

Successful Transplantation of Spermatogenic Stem Cells into the Seminiferous Tubules of Busulfan-treated Rats

S. Daniyal Hashemi Karoii*, **Hossein Azizi****

Abstract

Spermatogonia (SSCs) in the testis transmit genetic information to the next generation. Successful transplantation of SSCs into infertile men is an advanced therapeutic application in reproductive biology research. In this experimental research, undifferentiated and differentiated SSCs were analyzed both in vitro and in vivo by morphology-immunocytochemistry (ICC), immunohistochemistry (IMH), real-time Polymer Chain Reaction (RT-PCR) and flow cytometry analysis. The isolated SSCs were finally injected into the rete testis of mice treated with busulfan. ICC analysis revealed high and low expression levels of Zbtb16 in undifferentiated and differentiated germ cells. IMH analysis revealed different levels of Zbtb16 expression in both populations. Fluidigm RT-PCR analysis showed overexpression of TAF4B germ cell gene and reduced expression of DAZL, VASA, and Zbtb16 during SSCs differentiation ($P < 0.05$). Flow cytometric analysis confirmed a significant downregulation of Itgb1 and Itga4 during differentiation. By transplanting SSCs into busulfan-treated NOD/SCID mice, GFP-labeled sperm cells were developed. We performed a transplantation technique that could be useful for microinjection of SSCs during infertility treatment and for studying the differentiation of SSCs into spermatozoa in vivo. Data analysis confirmed that zbtb16 is expressed in undifferentiated germ cells located in the basement membrane of seminiferous tubules and SSCs in vitro. Also, spermatogenesis was resumed and fertility was improved after transplantation of undifferentiated cells into busulfan-treated mice. Therefore, improving the transplantation, isolation, and culture of SSCs in vitro will be useful in future clinical treatments to solve the fertility problems of families affected by infertility.

Keywords: spermatogenic stem cell, spermatogenesis, flow cytometry, transplantation, spermatogenic tubes.

* MSc student, Department of Cellular and Molecular Biology, Tehran University, Tehran, Iran, (corresponding Author). d.hashemi.karoii@ut.ac.ir

** Ph.D. in cellular and molecular biology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran. h.azizi@ausmt.ac.ir

پیوند موفقیت‌آمیز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز به لوله‌های اسپرم‌ساز موش‌های تحت درمان با بوسولفان

سید دانیال هاشمی کروئی*، حسین عزیزی**

چکیده

اسپرماتوگونی (SSCs) در بیضه اطلاعات ژنتیکی را به نسل بعدی منتقل می‌کند. پیوند موفقیت‌آمیز SSC به مردان نابارور یک کاربرد درمانی پیشرفته در تحقیقات زیست‌شناسی تولیدمثل است. در این تحقیق تجربی، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط درون‌تنی SSC‌های تمایزنیافته و تمایزیافته توسط مورفولوژی — ایمونوسیتوشیمی (ICC)، ایمونوهیستوشیمی (IMH)، واکنش زنجیره‌ای پلیمر از بلادرنگ (Fluidigm RT-PCR) و آنالیز فلوسیتومتری انجام شد. SSC‌های جدا شده در نهایت به بیضه rete موش‌های تحت درمان با بوسولفان تزریق شدند. تجزیه و تحلیل ICC سطوح بیان بالا و پایین Zbtb16 را در سلول‌های زایای تمایزنیافته و تمایزیافته نشان داد. تجزیه و تحلیل IMH سطوح مختلف بیان Zbtb16 را در هر دو جمعیت نشان داد. تجزیه و تحلیل Fluidigm RT-PCR بیانگر بیش از حد ژن سلول زایا TAF4B و بیان کاهش‌یافته VASA، DAZL، و Zbtb16 در طول تمایز SSC‌ها بود ($P < 0.05$). تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری کاهش قابل توجهی از Itga4 و Itgb1 در طول تمایز را تأیید کرد. با پیوند SSC‌ها به موش‌های NOD/SCID تحت درمان با بوسولفان،

* دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

(نویسنده مسئول). d.hashemi.karoui@ut.ac.ir

** دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل.

h.azizi@ausmt.ac.ir

سلول‌های اسپرم نشان‌دار شده با GFP توسعه یافتند. ما یک تکنیک پیوند را انجام دادیم که می‌تواند برای تزریق ریز SSCها در طول درمان ناباروری و برای مطالعه تمایز SSCها در داخل بدن به اسپرم مفید باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها تأیید کرد که zbtb16 در سلول‌های زایای تمایزنیافته واقع در غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز و SSCها در شرایط آزمایشگاهی بیان می‌شود. همچنین، اسپرم‌زایی از سر گرفته شد و باروری پس از پیوند سلول‌های تمایزنیافته به موش‌های تحت درمان با بوسولفان بهبود یافت. بنابراین، بهبود پیوند، جداسازی و کشت SSCs در شرایط آزمایشگاهی در درمان‌های بالینی آینده برای حل مشکلات باروری خانواده‌های تحت تأثیر ناباروری مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادین اسپرم‌ساز، اسپرم‌ساز، فلوسایتومتری، پیوند، لوله‌های اسپرم‌ساز.

مقدمه

پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اولین بار توسط برینستر و همکارانش برای تأیید وجود و عملکرد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انجام شد [1]. تزریق این سلول‌ها به ابتدای بیضه موش‌های تیمار شده با بوسولفان، نشان داد که سلول‌ها به لوله‌های سمی نفروزیس مهاجرت کرده و در اسپرماتوژنز کامل شرکت کرده و اسپرم بارور تولید کردند. تولید اسپرم بالغ به وسیله سلول‌های بنیادی پیوندی حاکی از اهمیت ریز محیط اختصاصی بیضه در فرایند اسپرماتوژنز دارد [2]. آبسالان و همکاران سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را به بیضه موش مدل کریپتورکیدیسم پیوند زدند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که در گروه‌های پیوندی، تولید اسپرم به میزان معنی‌داری نسبت به گروه غیر پیوندی افزایش یافت. کروجی و همکاران سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موشی تازه و منجمد ذوب شده را به صورت اتوگرافت به بیضه گاما دیده پیوند زدند [3]. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که میانگین درصد پرشدن لوله‌های سمی نفروس در گروه‌های پیوندی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های بدون پیوند دارد. همچنین سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از پیوند منجر به تولید اسپرم شدند. گروه دیگری از محققین، تکنیک پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی را در گونه میمون رزوس انجام دادند. آن‌ها گزارش کردند

که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تزریق شده به لوله‌های سمی نفروزیسیس تا رده اسپرم تمایز یافتند. بروک و همکارانش در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که سلول‌های زایا از افراد جداسازی شده و به مدت کوتاهی در دماهای پایین حفظ و دوباره به همراه رنگ حیاتی تریپان بلو به صورت اتوگرافت به خودشان پیوند زده شد [۴-۶]. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که ۵۵٪ لوله‌های سمی نفروس بیضه گیرنده، رنگ گرفته و سلول‌ها روی غشای پایه نشست کرده‌اند. محقق و همکاران در سال ۲۰۱۷ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را از بافت‌های بیضه‌ای جدا کرده و از طریق افرنت داکتیولی به درون لوله‌های سمی نفروزیسیس بیضه آواسپرمی تزریق کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که پس از دو هفته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی غشای پایه لوله‌های سمی نفروزیسیس نشست کرده‌اند [۵، ۷، ۸]. همچنین این گروه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده از بافت بیضه منجمد-ذوب شده را به بیضه‌های آواسپرمی تزریق کرده و به مدت هشت هفته در محیط آزمایشگاهی بر روی ژل آگارز کشت دادند و تولید سلول‌های هاپلوئید را گزارش کردند [۹، ۱۰].

مواد و روش‌ها:

جداسازی و کشت سلول‌های بافت بیضه:

روش جداسازی سلول‌های بیضه از بافت بیضه به روش عزیزی و همکاران انجام شد (۳). در این روش بیضه موش نر (نژاد 5-7 NMRI) روزه بعد از جداسازی از حیوان، در محلول نمکی بافر فسفات قرار داده شد. سپس لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه از کپسول بیضه جدا شده و به قطعات کوچک‌تر - 1/0 5 تقسیم شدند. بافت خرد شده در معرض 1 mg ml شد. سوسپانسیون تک‌سلولی 1 ml - به دست آمده حاصل از هضم آنزیمی بافت بیضه، پس از عبور از فیلتر نایلونی 70 μm به مدت ۱۰ دقیقه در 1500 rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف شد و در سلول بیضه در ۶ شرایط کشت غیرچسبنده حدود ۱۰ پلیت‌های کشت پوشیده با آگارز ۱ درصد حاوی [۲٪ FBS؛ ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از

۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از نانوگرم ۲۰ (GDNF) derived Glial factor neurotrophic factors growth و EGF) Epidermal growth factor (EGF) فاکتور بر میلی‌لیتر از فاکتور Fibroblast (FGF) قرار گرفت. سلول‌های زنده با استفاده از روش رنگ‌سنجی عمومی blue Trypan شناسایی شد.

