا هستند و جهش در سلول های زایای آن ها وجود دارد، نمی توانند از این فناوری استفاده کنند [۲،۳].

سلول های زایای ماده نقش مهمی در انتقال اطلاعات ژنتیکی به نتاج در هنگام ترکیب با سلول های زایای نر در طی فرآیند لقاح دارند. گامتوژنز فرآیندی است که در آن پیش ساز دیپلوئید به سلول زایای هاپلوئید تبدیل می شود [۴]. با این حال، اطلاعات کمی در مورد مکانیسم های مولکولی زمینه ساز گامتوژنز به دلیل فقدان وجود یک مدل کارآمد و تکرار پذیر برای این فرآیند وجود دارد.

طبق تحقیقات متعدد، در شرایط خاص سلول های بنیادی می توانند به سلول های زایا متمایز شوند که می توانند راهگشای درمان ناباروری باشند [۵،۷]. انتقال سلول های بنیادی از طریق سلول های زایای پیشرفته و یا سلول های زایای اولیه (PGCs) یک گزینه درمانی بالقوه مفید برای

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

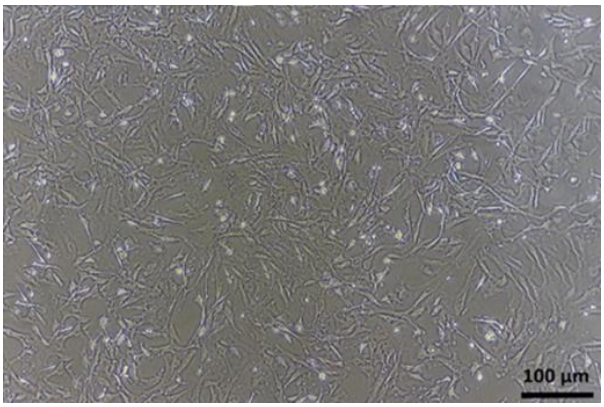
بازگرداندن ناباروری است که هیچ توجیه ژنتیکی ندارد [۸]. اخیراً، پیشرفت های قابل توجهی در مشتق شدن سلول های زایا از سلول های بنیادی جنینی (ESCs) حاصل شده است که به عنوان یک مدل آزمایشی مطلوب جهت توضیح دادن سلول های زایای پستانداران و استراتژی های بالقوه برای تولید سلول های زایای هاپلوئید مورد توجه می باشد. هابنر و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تمایز موفق گامت ها از ESC های موش را در شرایط آزمایشگاهی گزارش کردند [۹]. نیرنیا و همکاران برای اولین بار با استفاده از اسپرم القا شده از ESC های موش در شرایط آزمایشگاهی توانستند نتاج زنده توسط روش تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی (ICSI) ایجاد کنند [۱۰].

درهرحال، مشکلات اخلاقی در بدست آوردن این سلول ها به علت محدود بودن منابع آن ها وجود دارند. یکی از موفقیت های جالب در زمینه ی بیولوژی سلول های بنیادی، بدست آمدن سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) از سلول های سوماتیک با انتقال ژن های پرتوان ازجمله، oct4، Sox2، c-Myc و klf4 بود [۱۱]. این سلول ها نسبت به سلول های ESC دارای مزایایی هستند: ۱- مشکلات اخلاقی با استفاده از سلول های سوماتیک انسان ندارند ۲- منابع سلول های سوماتیک فراوان اند [۱۲]. مطالعات اخیر تمایز *In vivo* برای تمایز سلول های زایا از iPSCs را مشخص کرده اند. iPSCs مشتق شده از هپاتوسیت های بالغ موش، توانایی القا به سمت سلول های زایای اولیه (PGCs) را بدست آوردند [۱۳]. گزارش شد که iPSCs انسان هنگامی که با سلول های گونادی جنینی انسان کشت داده شدند، توانستند به PGCs تمایز یابند [۲،۳]. همچنین، iPSCs موشی با درمان توسط BMP4 توانستند به سلول های شبیه اپی بلاست تمایز یابند[۱۵]. اما، هیچ شواهدی از تنظیم کننده های فرآیند اسپرماتوژنزیس انسان در شرایط *In vivo* وجود ندارد. با این وجود، مشخص شد که بسیاری از القاکننده ها برای تمایز سلول های بنیادی پرتوان به سمت سلول های زایا حیاتی هستند [۱۶].

