

Paper Type: Original Article



Evaluation of the Effect of Growth Factor Activin A and Small Molecule IDE1 on Proliferation and Self-Renewal of Chicken Primordial Germ Cells in Vitro Culture

Masumeh Zare¹, Seyed Ziaedin Mirhoseini^{1*}, Seyedeh-Nafiseh Hassani², Shahrokh Ghovvati¹

¹PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; Zare.masum@gmail.com; szmirhoseini@gmail.com.

¹Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; (Corresponding author: szmirhoseini@gmail.com).

²Associate Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran; nafiseh.hassani@gmail.com.

¹Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; ghovvati@guilan.ac.ir.

Citation:

Zare, M., Mirhoseini, S. Z., Hassani, S. N., & Ghovvati, Sh. (2023). Evaluation of the effect of growth factor Activin A and small molecule IDE1 on proliferation and self-renewal of chicken primordial germ cells in vitro culture. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(3), 69-85.

Received: 18/06/2023

Accepted: 12/11/2023

Abstract

Introduction: The main challenge of Primordial Germ Cells (PGC) is their lack of proliferation and self-renewal in the culture medium. One approach to induce proliferation in PGC cells is manipulating intracellular signaling pathways such as TGF- β . The use of growth factors and small molecules is one of the ways to achieve this goal.

Methods: Chicken gonadal PGC cells were cultured and incubated at 50,000 cells per well in a 24-well plate coated with Matrigel. The experimental groups included four groups: control (basic medium for PGCs culture), treatment with small molecule IDE1 (100 nM; Stemgent, USA, 04-0026), treatment with growth factor A Activin (25 ng/ml; R&D Systems, 338-AC), and treatment with SB431542 (10 μ M; Cayman Chemical, 13031) with three replicates from each group. To check the amount of cell proliferation, PGC cells were counted with a hemocytometer at intervals of 7, 14, and 21 days after treatment. The activity of the TGF/ β signaling pathway was evaluated by examining the expression of SMAD2, SMAD3, and LFTTY1 genes by qRT-PCR method.

Results: The effect of Activin A and IDE1 increased the proliferation of PGC cells to more than 4 times compared to the control group, while the SB431542 group decreased cell proliferation. Activin A and IDE1 experimental groups maintained cell viability and culture for 25 days but did not lead to long-term culture. Also, the results of investigating the activity of the TGF/ β signaling pathway showed that Activin A and IDE1 led to increased expression of Smad2, Smad3, and LFTTY1 genes compared to the control and SB431542 groups.

Conclusion: The results of this research represented that improving the culture conditions and activating the effective signaling pathways in pluripotency can induce pluripotency and long-term culture of chicken PGC cells.

Keywords: Pluripotency, Self-renewal, Primordial germ cells, Activin A, IDE1.



Corresponding Author: szmirhoseini@gmail.com



<https://doi.org/10.22051/jab.2023.42190.1523>



ارزیابی تاثیر فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول IDE1 در تکثیر و خودنوزائی سلول‌های زایای بدوی جوجه در شرایط کشت آزمایشگاهی

معصومه زارع^۱، سیدضیال‌الدین میرحسینی^{۱*}، سیده نفیسه حسنی^۲، شاهرخ قوتی^۱

^۱دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۱استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۲دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم

سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران.

^۱استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

نویسنده مسئول: szmirhoseini@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۷

چکیده

مقدمه: چالش اصلی سلول‌های زایای بدوی، عدم تکثیر و خودنوزائی آن‌ها در محیط کشت است. یک روش برای القای پرتوانی سلول‌های PGC، دست‌کاری مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی از جمله $TGF-\beta$ است که استفاده از فاکتورهای رشد و کوچک مولکول‌ها یکی از روش‌های رسیدن به این هدف است.

روش‌ها: سلول‌های PGC غدد جنسی جوجه با غلظت ۵۰۰۰۰ سلول به ازای هر خانه در پلیت ۲۴ خانه پوشش داده شده با ماتریزل و یا ژلاتین کشت و گرماگذاری شدند. گروه‌های آزمایشی شامل چهار گروه کنترل (محیط پایه برای کشت PGCs)، تیمار با کوچک مولکول IDE1 (100 nM; Stemgent, USA, 04-0026)، تیمار با فاکتور رشد Activin A (25 ng/ml; R&D Systems, 338-AC) و تیمار با SB431542 (10 μ M; Cayman Chemical, 13031) با سه تکرار از هر گروه بودند. به منظور بررسی میزان تکثیر سلولی، شمارش سلول‌های PGC در بازه‌های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از تیمار با هموسایتومتر انجام شد. فعالیت مسیر سیگنالینگ TGF/β با بررسی بیان ژن‌های SMAD3، SMAD2 و LFTTY1 با روش qRT-PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: تاثیر Activin A و IDE1 منجر به افزایش تکثیر سلول‌های PGCs به بیش از ۴ برابر در مقایسه با گروه کنترل گردید و در مقابل گروه SB431542 منجر به کاهش تکثیر سلولی شد. گروه‌های آزمایشی Activin A و IDE1 قادر به حفظ زنده‌مانی و کشت سلول‌ها به مدت زمان ۲۵ روز شدند، اما منجر به کشت طولانی مدت نگردید. هم‌چنین نتایج بررسی فعالیت مسیر سیگنالینگ TGF/β نشان داد که Activin A و IDE1 منجر به افزایش بیان ژن‌های Smad3، Smad2 و LFTTY1 در مقایسه با گروه‌های کنترل و SB431542 شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق بیان می‌دارد که بهبود شرایط کشت و فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی موثر در پرتوانی می‌تواند سبب القای پرتوانی و کشت طولانی مدت سلول‌های PGC جوجه شود.

کلیدواژه‌ها: پرتوانی، خودنوزائی، سلول‌های زایای بدوی، Activin A، کوچک مولکول IDE1.

¹ Inducer Of Definitive Endoderm 1 (IDE1)

² quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

۱- مقدمه

گونه‌های پرندگان به‌ویژه جوجه، نه تنها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حیوانات مزرعه منجر به تولید سالانه ۵۹ میلیارد عدد نتایج برای تامین پروتئین حیوانی می‌شود [1]، بلکه به‌عنوان مهم‌ترین مدل برای مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، ایمونولوژی و علم فیزیولوژیکی نیز مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. بدین منظور در دهه اخیر، انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی جنینی^۱، سلول‌های زایای بدوی^۲ و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی^۳ از مراحل مختلف تکوینی جوجه تولید شده است. در میان سلول‌های بنیادی جوجه، سلول‌های PGC خصوصیات منحصر به فردی از جمله انتقال اطلاعات ژنتیکی به نسل بعد، قابلیت دست‌کاری ژنتیکی و تولید پرندگان تراریخته دارد که آن‌ها را از بقیه سلول‌های بنیادی جوجه متمایز کرده است [2]. با این حال، تعداد سلول‌های PGCs که از یک جنین در مرحله گردش خون (مرحله HH 14-15 معادل ۲/۵ روز بعد از انکوباسیون) و غدد جنسی در مرحله HH 28-30 (معادل ۵ روز تا ۶ روز بعد از انکوباسیون) به دست می‌آیند، محدود هستند [3]-[5]؛ بنابراین، برای استفاده موثر از تعداد کم PGCs، باید تعداد آن‌ها را با کشت در شرایط آزمایشگاهی افزایش داد. از ابتدا تاکنون، تلاش‌هایی برای توسعه سیستم‌های کشت PGCs با استفاده از محیط‌های کشت مختلف و وابسته یا مستقل به سلول‌های تغذیه‌کننده (Feeder cell) انجام شده است. اگرچه کشت آزمایشگاهی PGCs منجر به تکثیر موفقیت‌آمیز در کوتاه‌مدت شده است، اما عدم تکثیر طولانی‌مدت و حفظ خود نوزایی در سیستم‌های کشت آزمایشگاهی یکی از چالش‌های اصلی این سلول‌ها است [6]. به‌گونه‌ای که حفظ خود نوزایی PGCs حتی در محیط کشت غنی شده حاوی فاکتورهای رشد مختلف، مانند فاکتور مهارکننده لوسمی^۴ [7]، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه^۵، فاکتور سلول‌های بنیادی^۶ یا فاکتور رشد مشابه انسولین^۷ و پروتئین مورفوزنیک استخوان نوع ۴^۸ دشوار است [8]-[10]. مطالعات اخیر نشان داده است که مسیرهای سیگنالینگ شامل Wnt/Gsk3/β-catenin، BMP4/Smad1/5/8 و TGF-β/Activin/Smad2/3 نقش مهمی در خود نوزایی و کشت طولانی‌مدت PGCs جوجه دارند [1]، [11]-[13]. به‌گونه‌ای که وایت و همکاران [1] نشان دادند که فاکتورهای رشد BMP4 و Activin A منجر به فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی BMP/Smad1/5/8 و TGF-β/Smad2/3 و به‌نوبه خود فسفریلاسیون Smad2/3 و Smad1/5/8 می‌شوند که در نهایت با انتقال به هسته منجر به بیان ژن‌های موثر در خود نوزایی این سلول‌ها می‌شوند؛ بنابراین، این مطالعات نشان می‌دهند که انتقال سیگنال از طریق TGF-β/Activin/SMAD2/3 برای تکثیر و خود نوزایی PGCs جوجه ضروری است [1]، [13].