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی: همانند پروتکل اشاره شده در رفرنس (۴)، سلول‌های کشت داده شده با پارافورمالدئید ۴ درصد فیکس شده و بعد از نفوذپذیری permeabilized با Triton%2، به مدت یک شبانه‌روز با آنتی‌بادی‌های اولیه انکوبه شد. پس از شست‌وشو این روند با انکوبه کردن سلول‌ها با گونه‌های خاص آنتی‌بادی‌های ثانویه نشان‌دار ادامه یافت. در نهایت از (BX51, Olympus Co. Japan) فلورسنس میکروسکوپ بررسی برای (LSM 700, Zeiss Co. Germany) کونفوکال سلول‌های نشان‌دار شده استفاده شد.

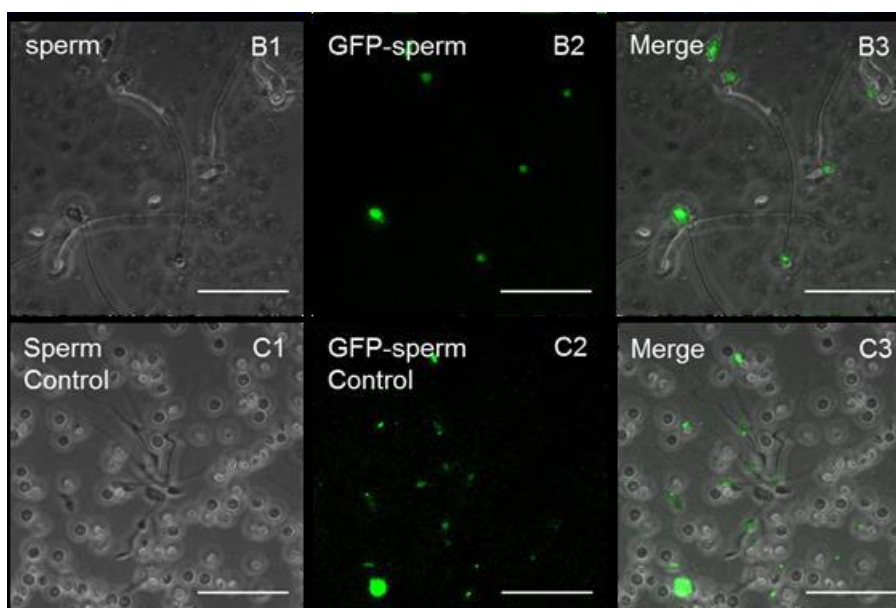
آنالیزهای بیان کمی ژن با روش Fluidigm Biomark:

از این روش برای اندازه‌گیری بیان چندین ژن مخصوص مانند Sox-2، CD9، EPCAM، Oct4، و همچنین ژن خانه‌دار GAPDH برای سلول‌های جنسی کشت داده شده، استفاده شد. در این آزمایش سلول‌ها به صورت مکانیکی و با استفاده از میکروپیپت‌های مخصوص یا میکرومنیپولاتور جداسازی و بلافاصله منجمد شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها با استفاده از بافر لیزکننده خاص لیز شده و در ادامه با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس mRNA به cDNA تبدیل شده و مقدار ترانس کریپت‌های با استفاده از پرایمرهای مخصوص و با دستگاه Fluidigm تعیین کمیّت شد. به منظور تحلیل داده‌ها، Ct به‌دست آمده با بیان ژن GAPDH و همچنین بیان mRNA ژن‌ها در سلول‌های تغذیه‌کننده MEF نرمال‌سازی شده و آنالیز داده‌ها هم توسط نرم‌افزارهای GenEx، Exel، و SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