یکی از مشتقات ویتامین A رتینوئیک اسید است که نقش مهمی در تمایز سلولی و امبریوژنزیس دارد و شروع میوز در موش را میانجی گری می کند [۸]. رتینوئیک اسید می تواند اسپرماتوژنیس را بهبود بخشد و بیان کم ژن در بیضه های نر را از طریق ژن های اصلی شروع کننده ی میوز بعد از تولد القا کند. یکی از این ژن ها، *Stra8* است که از طریق رتینوئیک اسید بیان می شود [۱۷]. هیچ شکی نیست که هورمون های اندوکراین نقش مهمی در فرآیند اسپرماتوژنزیس دارند. عملکرد دستگاه تولیدمثلی نر و ماده می توانند با ترکیبات استروژن واسطه گری شوند. در حقیقت، بلوغ و نمو گونادهای مختلف تولیدمثلی در پستانداران می توانند با استروژن تنظیم گردند [۱۸]. با این حال، هنوز اینکه iPSCs تمایز یافته از سلول های فیبروبلاست بتوانند به طور خود به خودی سلول های زایای ماده را با استفاده از درمان رتینوئیک اسید و هورمون تولید کنند، ناشناخته است. بنابراین، هدف از مطالعه ی حاضر، بررسی اثر رتینوئیک اسید و استروژن بر تمایز سلول های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) به سمت سلول های زایای (GCs) ماده می باشد.

استخراج و غیر فعال سازی سلول های فیبروبلاست جنین موش

پس از استخراج کبد و سر جنین های موش در روز ۱۳،۵ پس از آبستنی، بدن به قطعات کوچک تر تقسیم شد. قطعات از نیدل ۱۸ عبور داده شدند و به فلاسک ۷۵ به همراه محیط DMEM با گلوکز بالا (Gibco; cat. no. 41965039) منتقل داده شدند. پس از یک روز، باقیمانده ها برداشته شده و با محیط کشت جدید شامل پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد (Pen/Strep; Gibco; cat. no. 15140-148) و سرم جنین گاوی ۱۲ درصد (FBS; Gibco; cat. no. 10270-106) تغییر یافت. سلول های فیبروبلاست جنین موش (MEFs) در پاساژ سوم به عنوان بستر تغذیه کننده به کار گرفته شدند. سپس، برای غیرفعال کردن این سلول ها، مقدار ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر میتومایسین C (Sigma; cat. no. M4287) در محیط DMEM/F12 استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱: سلول های فیبروبلاست جنین موش به عنوان بستر تغذیه کننده

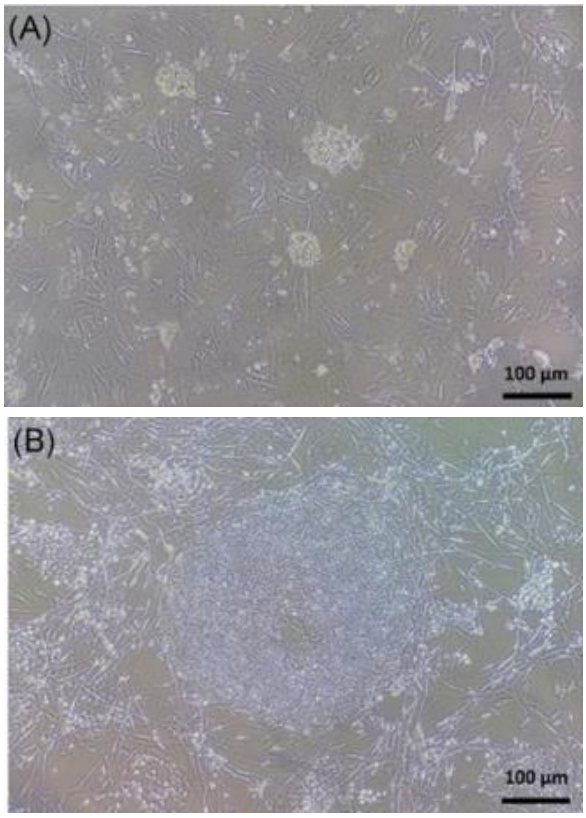
گسترش سلول های بنیادی پرتوان القایی موش

لاین miPSCs، همانطور که قبلا مشخص و گزارش شد، از پروفسور مسعود سلیمانی و از مرکز تحقیقات تکنولوژی سلول های بنیادی دریافت گردید[۱۹]. کشت این سلول ها در رطوبت ۹۵ درصد، دی اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه انجام شد و بر روی لایه ی تغذیه کننده ی حاوی MEF غیرفعال شده نگه داری شدند [۴،۲۰]. محیط کشت miPSCs حاوی DMEM/F12 حاوی ۲۰ درصد جایگزین سرم knockout (KSR; Gibco; cat. no. 10828-028)، ۱۰۰۰ واحد بر میلی لیتر فاکتور مهارکننده ی لوکمیای موشی (LIF; ESGRO; Gibco, Carlsbad, CA; cat. no. ESG1107)، یک میلی مول بر لیتر ال-گلوتامین (Gibco; cat. no. 25030-081)، انسولین- ترانسفرین- سلنیوم (ITS; Gibco; cat. no. 41400-045)، ۰،۱ میلی مول بر لیتر اسیدآمینه های غیرضروری

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

(NEAA; Gibco; cat. no. 11140-035) و ROCK inhibitor Y-27632 (Sigma; cat. no. Y0503-1 MG) (فقط یکبار بعد از ذوب کردن) بود. محیط هر روز تغییر کرد و کلونی های miPSCs هر ۴ الی ۶ روز با استفاده از آنزیم کلاژناز نوع IV ۰،۱ درصد (Gibco; cat. no. 17104-019) پاساژ داده شدند (شکل ۲).