علاوه بر این، اخیراً محیط‌های کشت برای سلول‌های PGC با استفاده از کوچک مولکول‌های مهارکننده مسیرهای تمایزی، مانند IDE1 و SB43 معرفی شده‌اند که می‌توانند جایگزین مناسبی برای فاکتورهای رشد لازم در کشت و تکثیر سلول‌های PGC باشند [13]. کوچک مولکول‌ها به مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم گفته می‌شود که قادر به ایجاد اثرات مختلف زیستی روی سلول باشند. هم‌چنین از این مولکول‌ها در کشت سلول‌های بنیادی پرتوان پستانداران بدون نیاز به فاکتورهای رشد، به‌منظور حفظ و تقویت پرتوانی و تمایزهای خاص دودمانی استفاده شده است [14]، [15]. علاوه بر این، کوچک مولکول IDE1 نقش مهمی در خود نوزایی و کشت طولانی‌مدت PGCs جوجه از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF-β دارد [13].

تأثیر انواع کوچک مولکول‌ها و فاکتورهای رشد با خواص خود نوزایی و یا تمایز می‌تواند در شرایط مختلف فیزیولوژیکی و یا بسته به نوع گونه (موشی، جوجه و انسانی) متفاوت باشد. نظر به وجود گزارش‌های محدود در مورد نقش کوچک مولکول‌ها و فاکتورهای رشد و استفاده از آن‌ها در فرایند خود نوزایی و تولید رده سلولی تکثیر پذیر PGC جوجه و عطف به تناقض گزارشات موجود، در تحقیق حاضر تلاش نموده‌ایم تا تأثیر فاکتور رشد و کوچک مولکول‌ها در تکثیر و خود نوزایی PGCs جوجه در شرایط کشت آزمایشگاهی را بررسی و راندمان آن‌ها را ارزیابی نماییم تا روشی موثر برای افزایش تکثیر PGCs جوجه مشتق شده از غدد جنسی معرفی کنیم.

¹ Embryonic stem cells (ESCs)² Primordial Germ Cells (PGCs)³ Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)⁴ Leukemia Inhibitory Factor (LIF)⁵ Fibroblast Growth Factor (bFGF)⁶ Stem Cell Factor (SCF)⁷ Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)⁸ Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تخم نطفه‌دار جوجه و مراقبت‌های حیوانی

از مرغ مادر تخم‌گذار سویه لگهورن به تعداد ۳۲۰۰ عدد تخم نطفه‌دار از مزرعه مرغ مادر شرکت طیور برکت در استان قزوین تهیه گردید. در کل مراحل آزمایش، شرایط و امکانات برای نگهداری پرندها، مطابق با کمیته مراقبت از حیوانات بخش سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان^۱ فراهم گردید و دارای کد اخلاق IR.ACECR.ROYAN.REC.1397.283 می‌باشد.

۲-۲- آماده‌سازی سلول‌های تغذیه‌کننده

در مطالعه حاضر از چهار لایه تغذیه‌کننده سلولی از بانک سلول پژوهشگاه رویان برای کشت PGCs جوجه استفاده شد: ۱- فیبروبلاست جنینی جوجه^۲، ۲- فیبروبلاست جنینی موش^۳، ۳- سلول‌های STO^۴ و ۴- BRL^۵. برای تهیه لایه تغذیه‌کننده MEF، اجسام جنینی جنین‌های موش در مرحله تکوینی dpc 12.5 جدا شده و با نمک بافر فسفات Dulbecco بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} (DPBS⁻ Gibco™, 14190144) شستشو داده شد و با استفاده از روش آنزیمی، سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. بدین صورت که اجسام جنینی جنین‌های موش در Trep/ EDTA (۵۳٪/۰/۰/۰/۰ میلی مولار، Invitrogen, 25300-054) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرماگذاری شدند. سپس به منظور غیرفعال‌سازی تریپسین، DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به نمونه‌ها اضافه گردید و به آرامی پیتاز شدند و در نهایت نمونه‌ها با سرعت $400 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سلول‌های سوسپانسیون در فلاسک‌های کشت سلولی حاوی DMEM (Gibco™, 11960044) که با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ (SH30071, Hyclone) غنی شده بودند، کشت داده شدند.

برای تهیه لایه تغذیه‌کننده CEF^۶، تخم نطفه‌دار مرغ در دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز تا ۶ روز انکوباسیون شدند. جنین‌ها پس از رسیدن به مراحل ۳۰-۲۸ HH از زرده جدا شدند و با DPBS⁻ شستشو داده شدند و پس از حذف سر و قلب، از دیگر بافت‌های جنینی باقی‌مانده با استفاده از روش آنزیمی، سوسپانسیون سلولی تهیه گردید و در نهایت در فلاسک‌های T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. در مرحله‌ای که تعداد سلول‌ها به راندمان ۱۰۰٪ در سطح فلاسک رسیدند، نصف محیط رویی دور ریخته شد و به ازای هر ۲/۵ ml محیط، ۲۵ میکرولیتر میتوماکسین C (Sigma-Aldrich, 50077)، به آن افزوده و به مدت سه ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷C قرار داده شدند. سپس سلول‌ها پاساژ داده شدند و با استفاده از لام هموسایتومتر، سلول‌ها شمارش شدند. در نهایت سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش و جوجه به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده روی یک پلیت ۴۸ چاهک پوشش داده شده با ژلاتین ۰/۱٪ با تراکم ۳۰۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک کشت و آماده شدند.