قطعات بیضه زیر پوست موش بالغ با نقص ایمنی پیوند زده می‌شود. تولید اسپرم بارور از

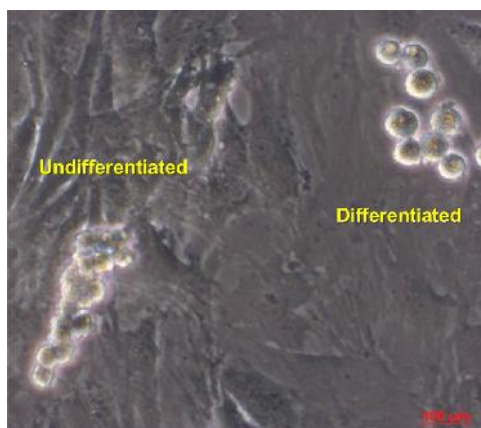
آلوگرافت و زنوگرافت‌های بیضه نشان داده شده است و وابسته به سن و گونه می‌باشد. هر سه تکنیک فوق از این استدلال از این پشتیبانی می‌کنند که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نیاز به سلول‌های پشتیبان و قرار گرفتن در معرض ریز محیط لوله سمی نفروزیس، از جمله هورمون‌های اختصاصی و عوامل پاراکرین برای پیش بردن کامل اسپرماتوژنز نیازمند هستند. همانطور که قبلاً گفته شد، این عناصر به‌طور معمول در سیستم‌های کشت دو بعدی وجود ندارد. بنابراین با بهبود شرایط کشت که بتواند ریز محیط مشابه با لوله سمی نفروزیس را تقلید کند می‌توان به تولید اسپرم بارور از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دست یافت.



شکل ۱. پیوند سلول‌های نوع II در بیضه حدود ۱ ماه پس از پیوند سلول‌های نوع II نشان‌دار شده با GFP، محلی‌سازی سلول‌های نوع II در محفظه پایه بیضه نابارور قابل مشاهده بود (A1-A3). حدود ۳ ماه پس از پیوند سلول‌های نوع II، اسپرم GFP در اپیدیدیم بیضه (-B1) قابل مشاهده بود. اسپرم GFP مثبت در اپیدیدیم بیضه شاهد (C1-C3) مشاهده شد.

در این مطالعه تجربی، دو نوع سلول قابل تشخیص مورفولوژیکی، یعنی SSC

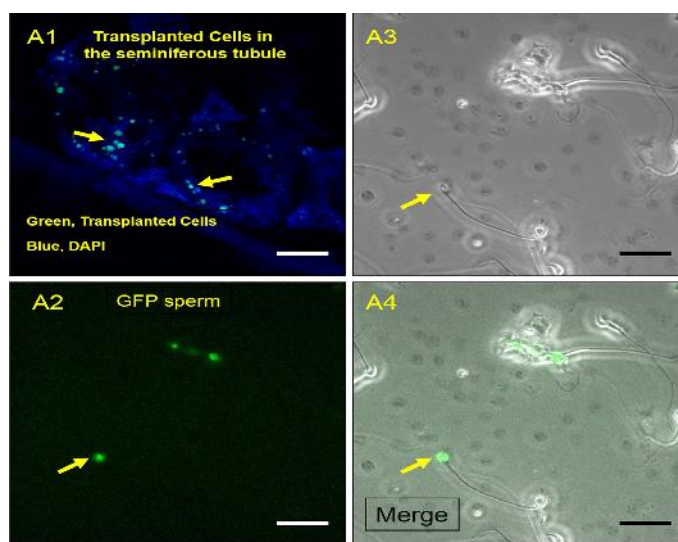
تمایز یافته و تمایز نیافته، آشکارا پس از هضم آنزیمی بر روی لایه تغذیه‌کننده چاهک‌های کشت سلولی گسترش یافتند (شکل ۲).



شکل ۲. گسترش انواع مختلف سلول‌های بیضه بر روی لایه تغذیه‌کننده. عکس میدان روشن از دو مستعمره نوع سلولی. دو نوع متمایز از سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته به وضوح نشان داده شده است. SSCهای تمایز نیافته در مجموعه‌های فشرده‌تر در مقایسه با SSCهای متمایز با اتصال ضعیف‌تر رشد می‌کنند.