شکل ۲: موروفولوژی miPSCs (A و B) در مدت ۶ روز کشت بر روی سلول های تغذیه کننده ی MEF

(MEF, mouse embryonic fibroblast; miPSCs, mouse-induced pluripotent stem cells)

تمایز سلول های بنیادی پرتوان القایی موش به سمت سلول های زایای ماده در شرایط آزمایشگاهی

سلول های iPSCs موش در محیط عاری از LIF بعد از ۴ الی ۵ روز در محیط کشت برای تشکیل اجسام امبروئیدی (EBs) غوطه ور شدند. سپس، در یک پلیت ۶ خانه ی غیر چسبنده (Nunc, Rochester, NY) مقدار ۵×۱۰^{۶} سلول بر میلی لیتر در محیط کشت EBs (حاوی FBS ۱۰ درصد بدون LIF) برای تشکیل این اجسام قرار داده شدند و محیط در فواصل هر دو روز تعویض شد. در مرحله ی بعد، پلیت های معمولی ۶ خانه با ژلاتین ۰،۱ درصد آماده شدند و EBs به پلیت های آماده منتقل گردیدند. برای تمایز EBs مشتق شده از miPSCs به سمت سلول های زایای ماده در شرایط *In vitro*، این سلول ها با مقدار ۱۰ نانومول استرادیول β-۱۷ (Sigma, cat. no. E2758-1G) و ۲ میکرولیتر رتینوئیک اسید (RA; Sigma; cat. no. R2625-50MG) در بازه ی زمانی روزهای ، ۴ و ۷ درمان شدند. اجسام امبروئیدی که مورد درمان قرار نگرفتند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real Time PCR

برای استخراج RNA از سلول های برداشت شده از کیت ترایزول (Invitrogen; cat. no. 15596026) بر طبق دستورالعمل استفاده شد. برای سنتز cDNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT (Takara Bio, Shiga, Japan)، یک میکروگرم RNA از هر نمونه در نظر گرفته شد. تکنیک Real Time PCR (qPCR) برای بیان کمی ژن های از قبیل: *Stra8*، *Stella*، *Ddx4* و *GDF9* انجام شد. مجموعه داده های NCBI برای استنباط کل توالی ژن های فوق الذکر مورد استفاده قرار گرفت و سپس با بهره گیری از نرم افزار آنلاینPrimer3 ، پرایمرهای خاصی طراحی شد. Blast کردن برای تعیین درصد همولوژی انجام شد. جدول ۱، طول محصول تکثیرشده، توالی پرایمرها و دمای annealing برای هر توالی را نشان می دهد. مسترمیکس qPCR شامل ۱۰ لاندا SYBR Green PCR Master Mix Buffer (×۲)، یک لاندا (۱۰۰ نانوگرم) نمونه ی cDNA و نیم لاندا از هر پرایمر پیشرو و پسرو با حجم نهایی ۲۰ لاندا تهیه شد. *GAPDH* به عنوان کنترل برای نمونه ها در نظر گرفته شد. برنامه ی qPCR بدین صورت بود: ابتدا، دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس، تعداد ۴۰ سیکل تکراری (دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، دمای انیلینگ در دمای X برای هر ژن به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. سرانجام، گسترش یافتن (extension) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه صورت گرفت. ارزیابی سیکل آستانه (Ct) محاسبه شدند. دستگاه LightCycler™ real-time PCR (Roche, Germany) برای واکنش های qPCR در سه تکرار استفاده شد.

Gene	Forward sequence(5'>3')	Reverse sequence(5'>3')	Fragment size(bp)	Annealing Temperature (°C)
Stra8	GAAGTGCCTGGAGACCTTTG	TGGAAGCAGCCTTTCT CAAT	150	59.7
Stella	TGAGAAGACTTGTTCGGATTGAG	AGTTAAGATTTCCCA GCACCAG	256	57.5
Ddx4	CTTCAGTAGCAGCACAAGAGG	GGAGGAAGAACAGAA GAACAGG	267	57.5
GDF9	AAAGAAGACTGGCACGAGGA	CTGCAGCTTAGGGGT CTCAC	289	59.6
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAG GAACA	223	57.5

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده برای آنالیز توسط تکنیک Real Time PCR و ژن ها در مراحل متفاوت تمایزی

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

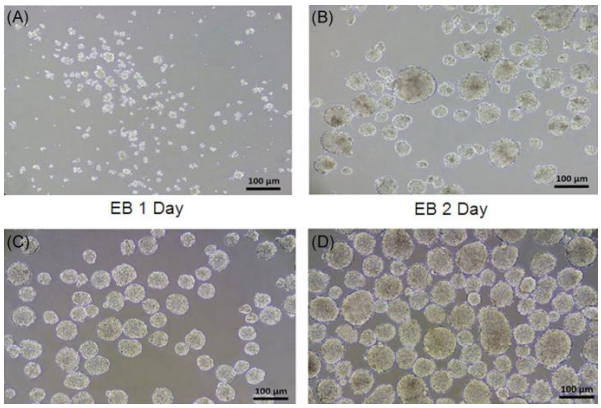
آنالیز آماری

تفاوت های معنادار بین گروه ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون Tukey به صورت One way ANOVA انجام شد. تفاوت معناداری در سطح $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

