Sarem Journal of Medical Research. Volume 6, Issue 1, spring 2021: 61-69

Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells (miPSCs) Into Male Germ Cells (mGCs) By Retinoic Acid and Testosterone

ARTICLE INFO

Article Type
Original article

Authors
Javad Amini Mahabadi[1,2,3], PhD
Alireza Amini Mahabadi[4], MD
Mojgan Faghihi[1], MD
Hossein Nikzad[5], PhD
Abolfazl Aazami Tameh[6*], PhD

[1] Sarem Fertility and Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Science (IUMS), Tehran, Iran.
[2] Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran.
[3] PhD of reproductive biology, Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
[4] Responsible for administrative affairs, Payame Noor University, Ardestan, Isfahan, Iran.
[5] Full professor of Anatomical science, Gametogenesis Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
[6] Full professor of Anatomical science, Anatomical Science Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Corresponding Author
Address: Full professor of Anatomical science, Anatomical Science Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
abolfazl1980@gmail.com

Article History
Received: May 07, 2021
Accepted: June 18, 2021
e Published: December 20, 2021

ABSTRACT

Introduction: Donation of sex-specific cells or production of germ cells through germ cells and preparation of the source of these cells by using embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells are considered as methods for treating azoospermia, even in the absence of spermatogonia stem cells. The aim of the present study was to investigate the effect of retinoic acid and testosterone on the differentiation of mouse-induced pluripotent stem cells into male germ cells.
Material and methods: Inactivated mouse embryonic fibroblast cells (MEFs) were used as feeding cells for mouse-induced pluripotent stem cells (miPSCs). These stem cells were transformed into embryoid bodies (EBs). Four groups including control, retinoic acid (RA), testosterone (T), and the combined group of retinoic acid with testosterone (RA+T) were adjusted at intervals of days 0, 4, and 7. The target genes were Stra8 (Stimulated by Retinoic Acid 8), Ddx4 (DEAD-Box Helicase 4), and AKAP3 (A-Kinase Anchoring Protein 3), and their expression was assessed by the Real-Time PCR technique. Statistical data were analyzed by SPSS software, one-way ANOVA, and Tukey test with a P-value of <0.05 regarded as significant.
Results: The data showed that the expression of Stra8 gene on day 0 in RA group had a significant increase compared to T group (P<0.05) and a non-significant increase compared to the control group. Also, a significant increase was observed in RA+T group compared to the control group, as well as the T group (P<0.001). Ddx4 gene expression was not significantly different for different days and groups. The expression of AKAP3 gene was significantly increased between T and RA group on day 4 (P<0.01), but the expression was decreased between group T and RA+T group (P<0.01). On day 7, the expression of this gene was significantly different between RA+T, control, T, and RA groups (P<0.0001).
Conclusion: Control of differentiation of induced pluripotent stem cells (miPSCs) in mouse is very difficult and in this study, the role of testosterone in vitro, in this differentiation process was carefully investigated. For the testosterone-treated group, it was shown that the combined effect of testosterone with retinoic acid enhances the differentiation process.

Keywords: Infertility; Induced Pluripotent Stem Cells; Germ Cells; Testosterone; 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 2025-08-20]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) به سمت سلول‌های زایای نر (mGCs) توسط رتینوئیک اسید و تستوسترون

جواد امینی مهابادی[۱،۲،۳]، علیرضا امینی مهابادی[۴]، مژگان فقیهی[۱]، حسین نیک زاد[۵]، ابوالفضل اعظمی طامه*[۶]

[۱] مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۲] پژوهشکده سلولی و مولکولی و سلول های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۳] دکتری تخصصی بیولوژی تولیدمثل؛ مرکز تحقیقات گامتوژنزیس دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
[۴] مسئول امور اداری، دانشگاه پیام نور، اردستان، اصفهان، ایران.
[۵] استاد تمام؛ مرکز تحقیقات گامتوژنزیس دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.
[۶] استاد تمام؛ مرکز تحقیقات آناتومی؛ دانشگاه علوم پزشکی کاشان، بلوار قطب راوندی، کاشان.

چکیده

مقدمه: اهدای سلول جنسی و یا تولید سلول‌های جنسی از طریق سلول‌های زایا و تهیه منبع این سلول‌ها از طریق سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، روش‌هایی برای درمان آزواسپرمی، که حتی فاقد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می باشند، در نظر گرفته می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر رتینوئیک اسید و تستوسترون بر تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش به سمت سلول‌های زایای نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (MEFs) به عنوان بستری از سلول‌های تغذیه کننده برای سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) استفاده و غیر فعال گردیدند. سلول‌های بنیادی مورد نظر به اجسام امبریوئیدی (EBs) تبدیل شدند. چهار گروه شامل کنترل، رتینوئیک اسید (RA)، تستوسترون (T) و گروه ترکیبی رتینوئیک اسید به همراه تستوسترون (RA+T) در بازه‌های زمانی روزهای صفر، ۴ و ۷ تنظیم شد. ژن های مورد نظر Stra8 (Stimulated by Retinoic Acid 8)، Ddx4 (DEAD-Box Helicase 4) و AKAP3 (A-Kinase Anchoring Protein 3) بودند و بیان آن‌ها توسط تکنیک Real Time PCR بررسی گردید. داده‌های آماری با نرم افزار SPSS و One-Way ANOVA و آزمون Tukey و با سطح معنی‌دار بودن $P<0.05$ آنالیز شدند.