سلول‌های تغذیه‌کننده STO و BRL از بانک سلول پژوهشگاه رویان ثبتی با شماره سریال STO RSCB0009 و BRL 3a RSCB0572 تهیه شدند و به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده سلول‌های PGC جوجه مشابه با سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش و جوجه مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- جداسازی و کشت PGCs

جداسازی سلول‌های PGC جوجه مطابق با روش‌های قبلی منتشر شده انجام گردید [16]. برای جداسازی PGCs از غدد جنسی در مرحله HH28-30 تخم نطفه‌دار جوجه به مدت ۵-۶ روز انکوباسیون شدند. از هر جنین یک جفت غدد جنسی جدا شد و در Trep/ EDTA (۵۳٪/۰/۰/۰/۰ میلی مولار، Invitrogen, 25300-054) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرماگذاری شدند. برای غیرفعال‌سازی تریپسین، DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به نمونه‌ها اضافه گردید و به آرامی پیتاز شدند و در نهایت نمونه‌ها با سرعت $400 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

محیط کشت PGC شامل KO-DMEM (10829, Invitrogen)، ۷٪/۰/۰/۰/۰ از FBS، ۲ میلی مولار گلوتامکس (35050, Invitrogen) ×۱ نوکلئوزید (Millipore, GSS-1016-C)، ۱x اسیدهای آمینه غیرضروری (Invitrogen, 11140-050)، ۰/۱ میلی مولار β-مرکاپتواتانول

¹ Animal Care Committee of Royan Institute for Stem Cell Biology & Technology (ACECR)

² Chicken Embryonic Fibroblast (CEF)

³ Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)

⁴ Sandos inbred mice 6-Thioguanine-resistant, Ouabain-resistant (STO)

⁵ Buffalo Rat Liver-3A (BRL 3A) cell line

⁶ Chicken Embryonic Fibroblast (CEF)

۱% Pen-Strep (Invitrogen, 15140-122)، ۵٪ سرم جوجه (Sigma, C5405) ۶ نانوگرم در میلی لیتر rmSCF (PeproTech, 250-03) و ۴ نانوگرم در میلی لیتر rhFGF (PeproTech, 100-18B) است. سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت PGC شناور شدند و برای جداسازی سلول‌های PGC از سلول‌های سوماتیک به روش چسبندگی افتراقی در پلیت ۲۴ چاهکی قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت سلول‌های شناور که PGC می‌باشند به پلیت‌های ۲۴ چاهکی جدید حاوی لایه‌های تغذیه‌کننده غیرفعال شده با میتومایسین یا پوشش داده شده با ماتریس‌های خارج سلولی^۱ منتقل شده و پاساژ سلول‌های PGC هر ۲ الی ۳ روز انجام شد. همه سلول‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ رشد کردند.

۲-۳- گروه‌های آزمایشی

سلول‌های PGC غدد جنسی جوجه با غلظت ۵۰۰۰۰ سلول به ازای هر خانه در پلیت ۲۴ چاهکی پوشش داده شده با ماتریژل (Matrigel) در چهار گروه و سه تکرار برای هر گروه آماده شدند. گروه‌های آزمایشی شامل گروه کنترل (محیط پایه برای کشت PGCs)، تیمار با کوچک مولکول IDE1 (100 nM; Stemgent, USA, 04-0026)، تیمار با فاکتور رشد Activin A (25 ng/ml; R&D Systems, 338-AC) و تیمار با SB431542 (10 μM; Cayman Chemical, 13031) بودند. شمارش سلول‌های PGC با هموسایتومتر در ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از تیمار انجام شد.

۲-۴- ارزیابی فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/β با qRT-PCR

برای ارزیابی فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/β، ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LFTTY1 با روش qRT-PCR کمی مورد بررسی قرار گرفتند و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. بدین ترتیب ابتدا کل RNA سلولی از هر گروه آزمایشی به وسیله کیت TRIZol (Sigma-Aldrich, T9424) به صورت جداگانه استخراج گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با DNase I (Takara, 2270A) برای حذف DNA ژنومی تیمار شدند. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA Fermentas (K1632) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد و در مرحله بعد cDNA حاصله برای آنالیز qRT-PCR مبتنی بر SYBR Green Master Mix (Takara Bio, Inc., RR081Q) با سیستم Real-time PCR (Corbett Life Science; Rotor-Gene 6000) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج توسط نرم‌افزار تحلیل Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science; version 1.7) آنالیز شد. آنالیز داده‌های خام برای همه ژن‌های Smad2، Smad3، Lefty1 و GAPDH با استفاده از روش فافل و همکاران [17] انجام شد. تغییر بیان ژن‌ها در تیمارها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ سنجیده شد. توالی‌های پرایمر ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ TGF/β.

Table 1- Primers sequences of genes downstream from TGF-β signaling.

Annealing Temperature (°C)	Amplicon Size (bp)	Sequences (5' to 3')	Genes
60	191	F: GCAATTACATACCAGAAACACCAC R: TATAGAACACCAGAATGCGGG	SMAD2
60	206	F: TACATCCCAGAGACACCTCC R: CGCTGGTTGAGTTCATAGTAGG	SMAD3
60	109	F: TCGTACTCTGGTACTCGGG R: GCACCTTGTGGATGTCTG	LEFTY1
60	150	F: AGTCCAAGTGGTTGCTATCA R: AAGATAGTGATGGCGTCCC	GAPDH
60	229	F: TCAAGACTTACGACGACAAC R: ATTCCCCGTACCACACCAG	OCT4
60	180	F: TCGCTTCTATTACCACTGTC R: CTCAGCCAATGCCTGTAGAG	NANOG
60	160	F: CGAACAACCAGAAGAACAGC R: TCGGACAGCAGCTCCACTC	SOX2
60	238	F: TTCTCCAACAGACCAACCAG R: AATCTCTGCTTCCAAAAC	CVH

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, OCT4: Octamer-binding Transcription factor 4, SOX2: Sex determining region Y-box 2, CVH: Chicken Vasa Homolog

^۱ Extracellular Matrices (ECM)

۲-۵- رنگ آمیزی پریودیگ اسید شیف^۱

برای تأیید هویت PGCs جوجه، گرانول‌های گلیکوژن موجود در سیتوپلاسم با روش PAS رنگ آمیزی شدند. سلول‌ها در پارافورمالدئید ۴٪ تثبیت و با آب مقطر شسته شدند. سپس در اسید پریودیگ ۰/۵٪ به مدت ۵ دقیقه اکسید و مجدداً شستشو داده شدند. در انتها تمامی سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با معرف اسید شیف ۰/۳٪ تحت تیمار قرار گرفتند و بعد از سه بار شستشو، زیر میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفتند.

۲-۶- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

پس از تثبیت سلول‌های کشت داده شده در پارافورمالدئید ۴٪ جرمی/حجمی در دمای اتاق، تمامی سلول‌ها تحت تیمار با Triton X-100 با غلظت ۰/۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر شدند. سلول‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه DAZL-1 تیمار و گرماگذاری شدند. پس از سه بار شستشو، سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه در تاریکی با آنتی‌بادی ثانویه Anti-rabbit IgG-Alexa 488 دقیق شده گرماگذاری شدند. رنگ آمیزی سلول‌ها با DAPI (Sigma-Aldrich, D8417) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد و سنجش و ثبت تصاویر با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس (Olympus IX-71) صورت گرفت. خصوصیات و جزئیات آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه مورد استفاده برای رنگ آمیزی ایمنی در جدول ۲ فهرست شده‌اند.

جدول ۲- فهرست آنتی‌بادی اولیه و ثانویه برای رنگ آمیزی هسته سلول‌های PGC جوجه.

Table 2- Lists the primary and secondary antibodies used for immunostaining nucleus chicken PGC.