شکل گیری اجسام امبروئیدی

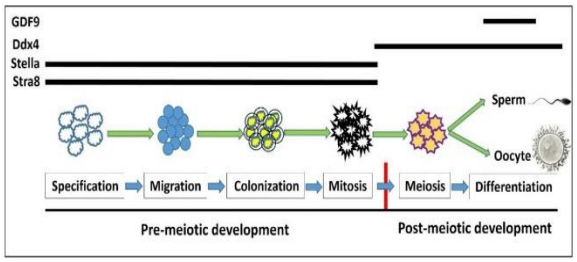
کشت سوسپانسیون برای تولید تعداد زیادی از EBs توسط روانه کردن miPSCs بر روی پتری دیش با درجه ی باکتریولوژی و غیر چسبنده انجام شد. در این حالت، سلول ها به طور خود به خودی تجمع یافتند تا تشکیل کره بدهند. در این روش، دقت در شکل و اندازه ی EBs کم است ، اما می توان تعداد زیادی از حالت کره مانند این سلول ها را بدست آورد (شکل ۳). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در ابتدا miPSCs به صورت سلول های منفرد هستند ، اما پس از گذشت ۲۴ ساعت، به طور خود به خودی تشکیل کلونی های کوچک را می دهند. سپس، این کلونی ها بعد از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در کشت سوسپانسیون ظاهری فشرده به خود می گیرند.



شکل ۳: شکل گیری اجسام امبروئیدی از سلول های بنیادی پرتوان القایی موش در شرایط *In vitro*. مورفولوژی این اجسام (A-D) در روزهای ۱، ۲، ۳ و ۴ بعد از کشت.

پروفایل بیانی ژن های خاص سلول های زایای ماده در تمایز اجسام امبروئیدی

تکنیک qPCR در روزهای صفر، ۴ و ۷ برای آنالیز پروفایل بیانی ژن ها در طول تمایز EBs از miPSCs استفاده شد. ژن *Stra8* نشان دهنده ی توانایی سلول ها برای پاسخ به رتینوئیک اسید در سلول های زایای قبل از میوزی است. ژن *Stella* (*Dppa3*)، به عنوان یک مارکر پرتوانی و قبل از میوزی در نظر گرفته می شود. ژن *Ddx4* یک مارکر میوزی است و *GDF9* نشان دهنده ی فاز پس از میوزی سلول هاست و بیان کننده ی سلول های زایای هاپلوئیدی نر می باشد (شکل ۴).



شکل ۴: ظهور شماتیک بیان ژن های موردنظر در طول تمایز. سلول های زایا از مرحله ی میتوز، میوز و پس میوز در مراحل تشخیص، کلون شدن، میتوز، میوز و تمایز به تصویر کشیده شده اند. پروفایل بیانی ژن های *Stra8*، *Stella*، *Ddx4* و *GDF9* در طی تمایز توسط خطوط تیره رنگ مشخص گردیدند.

بیان ژن *Stra8* در روزهای صفر و ۷ تغییری نکرد ، اما بیان این ژن در گروه رتینوئیک اسید و در روز ۴ در مقایسه با گروه های دیگر افزایش معناداری داشت ($P<0.01$). درهرحال، یک افزایش نسبی در گروه ترکیبی رتینوئیک اسید و استروژن در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت، اما تغییرات معنادار نبود. نتایج این مطالعه نشان داد که یک افزایش معنی دار در گروه رتینوئیک اسید در مقایسه با گروه استروژن وجود دارد ($P<0.05$). در این مطالعه مشخص گردید که بیان ژن *Stella* در روز صفر بین هر چهار گروه تغییر نکرد، در حالی که بیان این ژن در گروه استروژن نسبت به گروه رتینوئیک اسید و گروه ترکیبی رتینوئیک اسید همراه با استروژن و در روز ۴ تغییرات معناداری را داشت ($P<0.01$ و $P<0.001$). همچنین در روز ۷ هم تغییرات معناداری مشابه روز صفر مشاهده نگردید، اما به نسبت افزایش نسبی بیان این ژن در گروه رتینوئیک اسید همراه با استروژن دیده شد. در این مطالعه بیان ژن *Ddx4* هم همانند بیان ژن های قبلی در روزهای صفر و ۴ تغییرات معناداری مشاهده نگردید، در حالی که در روز ۴ تفاوت معناداری بین گروه RA+E و کنترل ($P<0.001$) دیده شد. همچنین، تفاوت معناداری بین گروه های RA+E و گروه های RA و E ملاحظه شد ($P<0.01$). نتایج qPCR نشان داد که بیان ژن *GDF9* در روز صفر هیچ تغییراتی مشاهده نگردید، اما در روزهای صفر و ۴ تفاوت های معناداری بین گروه های مختلف دیده شد. در روز ۴، اختلاف معناداری بین گروه RA+E و کنترل ($P<0.001$) مشخص شد. همچنین، بین گروه های RA+E و گروه E و گروه RA به ترتیب تفاوت معنی داری ($P<0.001$) دیده شد. در روز ۷ هم اختلافات معنادار بین گروه های RA+E و کنترل ($P<0.001$) ملاحظه گردید و همین طور بین گروه RA+E و گروه E و گروه RA به ترتیب تفاوت معنی داری ($P<0.001$) دیده شد.