یافته ها: داده‌ها نشان داد که بیان ژن *Stra8* در روز صفر و در گروه RA نسبت به گروه T افزایش معنی‌داری دارد ($P<0.05$) و نسبت به گروه کنترل نیز افزایش داشت ولی معنی‌دار نبود. همچنین، بین گروه RA+T و گروه کنترل و نیز این گروه و گروه T افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<0.001$). بیان ژن *Ddx4* در تمامی روزها و در تمامی گروه‌ها هیچ تفاوت معنی داری نداشت. بیان ژن *AKAP3* هم در روز ۴، بین گروه T و RA افزایش معنی‌داری دیده شد ($P<0.01$)؛ اما، بین گروه T و گروه RA+T میزان بیان کاهش یافت ($P<0.01$). این ژن در روز ۷ بین گروه RA+T نسبت به گروه کنترل، T و RA اختلاف معنی‌دار بود ($P<0.001$).

نتیجه‌گیری: کنترل تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) بسیار سخت است و در این مطالعه، نقش هورمون تستوسترون در شرایط آزمایشگاهی و در این فرآیند تمایز با دقت بررسی شد. برای گروه تیمار شده با تستوسترون نشان داده شد که اثر ترکیبی این هورمون با رتینوئیک اسید می‌تواند روند تمایزی را تقویت نماید.

کلید واژه‌ها: ناباروری؛ سلول های بنیادی پرتوان القایی؛ سلول های زایا؛ تستوسترون؛ رتینوئیک اسید.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۸
*نویسنده مسئول: ابوالفضل اعظمی طامه

مقدمه

ناباروری ۱۰ الی ۱۵ درصد زوج ها را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد که در حال حاضر درمان‌های ناباروری محدود هستند. امروزه برای توسعه و گسترش تعداد سلول زایا و یا بازسازی ارگان‌های تولیدمثلی، بایستی درک عمیقی از بیولوژی اندام تولیدمثلی از جمله بیضه و تخمدان داشت [۱]. تعداد کم و کیفیت پائین اسپرم و عارضه آزواسپرمی[۱] یکی از فاکتورهـای مهم در نقص عملکرد و کاهش تحرک اسپرم، که امـروزه توجـه محققین زیادی را به خود جلب کرده است، می‌باشد [۲]. آزواسپرمی در ۱۰ تا ۱۵ درصد

[۱] Azoospermia

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]
[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

مردان نابارور وجود دارد و یک درصد از جمعیت کل این مردان را به خود اختصاص می‌دهد [۳]. آزواسپرمیای غیر انسدادی که در نتیجه نقص بیضوی ایجاد می گردد، در حدود ۱۰ درصد از مردان نابارور را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد و در ۶۰ درصد از مردان آزواسپرمیا تشخیص داده می شود [۴]. در طی چند سال گذشته، استفاده از سلول‌های بنیادی توانسته است بیمارانی که دچار ناهنجاری‌های ژنتیکی و القایی و بیماری‌هایی از قبیل آزواسپرمی هستند، را درمان کنند [۵و۶]. سلول‌های بنیادی قادرند تا دوباره خود را بازسازی کنند و برای درمان و بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند [۷]. سلول‌های بنیادی از هر منبعی، توانایی این را دارند تا به سلول‌های دیگر تمایز یابند و برای کشف داروها، مهندسی بافت و همچنین درمان سلولی و درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند [۸]. امروزه یکی از روش‌های جدید برای درمان ناباروری انسان تولید سلول‌های پرتوان القایی [۲]از سلول‌های سوماتیک [۳]است [۹]. برنامه ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک انسان به مرحله پرتوان شبیه سلول‌های بنیادی جنینی [۴]توسط فاکتورهای رونویسی، برای اولین بار توسط Takahashi و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص گردید و نشان داده شد که این سلول‌ها می‌توانند از سلول‌های خاص خود بیمار و برای انواع متفاوت بیماری‌ها تولید گردند [۱۰]. القای پرتوانی در فیبروبلاست‌های جنین موش با ۴ فاکتور رونویسی از قبیل *Oct3/4*، SOX_2، KLF_4 و *c-MYC* به عنوان فاکتورهای یاماناکا [۵]بدست آورده شدند [۱۱]. هم iPSCs و هم ESCs پرتوان هستند و این توانایی را دارند تا به سه لایه زایا تمایزی اولیه تمایز یابند، بنابراین تولید سالم و مناسب این سلول‌ها جهت درمان، از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد [۱۲]. درحالی که گزارش‌هایی از کاربرد ESCs جهت درمان در مدل‌های حیوانی وجود دارند اما حداقل دو مانع برای استفاده این سلول‌ها در انسان در نظر گرفته می‌شود، اول، رد درمان به دلیل پاسخ ایمنی پس از انتقال این سلول‌ها و دوم ملاحظات اخلاقی [۱۳و۱۴]. امروزه iPSCs این نگرانی‌ها را برطرف می‌کند زیرا این امکان وجود دارد که از سلول‌های سوماتیک خود فرد برای تولید این سلول‌ها استفاده شود و بنابراین هیچ پاسخ ایمنی وجود ندارد. همچنین، مزیت دیگر این است که iPSCs شخص بیمار می‌تواند برای تحقیقات دارویی و پزشکی مورد استفاده قرار گیرد[۱۵]. تا به حال iPSCs به سمت سلول‌های زایای بدوی [۶]، گونوسایت‌ها [۷]، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا [۸]، اسپرماتوسایت‌ها [۹]و سلول‌های شبه اسپرماتید [۱۰] تمایز داده شده‌اند. مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹، القاء PGCs از iPSCs و ESCs را گزارش کردند [۱۶]. رتینوئیک اسید [۱]یک متابولیت ویتامین A [۲]می‌باشد که در رشد و تمایز جنین انسان و سایر طنابداران دارای نقش عملکردی مهمی است [۱۷]. رتینوئیک اسید می‌تواند اسپرماتوژنیس [۳]را بهبود بخشد و بیان کم ژن در بیضه‌های نر را از طریق ژن‌های اصلی شروع کننده میوز بعد از تولد القا کند [۱۸]. هورمون‌های استروئیدی تنظیم کننده فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل تولیدمثل، تمایز، رشد و نمو و هموستازی بدن هستند. این هورمون‌ها اثرات خود را با باند شدن به گیرنده‌های درون سلولی نشان می‌دهند. فعالیت این هورمون‌ها توسط پیامبرهای ثانویه درون سلولی و یا آبشارهای انتقال سیگنالی انجام می‌شود [۱۹]. تستوسترون یکی از هورمون‌های جنسی مردانه است که متعلق به گروه آندروژن‌ها می‌باشد. این هورمون نقش مهمی در نمو سیستم تولیدمثلی مردان و خصوصیات ثانویه جنسی دارد [۲۰و۲۱]. انتقال سلول‌های لایدیگ [۴]تمایز یافته از سلول‌های بنیادی ممکن است برای درمان هایپوگونادیسم مردان موثر باشد. به علت اینکه بقای iPSCs کم است بنابراین بایستی شرایطی فراهم گردد تا قدرت تمایزی آن‌ها افزایش یابد. در نتیجه با توجه به نقش این هورمون‌های استروئیدی به خصوص تستوسترون در روند تمایزی iPSCs به سلول‌های زایا، هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش این هورمون بر تمایز miPSCs به سلول‌های شبه زایای نر [۵]در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