Antibody	Cat. No.	Host	Dilution Ratio	Company
Primary antibody				
DAZL-1	Clone 7F.1	Rabbit IgG	1:100	Millipore
Secondary Antibody				
IgG-Alexa Fluor 488 Anti-rabbit	A-21206	Donkey IgG	1:500	Invitrogen

DAZL: Deleted in Azoospermia-Like

۲-۷- تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, Inc) انجام و به منظور مقایسه بین گروه‌های آزمایشی از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس از آن از Tukey post-hoc استفاده شد. آزمون t مستقل برای تفاوت بین دو مشاهدات انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین خطای استاندارد \pm SEM برای حداقل سه نمونه آماری مستقل در هر گراف مشخص شدند و سطح معنی داری به صورت $P < 0.01$, **: $P < 0.001$ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

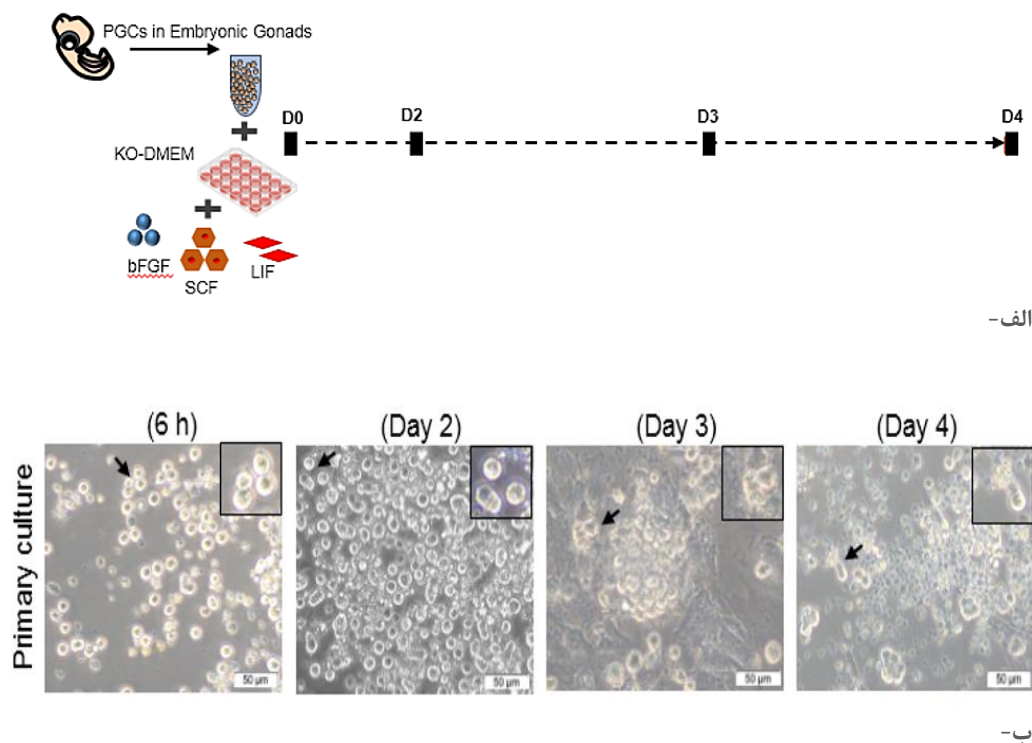
۳-۱- تولید سلول‌های PGC تحت شرایط کشت متعارف از مرحله HH28

نتایج جداسازی و تکثیر سلول‌های PGC از بافت غدد جنسی جنین ۵ روزه جوجه در شکل ۱ نشان داده شده است. غنی سازی و تکثیر سلول‌های PGCs در سیستم کشت چسبنده افتراقی (شکل ۱-الف) بر اساس روش وان دلاویر و همکاران [18] با دقت و حساسیت بالایی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که پس از انکوباسیون سلول‌های PGCs همراه با سلول‌های استرومای گنادی به صورت هم‌کشتی به مدت ۶ ساعت، سلول‌های استرومای گناد به کف ظرف کشت متصل شدند (شکل ۱-ب) و سلول‌های منفرد PGC روی بستری از سلول‌های استرومایی به صورت سوسپانسیون با اندازه بزرگ (۲۰-۱۵ میکرومتر)، هسته کروی بزرگ خارج از مرکز و ذرات لیپیدی سیتوپلاسمی قابل تشخیص بودند (شکل ۱-ب). این سلول‌ها در حضور سلول‌های استرومایی گناد به مدت ۴۸ ساعت در یک کشت اولیه تکثیر شدند و قابلیت تکثیر پذیری بالای آن‌ها منجر

¹ Periodic Acid-Schiff (PAS)

به افزایش تعداد سلول‌ها گردید (شکل ۱). در غلظت‌های بالای تکثیر سلولی، احتمالاً سلول‌های PGCs، مولکول‌های شیمیایی ترشح می‌کنند که سبب جذب آن‌ها به یکدیگر شده و این فرایند منجر به تشکیل توده یا کلامپ سلولی در ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه شد. علاوه بر این، در ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه، سلول‌های PGCs تماس‌های محکمی با سلول‌های استرومای گناد برقرار کردند که منجر به احاطه آن‌ها توسط سلول‌های استرومای گناد گردید (شکل ۱-ب). هم‌چنین نتایج این پژوهش اثبات نمود که پس از ۷۲ ساعت از کشت اولیه، سلول‌های PGC جوجه در شرایط کشت متعارف شروع به آپوپتوز نمودند و ۹۶ ساعت پس از شروع کشت، سلول‌های PGCs از بین رفتند (شکل ۱-ب).

این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ مطابقت دارد که گزارش کردند که سلول‌های PGCs، مولکول‌های شیمیایی (گلیکوپروتئین‌ها، پروتئین‌های سطح سلول) ترشح می‌کنند که PGC را به سمت یکدیگر جذب می‌کنند و در نتیجه کلامپ سلولی یا توده در ۷۲ ساعت پس از جداسازی و کشت سلول‌های PGC مشاهده می‌شود. تشکیل کلامپ‌ها در نهایت سمیت سلولی را در محیط کشت سلولی افزایش می‌دهد و در نتیجه منجر به کاهش نرخ تکثیر می‌شود [19]. از این رو، نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های استرومای گنادی قادر به حمایت از تکثیر سلول‌های PGC نیستند؛ بنابراین، در تطابق با یافته‌های مطالعات پیشین به منظور غلبه بر این چالش از لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده به‌عنوان بستر سلولی استفاده گردید [16]، [20]، [21].

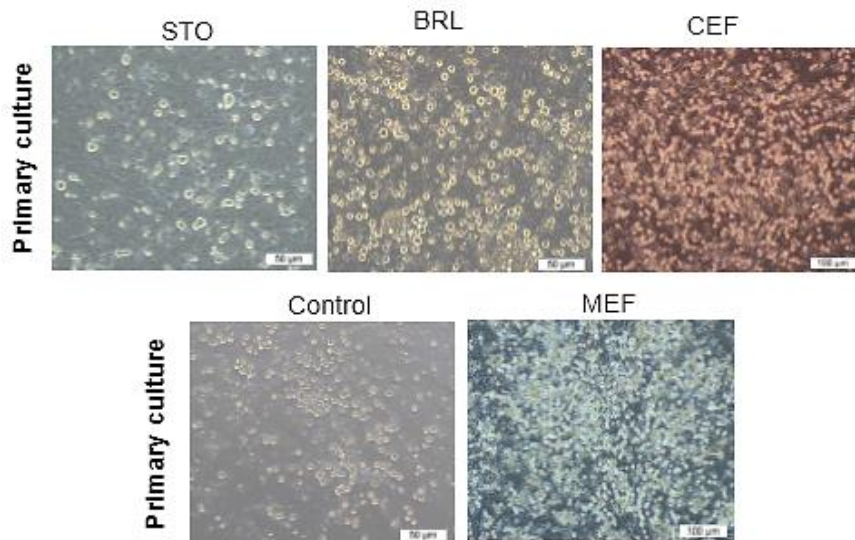


شکل ۱- تولید سلول‌های PGC جوجه تحت شرایط کشت متعارف؛ الف- خط زمانی جداسازی و کشت سلول‌های PGC جوجه در مرحله ۲۸-۲۹ HH در محیط کشت KO-DMEM حاوی سرم^۱ FBS، سرم جوجه و فاکتورهای رشد LIF، SCF و bFGF بر روی سلول‌های فیبربلاست گنادی جوجه، ب- تکثیر سلول‌های PGC در سیستم کشت افتراقی در روز ۰، ۲، ۳ و ۴ پس از کشت.
Figure 1- Derivation of chicken PGCs in conventional culture conditions: A. schematic and timeline for the isolation and culture of chicken PGCs at stages 28-29 HH in KO-DMEM medium supplemented with FBS, chicken serum, FGF2, SCF, and LIF in chicken gonadal fibroblast culture; B. enrichment of the isolated PGCs cultured on differential adherent culture systems at days 0, 2, 3, and 4. Scale bar: 50 μ m.