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

بحث

در چند دهه ی گذشته، مطالعات زیادی در زمینه ی تولید سلول های جنسی نر و ماده از iPSCs و ESCs انجام شده است. علارغم خطر ایجاد تومور و ناهنجاری های ژنتیکی، iPSCs به سبب بحران های اخلاقی کمتر و فراوانی این سلول ها، برای ایجاد سلول های زایا بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. با این وجود، هنوز مکانیسم های مولکولی بیشتری جهت تمایز سلول های زایای نر وماده از سلول های بنیادی پرتوان نیاز است [۲۱،۲۲]. برای یک فرایند گامتوژنزیس موفق، بایستی فعل و انفعال دقیقی بین فاکتورهای متعددی که تکثیر، شروع میوز و مهاجرت سلولی را تنظیم می کنند، رخ دهد. بر طبق مطالعات، رتینوئیک اسید یک فاکتور القاء کننده ی میوز می باشد و همچنین، شروع میوز سلول زایا به رتینوئیک اسید اندوژنوس ارتباطی ندارد [۲۳،۲۵]. در این تحقیق، تمایز سلول های زایا از miPSCs بر اساس شکل گیری EBs و القای رتینوئیک اسید به همراه هورمون استروژن انجام گردید. miPSCs، تجمعات سلولی به نام اجسام امبریوئیدی را تشکیل می دهند که می توانند به طور خود به خودی از سه لایه ی زایای جنینی، به سلول هایی از قبیل سلول های زایای بدوی و بالغ تمایز یابند [۲۶،۲۷]. علاوه براین، بسیاری از محققان اذعان داشتند که iPSCs انسانی در شرایط *In vitro* می توانند به PGCs تمایز یابند [۲۸،۲۹]. با این وجود، تلاش های زیادی برای تحریک تمایز iPSCs به سمت سلول های زایا در شرایط *In vitro* صورت گرفته است. ولی، هیچ اطلاعاتی مربوط به اینکه آیا این سلول ها می توانند در شرایط *In vivo* به سلول های زایا تمایز یابند، وجود ندارد [۲۹]. در طی تمایز سلول های بنیادی به گامت ها در شرایط آزمایشگاهی، فازهای زیادی وجود دارند، از جمله: تمایز سلول های بنیادی به سمت PGCs، ورود میوزی PGCs و در نهایت بلوغ گامت و شکل گیری سلول های هاپلوئیدی [۶].

پروفایل بیانی بسیاری از ژن ها به تکثیر و یا تمایز سلول های زایای ماده در ارتباط هستند [۳۰،۳۱]. نتایج qPCR نشان داد که بیان بالای ژن *Stra8* (Stimulated By Retinoic Acid 8) به عنوان یک مارکر سلول زایای قبل میوزی در گروه رتینوئیک اسید و در روز ۴ مشاهده شد. این یافته ها با نتایج Li و همکاران مطابقت دارد. این محققان مشخص کردند که بیان این ژن با اضافه کردن رتینوئیک اسید به محیط کشت افزایش می یابد [۴]. بنابراین، با وجود بیان بالای این ژن می توان به افزوده شدن رتینوئیک اسید پی برد. Dong و همکاران در سال ۲۰۱۷ دریافتند که بیان این ژن در سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا با اضافه شدن رتینوئیک اسید در روز ۳ افزایش می یابد. اما، بیان این ژن در روز ۵ کاهش یافت. این محققان نتیجه گرفتند که اثرات عمومی سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا و رتینوئیک اسید می توانند بیان این ژن را برای تسهیل آغاز تمایز ازدیاد بخشند [۸]. Silva و همکاران تعیین کردند که در سلول های درمان شده با رتینوئیک اسید به مدت ۷ روز سبب افزایش معنی دار بیان این ژن نسبت به گروه کنترل شد که نتایج این محققان با نتایج حاصل از مشاهدات ما در تناقض بود زیرا بررسی این محققان بر روی ESCs موشی و هورمون تستوسترون بود [۳۱].