رعایت اصول اخلاقی

فرآیندهای آزمایشگاهی و حمایت از حیوانات دقیقا بر اساس کد اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران رعایت گردید [۱۶].

استخراج و غیر فعال سازی سلول‌های فیبروبلاست جنین موش

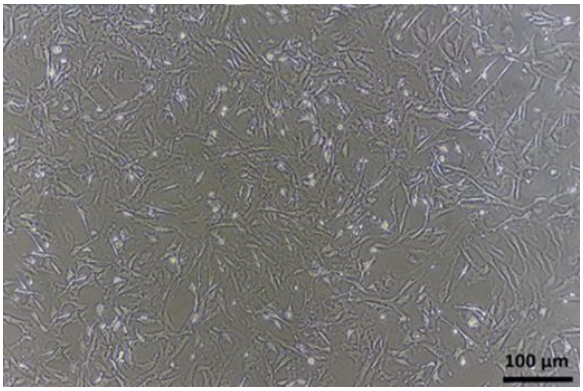
پس از جدا کردن کبد و سر جنین‌های موش در روز ۱۳٫۵ پس از آبستنی (منظور از روز ۰٫۵، مدت ۱۲ ساعت بعد از تزریق هورمون hCG و مشاهده پلاک واژینال است که ۱۳ روز بعد سلول‌های فیبروبلاست جنینی قابل استفاده می‌باشد)، بدن به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد. قطعات از نیدل ۱۸ عبور داده شدند و به فلاسک ۷۵ به همراه محیط DMEM با گلوکز بالا [۱۷] منتقل داده شدند. پس از یک روز، باقیمانده‌ها برداشته شده و با محیط کشت جدید شامل پنی‌سیلین/استرپتومایسین یک درصد [۱۸]و سرم جنین گاوی ۱۲ درصد [۱۹]تغییر یافت. سلول‌های فیبروبلاست جنین موش [۲۰]در پاساژ سوم به عنوان بستر تغذیه کننده به کار گرفته شدند. سپس، برای

[۲] Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)
[۳] Somatic Cell
[۴] Embryonic Stem Cells (ESCs)
[۵] Yamanaka Factors
[۶] Primordial Germ Cells (PGCs)
[۷] Gonocytes
[۸] Spermatogonial Stem Cells (SSCs)
[۹] Spermatocytes
[۱۰] Spermatid-like Cells
[۱۱] Retinoic Acid (RA)
[۱۲] Retinol
[۱۳] Spermatogenesis
[۱۴] Leydig Cells
[۱۵] Male Germ Cells (mGCs)
[۱۶] IR.KAUMS.REC.1394.150
[۱۷] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Gibco, Cat. No. 41965039)
[۱۸] Pen/Strep (Gibco, Cat. No. 15140-148)
[۱۹] FBS (Gibco; Cat. No. 10270-106)
[۲۰] Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs)

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

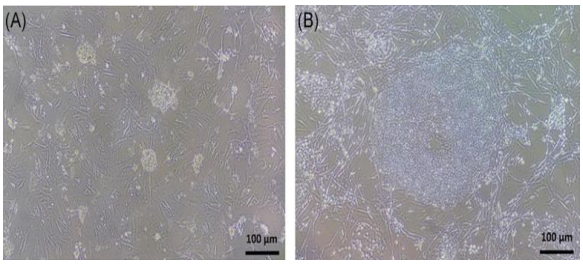
غیرفعال کردن این سلول‌ها، مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میتومایسین C [۲۱] در محیط DMEM/F12 استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱. سلول‌های فیبروبلاست جنین موش به عنوان بستر تغذیه کننده