نشانگر *zbtb16* نشانگر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در سلول‌های محفظه پایه لوله‌های اسپرم‌ساز موش توسط ایمونوهیستوشیمی (IMH) و در کشت سلولی با تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی (ICC) محلی‌سازی شد. تجزیه و تحلیل ICC نشان داد که بیان *Zbtb16* در سلول‌های کشت داده شده در سلول‌های تمایز نیافته بیشتر از سلول‌های تمایز یافته بود. همچنین، تجزیه و تحلیل IMH بیان بالایی از *Zbtb16* را در سلول‌هایی که مستقیماً روی غشای پایه قرار دارند نشان داد در حالی که بیان کم در محفظه تمایز یافته مشاهده شد (شکل ۳). نتایج تجزیه و تحلیل Fluidigm RT-PCR تنظیم افزایشی *Zbtb16* و دو نشانگر SSC دیگر *DAZL* و *VASA* را در SSCهای تمایز نیافته نشان داد، در حالی که بیان بالاتر *TAF4B* در SSCهای متمایز تر نشان داده شده است ($P < 0.05$). *KLF4* هیچ تفاوتی بین دو نوع سلول نشان نداد. تنظیم بالای قابل توجه *Itga4* و *Itgb1* در سلول‌های تمایز نیافته که با تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری

نشان داده شده است، شناسایی شد (شکل ۳).



شکل ۳. پیوند SSCs در داخل بدن برچسب GFP (پروتئین فلورسنت سبز) ثابت کرد که سلول‌های تزریق شده به اسپرم تمایز می‌یابند. محلی‌سازی SSCهای تزریق شده نشان‌دار شده در محفظه پایه لوله‌های اسپرم‌ساز (A1). تجزیه و تحلیل میدان روشن (A3، A4) و ادغام با GFP (A2) نشان داد که سلول‌های تزریق شده به اسپرم توسعه یافته‌اند.

نتیجه‌گیری

سلول‌های بیضه موش‌های نر در محیط‌های حاوی فاکتورهای رشد در شرایط غیرچسبنده قادر به تشکیل کلنی‌هایی بوده که همانند کلنی‌های سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز تشکیل شده در شرایط کشت چسبنده، مارکرهای سلول‌های جنسی را بیان می‌کنند. مورفولوژی کلنی‌های به دست آمده در شرایط غیرچسبنده با بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت. علاوه بر این، مطالعات ایمونوسیتوشیمی و PCR time-Real نیز بیان مارکرها و همچنین تکثیرپذیری سلول‌های جنسی این کلنی‌ها را همانند کلنی‌های چسبنده این آزمایش تأیید کرد. این نتایج می‌تواند تأییدکننده این باشد که کلنی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی علاوه بر کشت چسبنده، در سیستم‌های غیرچسبنده هم شکل گرفته که می‌تواند منجر به حفظ و بقای سلول‌ها از

طریق بیان ژن‌های مرتبط شود.

منابع

1. Park, M.H., et al., *Integrin heterodimer 9 1 is localized on the surface of porcine spermatogonial stem cells in the undifferentiated state*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2019. 54(11): p. 1497-1500.
2. Yang, Y., et al., *A testis-derived hydrogel as an efficient feeder-free culture platform to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation and differentiation*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020. 8: p. 250.
3. Azizi, H., B. Asgari, and T. Skutella, *Pluripotency potential of embryonic stem cell-like cells derived from mouse testis*. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2019. 21(3): p. 281.
4. Azizi, H., M. Koruji, and T. Skutella, *Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells*. *Cell Journal Yakhteh*, 2020. 22 (1): p. 60.
5. Conrad, S., et al., *Expression of genes related to germ cell lineage and pluripotency in single cells and colonies of human adult germ stem cells*. *Stem cells international*, 2016. 2016.
6. Hashemi Karoii, D. and H. Azizi, *A review of protein-protein interaction and signaling pathway of Vimentin in cell regulation, morphology and cell differentiation in normal cells*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2022: p. 1-9.
7. Azizi, H., et al., *Characterization of DDX4 gene expression in human cases with non-obstructive azoospermia and in sterile and fertile mice*. *Journal of Reproduction & Infertility*, 2021. 22(2): p. 85.
8. Azizi, H., A. Niazi Tabar, and A. Mohammadi, *Experimental investigation of Ki67, POU5F1, and ZBTB16 expression in the pig and mouse testicular cells using immunocytochemistry and RT-PCR*. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 2020. 28(5): p. 1-10.
9. Liu, R., et al., *SETDB1 Regulates Porcine Spermatogonial Adhesion and Proliferation through Modulating MMP3/10 Transcription*. *Cells*, 2022. 11(3): p. 370.
10. Singh, S.P., et al., *Reproductive stage-and season-dependent culture characteristics of enriched caprine male germline stem cells*. *Cyrotechnology*, 2022: p. 1-18.