ژن *Stella* (*DPPa3* یا Developmental Pluripotency Associated 3) در شرایط *In vivo* در یک بازه ی زمانی مشخص بیان می شود که این بازه ی زمانی شامل مراحل اولیه ی تکامل جنین تا زمانی که سلول های زایای بدوی به ستیغ های تناسلی مهاجرت کرده و با استفاده از تقسیم میتوز تکثیر داده می شوند. *Stella* یا *Dppa3* یک مارکر برای پرتوانی سلول است که به همراه بسیاری از ژن های دیگر نشان دهنده ی مرحله ی قبل از میوز می باشد [۳۲]. Li و همکاران (۲۰۱۳) نتیجه گرفتند که بیان این ژن در طول شکل گیری اجسام امبروئیدی و در تمامی گروه ها نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت [۴] نتایج این محققان با نتایج ما مطابقت داشت و با روند افزایش روزها کاهش در بیان دیده شد. Eskandari و همکاران مشخص کردند که در گروه ترکیبی رتینوئیک اسید به همراه استروژن، سطح بیان این ژن در روزهای ۷ و ۱۷ در مقایسه با گروه های دیگر افزایش یافت. این نتایج با داده های تحقیق ما به علت بررسی در نوع متفاوت سلول و مقدار استروژن تیمار شده هم خوانی نداشت[۲۰]. Wongtrakoongate و همکاران دریافتند که الگوی بیانی این ژن، تمایز لاین زایای ESCs انسانی به دنبال القای رتینوئیک اسید را محافظت می کند و پیشنهاد می کند که فعال سازی ژن *Stella* یک رخداد اولیه در تمایز سلول زایا از ESCs انسانیست [۳۳].

تشخیص بیان ژن *Ddx4* (*Mvh* یا *Vasa*) یکی از عوامل مهم در شکل گیری EBs تمایز یافته از PGCs می باشد. یافته های این تحقیق نشان دادند که بیان *Ddx4* در گروه ترکیبی رتینوئیک اسید به همراه استروژن در مقایسه با گروه کنترل و در روز ۴ افزایش پیدا کرد. Eguizabal و همکاران در سال ۲۰۰۹ PGCs را از سلول های بنیادی پرتوان تولید کردند. این محققان، تمایز لاین های سلولی را با شکل گیری EBs از طریق بیان همزمان *Oct4* و *Ddx4* جهت تشخیص PGCs جدید در شرایط *In vitro* آشکار ساختند [۳۴]. Wang و همکاران القای سلول های شبه زایا از iPSCs خوک سانان را بررسی کردند. در این مطالعه، بیان ژن های مرتبط با نمو آخر سلول زایا از قبیل *Dazl* و *Ddx4* یک افزایش نسبی را نشان داد. به طوری که بیان ژن *Ddx4* در روز ۳ بیشترین مقدار و با افزایش روزها روند کاهش نسبی را از خود نشان داد ولی با گروه کنترل تفاوت معنی داری داشتند. در کل نتایج آن ها مشخص کرد که القای سلول زایا از PGCs خوک سانان در شرایط *In vivo* و *In vitro* امکان پذیر است [۳۵]. نتایج این محققان با نتایج حاصل از مطالعه ی ما به دلیل بررسی بر نوع حیوان متناقص می باشد.

پروتئین *GDF9* (growth differentiation factor 9) توسط ژن *GDF9* کد می شود. این پروتئین توسط سلول های سوماتیک تخمدان سنتز می گردد و ژن *GDF9* به وسیله ی تخمک بیان می شود [۳۶]. این ژن نقش کلیدی در تکامل فولیکول های اولیه در تخمک دارد. *GDF9* در موش اولین بار در روز ۱۳ پس از لقاح بیان می شود [۳۷]. در مطالعات مختلفی که بر تکامل وتمایز به سمت سلول های زایا صورت گرفته است، بیان این ژن را مورد بررسی قرار داده اند [۳۸] Qing و همکاران دریافتند که

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

PGCs از EBs کشت داده شده بدست آمدند و سپس آن ها بر روی یک لایه از سلول های گرانولوزآی تخمدان جنین کشت همزمان داده شدند. در این حین، افزایش مارکر میوزی *Sycp3* و ژن خاص اووسایت از قبیل *GDF9* را مشاهده کردند [۳۹]. Eskandari و همکاران با بررسی اثر رتینوئیک اسید و استروژن دریافتند که بیان ژن *GDF9* فقط در گروه رتینوئیک اسید به همراه استروژن و در روز ۲۲ نسبت به دیگر گروه ها افزایش یافت. آن ها دریافتند که اثر ترکیبی این دو می تواند بر بیان ژن های خاص اسپرم و تخمک تاثیر زیادی داشته باشد [۲۰]. نتایج آن ها با نتایج ما در گروه استروژن می تواند تا حدودی و تا روز ۷ مشابه باشد. تحقیق ما بایستی تا روز ۲۲ ادامه یابد، ولی در کار اسکندری و همکاران گروه استروژن به تنهایی مورد مطالعه قرار نگرفت و نوع سلولی که کار بر روی آن انجام شد با سلول ما متفاوت بود.