گسترش سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش

لاین miPSCs، همانطور که قبلا مشخص و گزارش شد، از پروفسور مسعود سلیمانی و از مرکز تحقیقات تکنولوژی سلول‌های بنیادی دریافت گردید [۲۲]. کشت این سلول‌ها در رطوبت ۹۵ درصد، دی اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه انجام شد و بر روی لایه تغذیه کننده حاوی MEF غیرفعال شده نگهداری شدند [۲۳و۲۴]. محیط کشت miPSCs حاوی DMEM/F12 حاوی ۲۰ درصد جایگزین سرم KnockOut [۲۲]، ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر فاکتور مهارکننده لوکمیای موشی [۲۳]، یک میلی‌مول بر لیتر ال-گلوتامین [۲۴]، انسولین-ترانسفرین-سلنیوم [۲۵]، ۰٫۱ میلی‌مول بر لیتر اسیدآمینه‌های غیرضروری [۲۶] و ROCK Inhibitor Y-27632 [۲۷] (فقط یکبار بعد از ذوب کردن) بود. محیط هر روز تغییر کرد و کلونی‌های miPSCs هر ۴ الی ۶ روز با استفاده از آنزیم کلاژناز نوع IV [۲۸] ۰٫۱ درصد پاساژ داده شدند (شکل ۲).



شکل ۲. مورفولوژی miPSCs (A و B) در مدت ۶ روز کشت بر روی سلول‌های تغذیه کننده MEF

شکل‌گیری اجسام امبروئیدی

اجسام امبروئیدی تجمعات سه بعدی از سلول‌های بنیادی پرتوان هستند. سلول‌های miPSCs درون EBs در معرض تمایز قرار می‌گیرند و تشکیل هر سه لایه جنینی از جمله اکتودروم، مزودرم و اندودرم را می‌دهند. برای انجام این کار ابتدا، فلاسک مورد نظر از انکوباتور خارج شده و فرآیند کندن این سلول‌ها انجام شد. سپس پلیت ۶ خانه غیر چسبنده [۲۹] زیر هود آماده شد و مقدار ۲ میلی‌لیتر از محیط miPSCs به غیر از فاکتور تمایزی LIF افزوده شد. سپس سلول‌ها پس از اتمام سانتریفیوژ، با مقدار ۱ میلی‌لیتر از محیط جدید کامل Up&Down شد تا به صورت سلول‌های جدا از هم [۳۰] در آیند. به هر خانه از پلیت ۶ خانه غیرچسبنده [۳۱]، مقدار ۵×۱۰^{۶} سلول بر میلی‌لیتر، در محیط کشت EBs (حاوی FBS ۱۰ درصد بدون LIF)، از سلول‌ها اضافه شدند. تا دو روز اول محیط تعویض نشد ولی روز سوم و چهارم هر روز تعویض محیط انجام شد.

سلول‌های miPSCs در محیط عاری از LIF بعد از ۴ الی ۵ روز در محیط کشت برای تشکیل اجسام امبروئیدی (EBs) غوطه ور شدند. سپس، برای تشکیل این اجسام، محیط در فواصل هر دو روز تعویض شد.

تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش به سمت سلول‌های زایای نر در شرایط آزمایشگاهی

در این مرحله، پلیت‌های معمولی ۶ خانه با ژلاتین ۰٫۱ درصد آماده شدند و EBs به پلیت‌های آماده منتقل گردیدند. برای تمایز EBs مشتق شده از miPSCs به سمت سلول‌های زایای نر در شرایط *In Vitro*، این سلول‌ها با مقدار یک میکرولیتر تستوسترون [۳۲] و ۲ میکرولیتر رتینوئیک اسید [۳۳] در بازه زمانی روزهای صفر، ۴ و ۷ درمان شدند. اجسام امبروئیدی که مورد درمان قرار نگرفتند، به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. در کل گروه‌بندی این مطالعه شامل، گروه کنترل (C) (بدون تیمار)، گروه رتینوئیک اسید (RA)، گروه تستوسترون (T) و گروه ترکیبی رتینوئیک اسید به همراه تستوسترون (RA+T) بودند، که در بازه‌های زمانی صفر، ۴ و ۷ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند (شکل ۳).

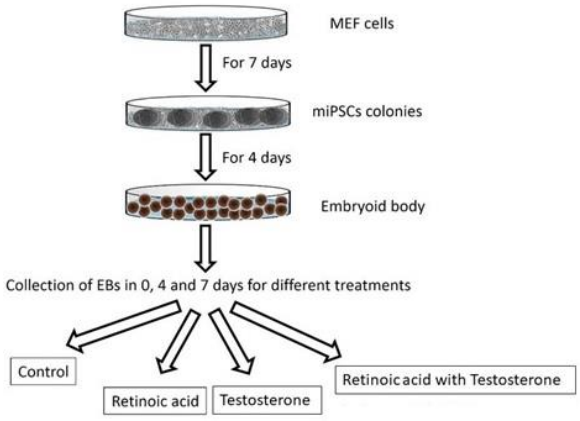
استخراج RNA، سنتز cDNA و Real Time PCR

برای استخراج RNA از سلول‌های برداشت شده از کیت ترایزول [۳۴] بر طبق دستورالعمل استفاده شد. برای سنتز cDNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT [۳۵]، یک میکروگرم RNA از هر نمونه در نظر گرفته شد. تکنیک Real Time PCR (qPCR) برای بیان کمی ژن‌های *Stra8*، *Ddx4* و *AKAP3* انجام شد. مجموعه داده‌های NCBI برای استنباط کل توالی ژن‌های فوق الذکر مورد استفاده قرار گرفت و سپس با بهره‌گیری از