^۱ Fetal Bovine Serum (FBS)

۳-۲- نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول‌های PGC در حضور بسترهای سلولی

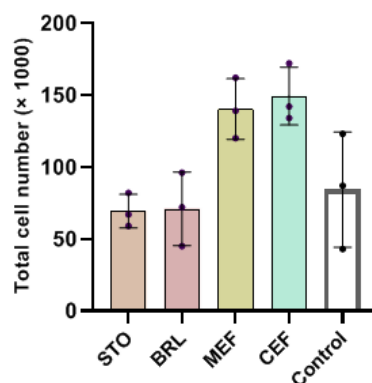
نتایج کشت سلول‌های PGC روی لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده STO، MEF، CEF و BRL-3A در شرایط کشت متعارف در شکل ۲ ارائه شده است. بدین منظور، سلول‌های PGC پس از ۴۸ ساعت کشت روی سلول‌های استرومای گنادی، جمع‌آوری شدند و روی لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده STO، BRL، MEF و CEF که از نظر میتوزی با میتومايسين-C غیرفعال شده بودند، کشت داده شدند. سپس به منظور بررسی نرخ تکثیر، بعد از ۷ روز از هم‌کشتی با لایه‌های سلولی تغذیه‌کننده، سلول‌های PGC با هموسایتومتر شمارش شدند و نتایج نشان داد که کشت سلول‌های PGC روی لایه‌های سلولی STO، BRL، MEF و CEF منجر به افزایش تعداد سلول‌ها به میزان ۸۲۰۰۰، ۹۶۰۰۰، ۶۲۰۰۰ و ۱۷۲۰۰۰ به ترتیب شدند (شکل ۲).



شکل ۲- تولید سلول‌های PGC جوجه تحت شرایط کشت متعارف روی بسترهای سلولی STO، CEF، BRL، فیبربلاست جنینی موش MEF.

Figure 2- Derivation of chicken PGCs in conventional culture conditions on STO, BRL, MEF, and CEF feeder cell layers. Scale bar: 50 and 100 μm .

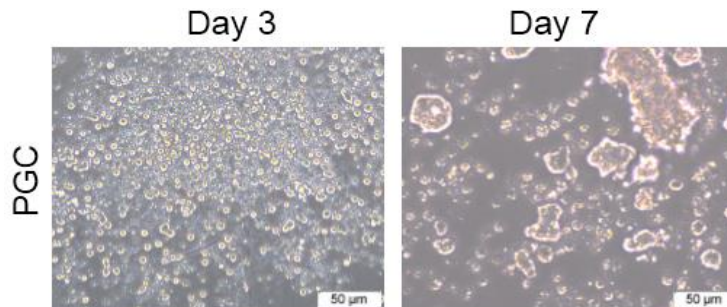
بررسی راندمان تکثیر و نرخ رشد سلول‌های PGC در حضور انواعی از بسترهای سلولی در شکل ۳ نشان می‌دهد که راندمان تکثیر و نرخ رشد در حضور بسترهای سلولی STO و BRL پایین است و در مقایسه با گروه کنترل منجر به تفاوت آماری قابل توجهی نشد. با این حال، راندمان تکثیر و نرخ رشد در حضور بسترهای سلولی MEF ($P < 0.05$) و CEF ($P < 0.01$) افزایش قابل توجهی نشان داد و به‌عنوان مناسب‌ترین بسترهای سلولی برای کشت PGCs در مقایسه با دیگر گروه‌های تیماری شناسایی گردید (شکل ۳).



شکل ۳- راندمان تکثیر سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای سلولی STO، BRL، CEF و فیبربلاست جنینی موش MEF.

Figure 3- Proliferation efficiency of chicken PGCs on STO, BRL, MEF and CEF feeder cell layers.

بررسی کشت طولانی مدت نشان داد که برقراری ارتباطات سلولی بین سلول‌های PGCs با سلول‌های MEF و CEF منجر به تشکیل کلاسترهای کروی می‌شود (شکل ۴) که کاهش نرخ تکثیر سلولی و پیشروی سلول‌های به سمت آپوپتوز را منجر شد. از آنجایی که کلاسترهای کروی منجر به عدم امکان تبادل هم‌زمان مواد مغذی و مواد شیمیایی مورد نیاز سلول‌های PGC می‌شوند، از رشد و تکثیر طولانی مدت سلول‌های PGCs روی بسترهای سلولی جلوگیری می‌کنند.



شکل ۴- کشت طولانی مدت سلول‌های PGC در حضور بسترهای سلولی CEF و فیبربلاست جنینی موش MEF در روز ۳ و ۷ پس از کشت اولیه.

Figure 3- Long-term culture of chicken PGCs on MEF and CEF feeder cell layers at days 3 and 7 after the primary culture. Scale bar: 50 μ m.

جدول ۳- نرخ زنده‌مانی و کشت طولانی مدت سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای سلولی STO، CEF، BRL، فیبربلاست جنینی موش MEF و گروه کنترل بدون لایه تغذیه‌کننده.

Table 3- Survival rate and long-term culture of chicken PGCs on STO, BRL, MEF, and CEF feeder cell layers and control group without feeder cell layer.

Types of Cell Substrates	Number of Eggs	Number of Cell Passages	Days of Cell Culture
STO	200	2	7
BRL	200	2	7
MEF	200	2	7
CEF	200	2	7
Control	200	2	7

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های STO طی پاساژهای سلولی مختلف از کف ظرف کشت‌کننده می‌شوند و به صورت سوسپانسیون مشابه با سلول‌های PGC بر روی بستر سلولی رشد می‌نمایند که به دلایل مورفولوژی مشابه با سلول‌های PGC، از همدیگر قابل تشخیص نیستند و از سوی دیگر مانع از رشد و تکثیر سلول‌های PGC نیز می‌شوند. محققان غلظت بالایی سلول‌های STO در پلیت‌های کشت حاوی PGC را از دلایل این امر ذکر کرده‌اند و غلظت پایین سلول‌های تغذیه‌کننده در زمان هم‌کشتی با دیگر سلول‌ها را ضروری شمرده‌اند [18]. با این حال، برخی مطالعات پایداری PGC با استفاده از لایه سلول‌های تغذیه‌کننده STO حاوی FBS در محیط کشت را نیز توصیف کردند [22]. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که کشت سلول‌های PGC روی بستر سلولی BRL نرخ تکثیر مشابهی در مقایسه با STO حاصل می‌کند، اما با این حال، منجر به کشت طولانی مدت نگردید. مطالعه اتچز و همکاران [23] نشان داد که PGCs جداشده از جریان خون بر روی سلول‌های تغذیه‌کننده STO و BRL قابلیت کشت و تکثیر را دارند.