در این مطالعه پیشنهاد می شود که برای تشکیل اجسام امبریوئیدی از قطره های آویزان یا Hanging drop استفاده شود. همچنین، بیان ژن ها و بازه های زمانی بیشتری در هر مرحله مورد بررسی قرار گیرد. پیشنهاد می شود که غلظت های دیگری از هورمون استروژن و رتینوئیک اسید مورد بررسی قرار گیرد. بهتر است پس از جداسازی سلول های تمایز یافته، این سلول ها به موش های آزواسپرمی تزریق شده و فرآیند *In vivo* نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

کنترل تمایز iPSCs بسیار سخت است و در شرایط آزمایشگاهی باید با دقت بررسی شود. شواهد نشان می دهد که سلول های زایای ماده می توانند از miPSCs در شرایط *In vitro* و با شرایط کشت بسیار مناسب تمایز یابند. با وجود شرایط تمایز و بلوغ سلول های زایا در شرایط *In vitro*، تولید گامت ها می تواند به عنوان یک فرضیه ی عملی در آینده ی نه چندان دور در نظر گرفته شود. در هرحال، هنوز دلایل نامشخصی از ژنتیک و یا اپی ژنتیک وجود دارند که باید مورد توجه قرار گیرد تا بتوان از این گامت های تولیدی در کلینیک ها مورد استفاده قرار گیرند. اثر ترکیبی هورمون استروژن با رتینوئیک اسید باعث بیان ژن و پروتئین در روز ۴ کشت اجسام امبروئیدی شد و درصد سلول ها را به سمت سلول های هاپلوئیدی ماده سوق داد. می توان نتیجه گرفت که با افزودن رتینوئیک اسید و این هورمون ، بررسی در فاصله ی زمانی ۰ تا ۴ روز روند تمایز را افزایش می دهد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله ی استخراجی از پایان نامه ی دوره ی دکترا توسط دانشگاه علوم پزشکی کاشان (شماره ی گرنت: ۹۴۱۵۳) حمایت شد. محققان همچنین از همکاری دلسوزانه همه پرسنل در مراکز تحقیقات علوم تشریحی و گامتوژنزیس دانشگاه علوم پزشکی کاشان قدردانی می کنند.

سهم نویسندگان در مقاله:

جواد امینی مهابادی (نویسنده ی اول)، نگارنده ی مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری ۵۰٪؛ حسین نیک زاد (نویسنده ی دوم و مسئول)، طراحی ایده/ پژوهشگر کمکی ۲۰٪؛ حسن حسنی بافرانی (نویسنده ی چهارم)، پژوهشگر کمکی ۱۰٪؛ زهرا کرمی (نویسنده ی چهارم)، پژوهشگر کمکی و ادیت کامل مقاله ۱۰٪، وجیهه تقدیری نوش آبادی (نویسنده ی پنجم)، پژوهشگر کمکی ۱۰٪.

تاییدیه اخلاقی:

فرآیندهای آزمایشگاهی و حمایت از حیوانات دقیقاً بر اساس کد اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران رعایت گردید. این پژوهش به تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان رسیده است.
(IR.KAUMS.REC.1394.150).

تعارض منافع:

در این مطالعه تعارض منافع وجود نداشت.

منابع مالی:

توسط دانشگاه علوم پزشکی کاشان تامین شده است.

منابع:

1. Mahabadi JA, Tameh AA, Talaei SA, Karimian M, Rahiminia T, Enderami SE, et al. Retinoic acid and/or progesterone differentiate mouse induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro. J Cell Biochem. 2020;121(3):2159-69.
2. Li Y, Wang X, Feng X, Liao S, Zhang D, Cui X, et al. Generation of male germ cells from mouse induced pluripotent stem cells in vitro. Stem Cell Res. 2014;12(2):517-30.
3. Qiao J, Wang Z-B, Feng H-L, Miao Y-L, Wang Q, Yu Y, et al. The root of reduced fertility in aged women and possible therapentic options: current status and future perspects. Mol Aspects Med. 2014;38:54-85.
4. Li P, Hu H, Yang S, Tian R, Zhang Z, Zhang W, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro through embryoid body formation and