[۲۱] Mitomycin C (Sigma; Cat. No. M4287)
[۲۲] KnockOut (Gibco; Cat. No. 10828-028)
[۲۳] Leukemia Inhibitory Factor (LIF), (ESGRO; Gibco, Cat. No. ESG1107)
[۲۴] L-glutamine (Gibco, Cat. No. 25030-081)
[۲۵] Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), (Gibco; Cat. No. 41400-045)
[۲۶] NEAA; Gibco; Cat. No. 11140-035)
[۲۷] Sigma; Cat. No. Y0503-1 MG
[۲۸] Collagenase IV (Gibco; Cat. No. 17104-019)
[۲۹] Non Adherent
[۳۰] Single Cells
[۳۱] Nunc, Rochester, NY
[۳۲] Sigma, Cat. No. T6147
[۳۳] Sigma; Cat. No. R2625-50MG
[۳۴] TRIzol (Invitrogen, Cat. No. 15596026)
[۳۵] Takara Bio, Shiga, Japan

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]
[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

نرم افزار آنلاین Primer3، پرایمرهای خاصی طراحی شد و Blast کردن برای تعیین درصد همولوژی انجام گردید. جدول ۱، طول محصول تکثیر شده، توالی پرایمرها و دمای Annealing برای هر توالی را نشان می‌دهد. 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 نمونه‌ها در نظر گرفته شد. برنامه qPCR بدین صورت بودT 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[۳۶] به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه صورت گرفت. ارزیابی سیکل آستانه [۳۷] محاسبه شدند. دستگاه LightCycler™ Real-Time PCR[۳۸] برای واکنش‌های qPCR در سه تکرار استفاده شد.



شکل ۳. طرح شماتیک زمان‌بندی تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) به سمت سلول‌های زایای نر، بر بستر سلول‌های فیبروبلاست جنین موش (سلول های MEF)

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای آنالیز توسط تکنیک Real Time PCR و ژن‌ها در مراحل متفاوت تمایزی

Genes	Forward Sequence (5'>3')	Reverse Sequence (5'>3')	Fragment Size (bp)	Annealing Temperature (°C)
Stra8	GAAGTGCCTGGAGACCTTTG	TGGAAGCAGCCTTTCTCAAT	150	59.7
Ddx4	CTTCAGTAGCAGCACAAGAGG	GGAGGAAGAACAGAAGAACAGG	267	57.5
AKAP3	CGCAAAGACCTGGAGAAAAG	CCACTTCCTCCACAAACGAT	82	58
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA	223	57.5

[۳۶] Extension
[۳۷] Cycle threshold (Ct)
[۳۸] Roche, Germany

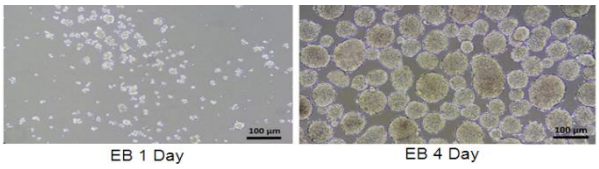
تجزیه و تحلیل آماری

تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون One Way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey[۳۹] انجام شد. تفاوت معنی‌داری در سطح P<0.05 در نظر گرفته شد.

نتایج

تشکیل اجسام امبریوئیدی و مورفولوژی آن‌ها

در روز چهارم کلونی‌های به هم چسبیده کامل مشخص شد که در داخل محیط شناور بودند (شکل ۴). در طی این تکنیک، کلونی‌ها اندازه هم نیستند اما در تکنیک قطره‌های آویزان[۴۰] تمامی این کلونی‌ها هم اندازه هستند.



شکل ۴. شکل گیری اجسام امبروئیدی (EBs) از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی موش (miPSCs) در شرایط آزمایشگاهی (*In Vitro*). همانطور که در شکل ملاحظه می‌شود مورفولوژی این اجسام از روز اول تا چهارم بعد از کشت با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ قابل مشاهده می‌باشد.

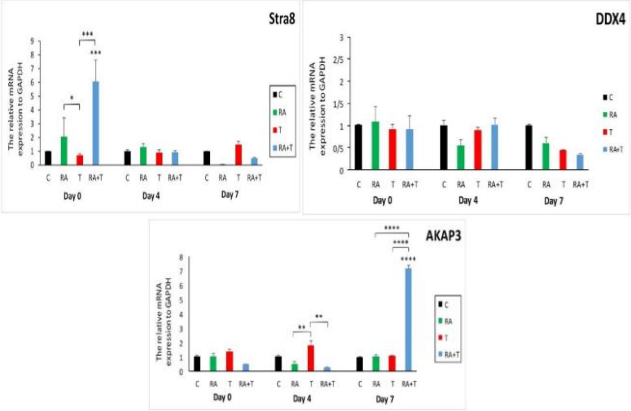
بررسی بیان ژن‌های خاص سلول‌های زایای نر در تمایز اجسام امبروئیدی