بستر سلولی MEF از خاصیت خود نوزایی سلول‌های بنیادی موش حمایت می‌کند [24]. نتایج این مطالعه نشان داد که محققان بیان داشته‌اند که سلول‌های PGC کشت شده روی بستر سلولی MEF منجر به افزایش تکثیر سلول‌های PGC می‌شود، ولی قادر به تشکیل کلنی نیست که تاییدی بر نتایج پارک و هان [25] می‌باشد. در مقابل، خی و همکاران [26] گزارش کردند که هم‌کشتی PGC روی بستر سلولی MEF زمانی منجر به بالاترین تکثیر سلولی می‌شود که از پلیت‌های پوشش داده شده با غشای PET به عنوان مسدود کننده ارتباطات سلول PGC با سلول‌های MEF استفاده شود تا سلول‌های PGC تنها از ترشحات سلول‌های MEF برای خودنوزایی استفاده کنند. به طور کلی، نتایج این پژوهش اثبات نمود که سلول‌های PGC کشت شده روی بستر سلولی CEF توانایی تشکیل کلنی و تکثیر را دارند و می‌توانند به عنوان بهترین بستر برای تکثیر PGC انتخاب شوند. محققان نیز در سال ۲۰۰۷ بستر CEF را نیز به عنوان بستری مناسب و مطلوب برای کشت سلول‌های PGC پیشنهاد نموده‌اند [10].

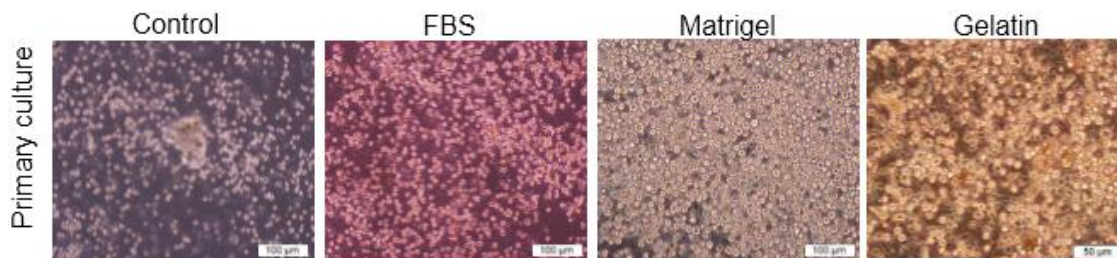
از آنجایی که سیتوکین‌های ترشح شده از سلول‌های تغذیه‌کننده برای بقا و خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه ضروری هستند و منجر به ترشح فاکتورهای رشد ضروری در محیط کشت می‌شوند که تمایز سلول‌های زایا را مهار می‌کنند و منجر به افزایش تکثیر سلول‌های PGC می‌شوند [18]،

[26]. با این وجود، برخی از عوامل آزاد شده دارای اثرات نامطلوب بر خودنوزایی سلول‌های بنیادی هستند [27]. علاوه بر این، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جوجه با حضور یک لایه تغذیه‌کننده منجر به تغییر در ترکیبات محیط کشت می‌شود که می‌تواند ویژگی‌های نهایی این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [28]. به گونه‌ای که استفاده از بسترهای سلولی مشتق از سلول‌های حیوانی ناهمگن خطر انتقال پاتوژن‌هایی از حیوانات دیگر به سلول‌های PGC وجود دارد [29]؛ بنابراین به منظور حذف عوامل اشاره شده در مطالعه حاضر از بسترهای غیر سلولی به منظور کشت سلول‌های PGC استفاده شد.

۳-۳- نتایج حاصل از جداسازی و کشت سلول‌های PGC حضور بسترهای غیر سلولی

با توجه به این‌که در حضور بستر سلولی تحت شرایط کشت متعارف، سلول‌های PGC در روزهای نخستین کشت قابلیت تکثیرپذیری خود را از دست دادند؛ بنابراین در بخش بعدی، نقش FBS و بسترهای غیر سلولی ECM شامل ژلاتین و ماتریژل تحت شرایط کشت متعارف روی تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های PGC جوجه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). بدین منظور، سلول‌های PGC پس از ۴۸ ساعت کشت روی سلول‌های استرومای گنادی، جمع‌آوری شدند و بر روی صفحات پوشش داده شده با FBS، ژلاتین و ماتریژل کشت و در انکوباتور ۵% CO₂ در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. هم‌چنین، به منظور استفاده از فاکتورهای ضروری مترشحه از سلول‌های تغذیه‌کننده از محیط KO-DMEM غنی شده با فیبریلاست جنین جوجه CEF استفاده شد که نه تنها امکان دسترسی مواد مغذی مترشحه از سلول‌های CEF برای سلول‌های PGC فراهم می‌شود، بلکه منجر به عدم ارتباطات سلول‌های PGC با سلول‌های CEF و ممانعت از تشکیل کلاسترهای کروی می‌شود [30]، [31].

نتایج نشان داد که PGCs کشت‌شده روی پلیت پوشش داده شده با ژلاتین دارای نرخ تکثیر آهسته و مدت زمان زنده‌مانی پایینی است و سلول‌های PGC شناور تمایل به تشکیل کلاسترهای کروی دارند (شکل ۵)، اما PGCs کشت‌شده در پلیت پوشش داده شده با ماتریژل و FBS در مقایسه با ژلاتین و گروه کنترل، نرخ تکثیر و مدت زمان زنده‌مانی بالاتری دارند (شکل ۵). علاوه بر این، بستر غیر سلولی ژلاتین در اولین پاساژ منجر به تکثیر زیادی از سلول‌ها گردید، اما تکثیر خود را در دومین پاساژ سلولی از دست داد و اغلب سلول‌ها به سمت تمایز پیش رفتند. در مقابل بستر غیر سلولی ماتریژل، منجر به افزایش راندمان تکثیر سلول‌های PGC در طی پاساژهای مختلف در مقایسه با گروه کنترل و دیگر گروه‌های تیماری گردید.

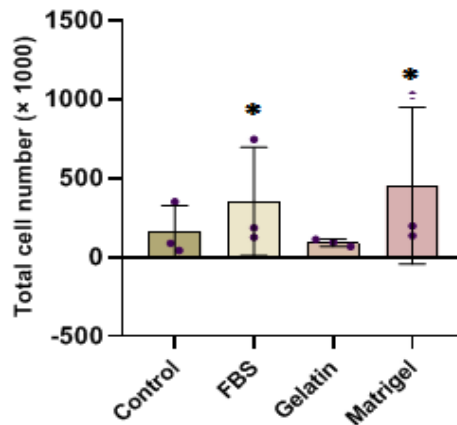


شکل ۵- تکثیر سلول‌های PGC جوجه تحت شرایط کشت متعارف روی FBS و بسترهای غیر سلولی ECM شامل ژلاتین و ماتریژل، FBS و ماتریس‌های خارج سلولی (تفاوت بین تصاویر در اثر تکنیک رنگ زمینه بود جود آمده است).

Figure 5- Proliferation of chicken PGCs in conventional culture conditions on FBS and various ECM (gelatin and Matrigel) feeder layer-free culture systems. Scale bar: 50 and 100 μ m.

نتایج مقایسه آماری نرخ تکثیر سلولی در گروه‌های مختلف بستر غیر سلولی در شکل ۶ نشان داد که سلول‌های PGC در حضور بسترهای غیر سلولی FBS و ماتریژل، در مقایسه با گروه کنترل (بدون بستر سلولی و یا فاکتور رشد) و گروه ژلاتین ($p < 0.05$) نرخ تکثیر و بالاترین تراکم سلولی را دارند (شکل ۶). به گونه‌ای که تعداد PGCs کشت‌شده در پلیت پوشش داده شده با بسترهای غیر سلولی FBS و ماتریژل در حدود دو هفته به نزدیک یک میلیون سلول تکثیر رسیدند (شکل ۶).

کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC در حضور بسترهای غیر سلولی در همه گروه‌های تیماری و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از کشت بررسی و شمارش شد. نتایج نشان داد که سلول‌های کشت شده روی پلیت پوشش داده شده با FBS پس از گذشت ۱۰ روز از کشت اولیه، به سمت آپوپتوز سلولی پیش رفتند و در نهایت از بین رفتند. در مقابل سلول‌های کشت شده روی پلیت پوشش داده شده با ماتریژل، بالاترین میزان زنده‌مانی را به مدت ۲۰ روز در مقایسه با دیگر بسترهای غیر سلولی نشان دادند (جدول ۴).



شکل ۶- راندمان تکثیر سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای غیر سلولی FBS، ژلاتین و ماتریژل، FBS، (***)، $p < 0.001$.

Figure 6- Proliferation efficiency of chicken PGCs on FBS and various ECM (gelatin, and Matrigel) feeder layer-free culture system.

جدول ۴ - نرخ زنده‌مانی و کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC جوجه در حضور بسترهای غیر سلولی FBS، ژلاتین و ماتریژل.

Table 4- Survival rate and long-term culture of chicken PGCs on FBS and various ECM (gelatin, and Matrigel) feeder layer-free culture system.

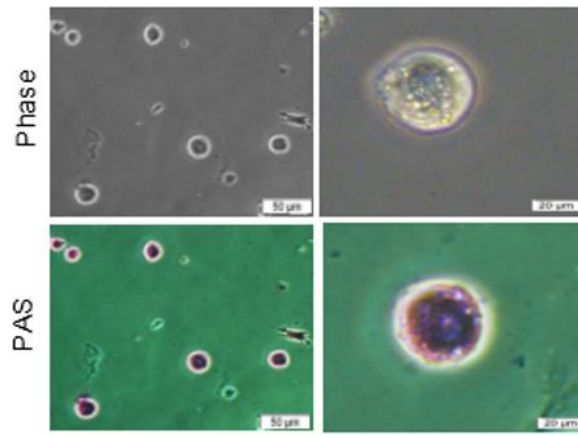
Number of Eggs	Number of Cell Passages	Days of Cell Culture	Types of Cell Substrates
250	5	20	Matrigel
250	3	10	FBS
250	2	7	Gelatin
250	2	7	Control

محققان افزایش زنده‌مانی در تیمار ماتریژل را با ترکیبات ماتریژل که حاوی لامینین، کلاژن نوع IV و بخشی از ماتریس خارج سلولی (لامینین مصنوعی یا فیبرونکتین) است مرتبط دانسته‌اند، بدین صورت که ماتریکس خارج سلولی از طریق گیرنده اینتگرین منجر به ارسال سیگنال‌های خارج سلولی درگیر در تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود. از سوی دیگر، تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی PGCها نشان داده است که سلول‌های PGC دارای ظاهری کروی شکل با میکروویل‌های متعددی هستند [32] که هنگام کشت روی یک لایه کلاژن همانند ماتریژل، Pseudopodia کوچک به منظور اتصال بین به آن، تولید می‌کنند [8]، [33]. برقراری اتصال بین سلول‌های PGCs با ماتریژل منجر به کاهش اتصالات بین PGCs و ممانعت از تشکیل کلاسترهای کروی شکل می‌شود [1]، [8].

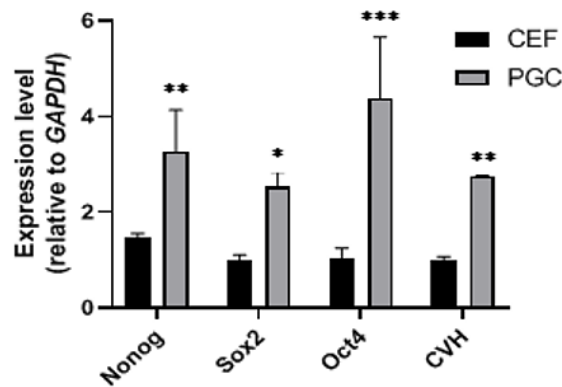
۳-۴- ارزیابی سلول‌های PGC کشت شده روی پلیت پوشش داده شده با ماتریژل

ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌های PGC کشت شده روی ظروف پوشش داده شده با ماتریژل و محیط کشت KO-DMEM غنی شده با محیط CEF و فاکتورهای رشد (LIF و bFGF، SCF)، نشان داد که سلول‌های PGC پس از ۲۰ روز از کشت اولیه، دارای اشکال کروی (۱۵-۲۰ میکرومتر) با ظاهر دانه‌ای مسطح حاوی وزیکول‌های چربی هستند (شکل ۷-الف) و در رنگ‌آمیزی اختصاصی گلیکوژن (PAS) به صورت رنگ ارغوانی (حاصل از برهم‌کنش رنگ با گروه‌های کربوهیدراتی گلیکوژن موجود در سیتوپلاسم سلول‌های PGC) قابل مشاهده هستند (شکل ۷-ج). علاوه بر این، نتایج ارزیابی پرتوانی و اختصاصیت سلول‌های PGCs حاکی از افزایش بیان ژن‌های مرتبط با پرتوانی، از جمله Oct4، Sox2 و Nanog و ژن CVH به‌عنوان نشانگر اختصاصیت سلول‌های زایا، در مقایسه با گروه کنترل منفی (CEFs) بود (شکل ۷). بررسی ایمونوسیتوشیمی (ICH) نشان داد که نشانگر DAZL در هسته سلول‌های PGC بیان شده است (شکل ۷).

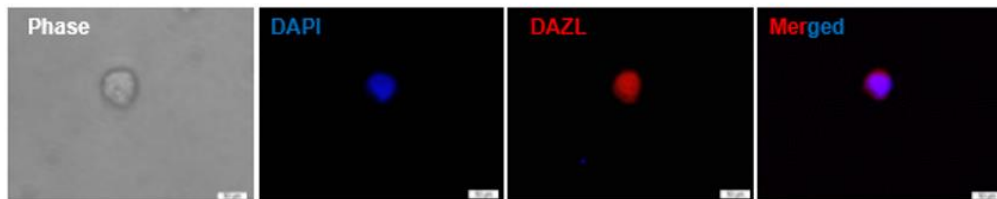
هان و پارک [34] بیان ژن‌های پرتوانی cOct4، cNanog، cKit، cENS-1، cMyc، cPrdm14 و cSall4 را در سلول‌های PGC جوجه را گزارش کردند. یخ‌کشی و همکاران [13] نشان دادند که بیان ژن‌های پرتوانی در سلول‌های PGC بلدرچین در مقایسه با گروه کنترل در روز ۳۵ از کشت اولیه افزایش قابل توجهی داشته است.



الف -



ب -



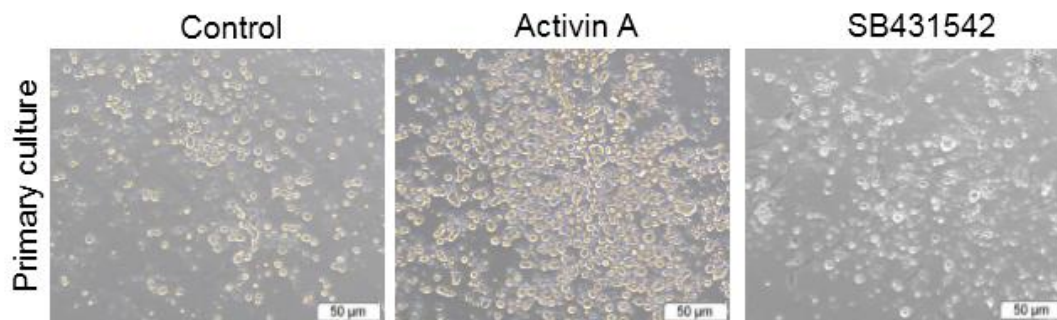
ج -

شکل ۷- ارزیابی سلول‌های PGC جوجه روی پلیت پوشش داده شده با ماتریژل؛ الف- رنگ‌آمیزی PAS، ب- RT-PCR برای ژن‌های مرتبط با پرتوانی (Oct4، Nanog و Sox2) و ژن CVH به‌عنوان نشانگر اختصاصیت سلول‌های زایا در سلول‌های PGC و گروه کنترل (CEFs)، ج- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای نشانگر DAZL.