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

retinoic acid or testosterone induction. Biomed Res Int. 2013;2013.
5. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell–like cells in mice. Science (80-). 2012;338(6109):971–5.
6. Tan H, Wang J-J, Cheng S-F, Ge W, Sun Y-C, Sun X-F, et al. Retinoic acid promotes the proliferation of primordial germ cell–like cells differentiated from mouse skin-derived stem cells in vitro. Theriogenology. 2016;85(3):408–18.
7. Ge W, Ma H-G, Cheng S-F, Sun Y-C, Sun L-L, Sun X-F, et al. Differentiation of early germ cells from human skin-derived stem cells without exogenous gene integration. Sci Rep. 2015;5(1):1–9.
8. Dong G, Shang Z, Liu L, Liu C, Ge Y, Wang Q, et al. Retinoic acid combined with spermatogonial stem cell conditions facilitate the generation of mouse germ-like cells. Biosci Rep. 2017;37(2).
9. Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science (80-). 2003;300(5623):1251–6.
10. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. Dev Cell. 2006;11(1):125–32.
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663–76.
12. Amini Mahabadi J, Karimian M, Aghighi F, Enderami SE, Seyyed Hosseini E, Talaei SA, et al. Retinoic acid and 17β-estradiol improve male germ cell differentiation from mouse-induced pluripotent stem cells. Andrologia. 2020;52(2):e13466.
13. Imamura M, Aoi T, Tokumasu A, Mise N, Abe K, Yamanaka S, et al. Induction of primordial germ cells from mouse induced pluripotent stem cells derived from adult hepatocytes. Mol Reprod Dev. 2010;77(9):802–11.
14. Park TS, Galic Z, Conway AE, Lindgren A, Van Handel BJ, Magnusson M, et al. Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. Stem Cells. 2009;27(4):783–95.
15. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell. 2011;146(4):519–32.
16. Mahabadi JA, Sabzalipoor H, Kehtari M, Enderami SE, Soleimani M, Nikzad H. Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells by inducers: A review. Cytotherapy. 2018;20(3):279–90.
17. Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development. Development. 2012;139(5):843–58.
18. La Sala G, Farini D, De Felici M. Rapid estrogen signalling in mouse primordial germ cells. Exp Cell Res. 2010;316(10):1716–27.
19. Lahmy R, Soleimani M, Sanati MH, Behmanesh M, Kouhkan F, Mobarra N. MiRNA-375 promotes beta pancreatic differentiation in human induced pluripotent stem (hiPS) cells. Mol Biol Rep. 2014;41(4):2055–66.
20. Eskandari N, Moghaddam MH, Atlasi MA, Mahabadi JA, Taherian A, Nikzad H. The combination of retinoic acid and estrogen can increase germ cells genes expression in mouse embryonic stem cells derived primordial germ cells. Biologicals. 2018;56:39–44.
21. Mahabadi JA, Sabzalipour H, Bafrani HH, Gheibi Hayat SM, Nikzad H. Application of induced pluripotent stem cell and embryonic stem cell technology to the study of male infertility. J Cell Physiol. 2018;233(11):8441–9.
22. Yang S, Yuan Q, Niu M, Hou J, Zhu Z, Sun M, et al. BMP4 promotes mouse iPS cell differentiation to male germ cells via Smad1/5, Gata4, Id1 and Id2. Reproduction. 2017;153(2):211–20.
23. Mi Y, He B, Li J, Zhang C. Progesterone regulates chicken embryonic germ cell meiotic initiation independent of retinoic acid signaling. Theriogenology. 2014;82(2):195–203.
24. Griswold MD, Hogarth CA, Bowles J, Koopman P. Initiating meiosis: the case for retinoic acid. Biol Reprod. 2012;86(2):31–5.
25. Kumar S, Lively B, Liu T, Sun L, Tangpong A, Zhong W. Dramatic effects of scalable snn-assisted melt dispersion on thermal conductivity and coefficient of thermal

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]

expansion of nanocomposites. Macromol Mater Eng. 2011;296(2):151–8.
26. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 2004;427(6970):148–54.
27. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. In vitro germ cell differentiation from embryonic stem cells of mice: induction control by BMP4 signalling. Biosci Rep. 2016;36(6).
28. Panula S, Medrano J V, Kee K, Bergström R, Nguyen HN, Byers B, et al. Human germ cell differentiation from fetal-and adult-derived induced pluripotent stem cells. Hum Mol Genet. 2011;20(4):752–62.
29. Yang S, Bo J, Hu H, Guo X, Tian R, Sun C, et al. Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells in vitro and in reconstituted seminiferous tubules. Cell Prolif. 2012;45(2):91–100.
30. Xuemei L, Jing Y, Bei X, Juan H, Xinling R, Qun L, et al. Retinoic acid improve germ cell differentiation from human embryonic stem cells. Iran J Reprod Med. 2013;11(11):905.
31. Silva C, Wood JR, Salvador L, Zhang Z, Kostetskii I, Williams CJ, et al. Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone. Mol Reprod Dev Inc Gamete Res. 2009;76(1):11–21.
32. Saiti D, Lacham-Kaplan O. Mouse Germ Cell Development in-vivo and in-vitro. Biomark Insights. 2007;2:117727190700200030.
33. Wongtrakoongate P, Jones M, Gokhale PJ, Andrews PW. STELLA facilitates differentiation of germ cell and endodermal lineages of human embryonic stem cells. PLoS One. 2013;8(2):e56893.
34. Eguizabal C, Shovlin TC, Durcova-Hills G, Surani A, McLaren A. Generation of primordial germ cells from pluripotent stem cells. Differentiation. 2009;78(2–3):116–23.
35. Wang H, Xiang J, Zhang W, Li J, Wei Q, Zhong L, et al. Induction of germ cell-like cells from porcine induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2016;6(1):1–13.
36. McGrath SA, Esquela AF, Lee S-J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. Mol Endocrinol. 1995;9(1):131–6.
37. Levine AJ, Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. Development. 2006;133(2):209–16.
38. Linher K, Dyce P, Li J. Primordial germ cell-like cells differentiated in vitro from skin-derived stem cells. PLoS One. 2009;4(12):e8263.
39. Qing T, Shi Y, Qin H, Ye X, Wei W, Liu H, et al. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. Differentiation. 2007;75(10):902–11.

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-11-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.5.1.18]