ژن *Stra8* نشان دهنده توانایی سلول‌ها برای پاسخ به رتینوئیک اسید در سلول‌های زایای قبل از میوزی است و ژن *Ddx4* به عنوان یک مارکر میوزی در نظر گرفته می‌شود. ژن *AKAP3*[۴۱] به عنوان یک سپر فیبروزی دم اسپرم می‌باشد که در طول اسپرماتوژنیس شکل می‌گیرد و به همراه *AKAP4* می‌تواند در فرآیند موروفولوژی اسپرماتید شرکت کند [۲۵و۲۶]. بیان ژن *Stra8* در روز صفر تغییرات معنی‌داری را از خود نشان داد. به این صورت که در گروه RA نسبت به گروه T افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$) و نسبت به گروه کنترل نیز افزایش داشت ولی معنی‌دار نبود. همچنین بین گروه RA+T و گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<0.001$) و نیز بین این گروه ترکیبی و گروه T افزایش معنی‌داری دیده شد ($P<0.001$). اما، در روزهای ۴ و ۷ و بین گروه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۵). همانطور که در شکل ۵ مشاهده شد، بیان ژن *Ddx4* در تمامی روزها و در تمامی گروه ها هیچ تفاوت معنی داری نداشتند (شکل ۵). بیان ژن *AKAP3* در روز صفر هیچ گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما در روز ۴، بین گروه T و RA افزایش معنی‌داری دیده شد ($P<0.01$)، اما بین گروه T و گروه RA+T کاهش معنی‌دار

[۳۹] Post HOC Test
[۴۰] Hanging Drop
[۴۱] A-Kinase Anchor Protein 3 (*AKAP3*)

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]
[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

مشاهده گردید (*P<0.01*). این ژن در روز ۷ بین گروه RA+T نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت (*P<0.001*). همچنین، بین این گروه و گروه‌های T و RA نیز تفاوت معنی‌داری دیده شد (*P<0.001*) (شکل ۵).



شکل ۵. الگوی بیان ژن‌های *Stra8*، *Ddx4* و *Akap3* در روزهای صفر، ۴ و ۷ تمایز در چهار گروه کنترل (C)، رتینوئیک اسید (RA)، تستوسترون (T) و رتینوئیک اسید به همراه تستوسترون (RA+T). نسبت بیان این ژن‌ها به ژن *GAPDH* در گروه‌های مختلف.

بحث

در چند دهه گذشته، مطالعات زیادی در زمینه تولید سلول‌های جنسی نر و ماده از iPSCs و ESCs انجام شده است. علیرغم خطر ایجاد تومور و ناهنجاری‌های ژنتیکی، iPSCs به سبب بحران‌های اخلاقی کمتر و فراوانی این سلول‌ها، برای ایجاد سلول‌های زایا بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این وجود، هنوز مکانیسم‌های مولکولی بیشتری جهت تمایز سلول‌های زایای نر و ماده از سلول‌های بنیادی پرتوان نیاز است [۲۷]. هورمون‌های استروئیدی، بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژی انسان و حیوان را کنترل می‌کنند و در طول عمر جاندار، پیوسته تغییراتی در غلظت این هورمون‌ها ایجاد می‌شود [۲۸]. هورمون‌ها توسط سلول‌های خاصی از بافت‌های غده‌ایی، ازجمله تیروئید و هیپوفیز تولید می‌شوند و برای ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی از قبیل تغییرات در متابولیسم لیپید و کربوهیدرات، رشد، بلوغ جنسی و استرس مسیر طولانی را طی می‌کنند. به علاوه هورمون‌های استروئیدی به عنوان واسطه‌گرهای حیاتی در بدن جاندار به حساب می‌آیند و نقش‌های بسیار مهمی در تنظیم عملکرد سلول‌های بنیادی دارند [۲۹]. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر هورمون استروئیدی تستوسترون به همراه رتینوئیک اسید بر تمایز miPSCs به سمت سلول‌های زایای نر بود. Li و همکاران (۲۰۱۳) که تمایز miPSCs به سمت سلول‌های زایای نر در شرایط آزمایشگاهی از طریق شکل‌گیری EBs و بررسی اثر رتینوئیک اسید به همراه تستوسترون را بررسی می‌کردند، دریافتند که بیان ژن *Stra8* با افزودن رتینوئیک اسید افزایش یافت. آن‌ها نشان دادند که بیان این ژن در غیاب رتینوئیک اسید، متوقف می‌شود. این محققان نشان دادند که رتینوئیک اسید با اثر بر این ژن، شکل گیری سلول زایای هاپلوئیدی را از طریق تشکیل EBs تقویت می‌کند [۲۳]. نتایج این محققان با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد. Dong و همکاران (۲۰۱۷) که اثر رتینوئیک اسید را همراه با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا و تسهیل تولید سلول‌های شبیه سلول‌های زایا در موش را بررسی کردند، نشان دادند که رتینوئیک اسید بیان ژن *Stra8* را در اسپرماتوگونیای نامتمایزیافته تحریک کرد، اما اثر کمتری بر اسپرماتوگونیای تمایزیافته داشت. نتایج این محققان بیان کرد که اثر تجمعی رتینوئیک اسید و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا، بیان ژن های *Stra8*، *Acrosin* و *Scp1* را برای آغاز تمایز تسهیل می‌کند [۳۰]. بیان ژن *Ddx4* در طی فرآیند ایجاد سلول‌های زایای بدوی از زمانی که مهاجرت سلول‌های زایای بدوی به پایان می‌رسد تا زمانی که تبدیل به گامت بالغ می‌شوند، ادامه دارد و در این مسیر سیری صعودی را طی می‌کند [۳۱]. Yang و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که بیان ژن *Vasa* (هومولوگ *Ddx4*) در گروه EBs که در معرض ۱۰۰ ng/ml از BMP4 قرار گرفته بودند، نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. این ژن خاص سلول‌های زایای نر محسوب می‌شود و افزایش بیان این ژن به همراه ژن های مربوطه نشان داد که BMP4 قادر است تا شکل گیری سلول زایای نر را از miPSCs تحریک کند [۲۷]. دانگ و همکاران (۲۰۱۷) که اثر رتینوئیک اسید بر اسپرماتوگونیا استم سل [۴۲] تولید سلول‌های شبیه سلول‌های زایای موش از mESCs [۴۳] را بررسی می کردند، نتیجه گرفتند که بیان ژن *Ddx4* در ۳ روز اول افزایش و سپس بیشترین پیک به روز ۶ در اسپرماتوگونیا استم سل های همراه با رتینوئیک اسید مشاهده شد. این محققان نتیجه گرفتند که اثرات رتینوئیک اسید به همراه SSCs، بیان ژن‌های مرتبط با سلول زایا را در آغاز تمایز تسهیل می‌کند [۳۰]. در کل نتایج این محققان نشان داد که رتینوئیک اسید به عنوان یک فاکتور تمایزی، اثر زیادی بر روند تولید سلول های زایا دارد که با نتایج تحقیقات ما همراستاست اما کار بر نوع سلول متفاوت می باشد.

یکی از ترکیبات اصلی اسپرم، *AKAP3* [۴۴] به عنوان یک سپر فیبروزی دم اسپرم است که در طول اسپرماتوژنیس تشکیل می‌شود. این ژن به همراه *AKAP4* می‌تواند در شرایط *In Vitro* در فرآیند مورفولوژی اسپرماتید ایفای نقش کند [۲۵و۲۶]. Li و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که بیان این ژن از روز ۴ تا روز ۷ شکل گیری EBs افزایش پیدا می‌کند. ژن *AKAP3* و *Msy2* دو ژنی هستند که Li و همکارانش بررسی کردند و این دو ژن فقط در سلول‌های هاپلوئیدی بیان می‌شوند [۲۳]. نتایج کار آن‌ها با نتایج Qin و همکاران مطابقت داشت که مارکرهای مرتبط با سلول زایا در EBs از روز ۳ شروع می شوند [۳۲] و همچنین با نتایج Toyooka و همکاران

[۴۲] Spermatogonia Stem Cells (SSC)
[۴۳] Mouse Embryonic Stem Cells (mESCs)
[۴۴] A-Kinase Anchor Protein 3 (AKAP3)

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]
[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

(۲۰۰۳) که گزارش کردند در حدود ۰,۲±۰,۴ درصد از EBs مثبت به *Mvh* از روز ۵ تا ۷ در طول دوره تمایز هستند [۳۳]. تمامی این داده ها مشخص کرد که miPSCs به سمت سلول‌های زایای نر از روز ۴ الی ۷ تمایز می‌یابند و این دوره بهترین دوره برای افزودن القا کننده‌ها می‌باشد [۲۳]. Silva و همکارانش در سال ۲۰۰۹، پروفایل بیانی ژن های مرتبط با سلول های زایای نر تیمار شده با رتینوئیک اسید به همراه تستوسترون را در mESCs مورد بررسی قرار دادند. تغییرات بیانی ژن *AKAP3* در طی بازه زمانی صفر تا ۱۴ روز تغییری نکرد ولی ژن *PRM1* [۴۵] هم که مخصوص اسپرم است با گذر زمان روند افزایشی خود را نشان داد. این داده‌ها مشخص کرد که EBs تمایز یافته، ژن‌های زیادی را بیان می‌کنند که مارکرهای تکثیر و تمایز سلول زایای نر هستند. در کل این محققان نشان دادند که رتینوئیک اسید و تستوسترون، فرآیند تمایز را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۳۴]. نتایج این محققان با نتایج مطالعه ما از لحاظ بررسی بیان این ژن متفاوت است زیرا کار بر روی سلول متفاوت می باشد.

نتیجه گیری

کنترل تمایز iPSCs بسیار سخت است و در شرایط آزمایشگاهی با دقت بررسی می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که PGCs می‌توانند از miPSCs در شرایط *In Vitro* تمایز یابند. البته شرایط کشت باید بسیار مناسب باشد. با وجود شرایط تمایز و بلوغ سلول‌های زایا در شرایط *In Vitro*، تولید گامت‌ها می‌تواند به عنوان یک فرضیه عملی در آینده نه چندان دور در نظر گرفته شود. در هر حال، هنوز دلایل نامشخصی از ژنتیک و یا اپی‌ژنتیک وجود دارند که باید مورد توجه قرار گیرد تا بتوان از این گامت‌های تولیدی در کلینیک‌ها استفاده کرد. برای گروه تیمار شده با تستوسترون نشان داده شد که اثر ترکیبی این هورمون با رتینوئیک اسید می‌تواند روند تمایزی را افزایش دهد.

پیشنهادات

در بررسی‌های آتی پیشنهاد می‌شود که از روش قطره های آویزان [۴۶] برای تشکیل اجسام امبریوئیدی استفاده شود و نیز بیان ژن‌های بیشتری در هر مرحله مورد بررسی قرار گیرد. همچنین، پیشنهاد می‌شود که بازه‌های زمانی بیشتر به همراه بیان پروتئین‌ها در هر مرحله بررسی گردد. در نهایت، می‌توان این موضوع را به عنوان پیشنهاد دیگری در نظر گرفت که سلول‌های تمایز یافته از بین سایر سلول‌ها با استفاده از FACS جدا شده و به صورت خالص کشت داده شده و روند تمایزی آن پیگیری گردند و پس از جداسازی سلول‌های تمایز یافته، این سلول‌ها به موش‌های آزواسپرمی تزریق شده و فرآیند *In Vivo* نیز ارزیابی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراجی از پایان نامه 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 می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی

این پژوهش به تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان رسیده است (IR.KAUMS.REC.1394.150).

تعارض منافع

در این مطالعه هیچ تعارض منافع وجود نداشت.

سهم نویسندگان در مقاله

تمامی نویسندگان در انجام این طرح و در نگارش مقاله نقش داشتند

منابع مالی/حمایت‌ها

توسط دانشگاه علوم پزشکی کاشان تامین شده است.

منابع

1. Hayashi Y, Saitou M, Yamanaka S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. Fertil Steril. 2012;97(6):1250–9.
2. Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Pera RAR. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. Nature. 2009;462(7270):222–5.
3. Hou J, Yang S, Yang H, Liu Y, Liu Y, Hai Y, et al. Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells. Reproduction. 2014;147(6):R179–88.
4. Matsumiya K, Namiki M, Takahara S, Kondoh N, Takada S, Kiyohara H, et al. Clinical study of azoospermia. Int J Androl. 1994;17(3):140–2.
5. Jung Y, Bauer G, Nolta JA. Concise review: induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. Stem Cells. 2012;30(1):42–7.
6. Kobayashi H, Nagao K, Nakajima K. Therapeutic advances in the field of male

[۴۵] Protamine 1

[۴۶] Hanging Drop

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

infertility: Stem cell research. Adv Stud Med Sci. 2013;1(1):39–54.
7. Mikkola M. Human pluripotent stem cells: glycomic approaches for culturing and characterization. 2013;
8. 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.
9. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. Nature. 2010;465(7299):704–12.
10. Sun N, Longaker MT, Wu JC. Human iPS cell-based therapy: considerations before clinical applications. Cell Cycle. 2010;9(5):880–5.
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. Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. Cell Stem Cell. 2009;4(1):73–9.
13. Mandai M, Ikeda H, Jin Z-B, Iseki K, Ishigami C, Takahashi M. Use of lectins to enrich mouse ES-derived retinal progenitor cells for the purpose of transplantation therapy. Cell Transplant. 2010;19(1):9–19.
14. Matsuda R, Yoshikawa M, Kimura H, Ouji Y, Nakase H, Nishimura F, et al. Cotransplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development. Cell Transplant. 2009;18(1):39–54.
15. Liu S-P, Fu R-H, Huang Y-C, Chen S-Y, Chien Y-J, Hsu CY, et al. Induced pluripotent stem (iPS) cell research overview. Cell Transplant. 2011;20(1):15–9.
16. 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.
17. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. Cell. 2008;134(6):921–31.
18. Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development. Development. 2012;139(5):843–58.
19. Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. Nat Rev Mol cell Biol. 2003;4(1):46–55.
20. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. Endocr Rev. 1987;8(1):1–28.
21. Hashimoto H, Yuasa S. Testosterone induces cardiomyocyte differentiation from embryonic stem cells. J Mol Cell Cardiol. 2013;62:69–71.
22. 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.
23. 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 retinoic acid or testosterone induction. Biomed Res Int. 2013;2013.
24. 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.
25. Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. Biol Reprod. 2003;68(6):2241–8.
26. Xu K, Yang L, Zhao D, Wu Y, Qi H. AKAP3 synthesis is mediated by RNA binding proteins and PKA signaling during mouse spermiogenesis. Biol Reprod. 2014;90(6):111–9.
27. 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.
28. Ables ET, Drummond-Barbosa D. Steroid hormones and the physiological regulation of Tissue-Resident stem cells: lessons from the Drosophila Ovary. Curr stem cell reports. 2017;3(1):9–18.
29. Ables ET, Laws KM, Drummond-Barbosa D. Control of adult stem cells in vivo by a dynamic physiological environment: diet-

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]

dependent systemic factors in Drosophila and beyond. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2012;1(5):657–74.
30. 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).
31. Saiti D, Lacham-Kaplan O. Mouse Germ Cell Development in-vivo and in-vitro. Biomark Insights. 2007;2:117727190700200030.
32. Qin J, Guo X, Cui GH, Zhou YC, Zhou DR, Tang AF, et al. Cluster characterization of mouse embryonic stem cell-derived pluripotent embryoid bodies in four distinct developmental stages. Biologicals. 2009;37(4):235–44.
33. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(20):11457–62.
34. 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.

[Downloaded from saremjrm.com on 2025-08-20]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.61]