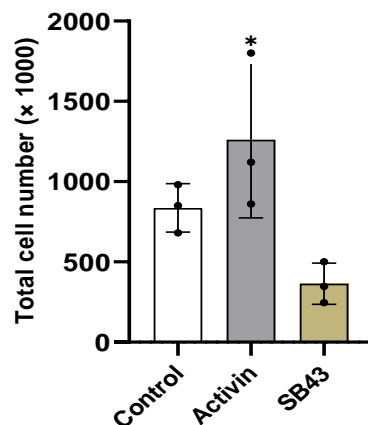
Figure 7- Characterization of chicken PGCs on Matrigel-coated plates; A. PAS staining, B. qRT-PCR for expressions of genes related to pluripotency OCT4, NANOG, and SOX2, and CVH gene as a specific germ cell lineage marker in chicken PGCs and control group (CEFs), C. immunofluorescence staining for markers DAZL. Scale bar: 50 µm.

۳-۵- تاثیر فاکتور رشد Activin A در تکثیر و خودنوزایی سلول‌های PGC جوجه

با توجه به اهمیت مسیر سیگنالینگ TGF- β /Activin/SMAD2/3 در خودنوزایی سلول‌های بنیادی اپی‌بلاست پستانداران (epiSCs)، سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) و iPSCs انسانی [35]، اخیراً نقش این مسیر در خودنوزایی PGCs پرنده‌گان نیز گزارش شده است [1]. نتایج مطالعه حاضر در خصوص فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF- β با استفاده از لیگاند Activin A و تاثیر آن در خودنوزایی سلول‌های PGCs جوجه نشان داد که تیمار سلول‌های PGC با Activin A منجر به افزایش راندمان تکثیر سلولی به بیش از ۴ برابر در مقایسه با گروه کنترل منفی (بدون فاکتور رشد) و کنترل مثبت (دارای مهارکننده SB431542) گردیده است (شکل ۸ و شکل ۹). هم‌چنین شمارش سلول‌های PGC با هموسایتومتر پس از ۲۰ روز از تیمار به منظور بررسی کشت طولانی‌مدت و مدت‌زمان زنده‌مانی نشان داد که گروه Activin A منجر به افزایش مدت‌زمان زنده‌مانی سلول‌ها به مدت ۲۵ روز گردید، اما منجر به کشت طولانی‌مدت نشد (جدول ۵). در مقابل، گروه SB431542، منجر به تکثیر آهسته و کاهش نرخ زنده‌مانی در ۷ روز پس از تیمار شد و در روز ۱۰ پس از کشت اولیه، سلول‌ها شروع به انحطاط و مرگ سلولی کردند (جدول ۵).



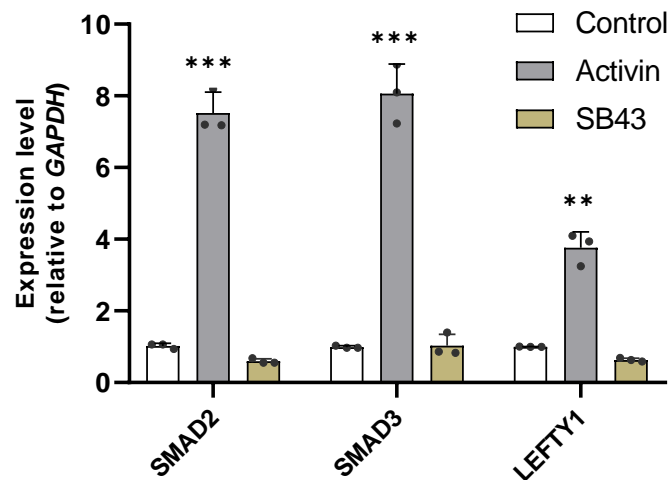
شکل ۸- تاثیر فاکتورهای رشد Activin A و SB431542 روی تکثیر و خودنوزایی سلول‌های PGC.
Figure 8- Effect of Activin A and SB431542 on proliferation and self-renewal of chicken PGCs.



شکل ۹- راندمان تکثیر سلول‌های PGC جوجه در حضور فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول SB431542، (***) p < 0.001.

Figure 9- Proliferation efficiency of chicken PGCs on Activin A growth factors and Small molecule (SB431542).

بررسی بیان ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LFTTY1 در گروه‌های آزمایشی Activin A، SB431542 و کنترل به منظور کاوش نقش مسیر سیگنالینگ TGF/ β نشان داد که تیمار با Activin A منجر به افزایش بیان ژن‌های Smad2، Smad3 و LFTTY1 به ترتیب به میزان ۷، ۸ و ۳ برابر در مقایسه با گروه کنترل منفی شد (شکل ۱۰). هم‌چنین گروه SB431542 منجر به کاهش سطح بیان ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LFTTY1 در مقایسه با گروه کنترل و Activin A شد. نتایج به‌دست‌آمده نقش مسیر سیگنالینگ TGF/ β در بیان ژن‌های پایین‌دست موثر در خودنوزایی و تکثیر سلول‌های بنیادی را اثبات می‌نماید.



شکل ۱۰ - ارزیابی بیان ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ TGF- β در سلول‌های PGCs با استفاده از qRT-PCR (***: $p < 0.001$).

Figure 10- Characterization expansion of genes downstream from TGF- β signaling of PGCs by qRT-PCR.

نتایج نشان دادند که تیمار Activin A به‌عنوان لیگاند TGF- β منجر به بهبود بقا و تکثیر PGC جوجه گردید که با توجه به مقالات دیگر این عملکرد از طریق فعال‌سازی هتروداپمرهای TGF- β R و فسفریلاسیون SMAD2/3 انجام می‌شود و به نوبه خود منجر به افزایش یا کاهش صدها ژن در مدت‌زمان ۱ الی ۲ ساعت پس از تیمار می‌شود [36]–[38]. نتایج این تحقیق ضرورت توجه به مسیر پیام‌رسانی TGF β در تکثیر سلول‌های PGC جوجه در محیط کشت را آشکار می‌نماید و اثر مسیر پیام‌رسانی Smad2/3 به‌عنوان یک مسیر مهم در تکثیر سلول‌های PGC را پررنگ‌تر می‌نماید. به‌عبارتی دیگر، ابر خانواده TGF- β دارای لیگاندهای مختلفی از جمله TGF- β ، Nodal، BMP، و Activin هستند که هرکدام آن‌ها نقش مهمی در خودنوزایی PGC جوجه ایفا می‌کنند [14]. این ابر خانواده با اتصال لیگاند Activin به گیرنده‌های سلولی منجر به فسفریلاسیون Smad 2/3 می‌شود که پروتئین‌های Smad 2/3 با Smad4 تشکیل کمپلکس می‌دهند و به هسته سلول منتقل می‌شوند و منجر به تغییراتی در تنظیم رونویسی در سطح DNA و تنظیم بیان ژن‌های لازم برای خودنوزایی می‌گردد [39].

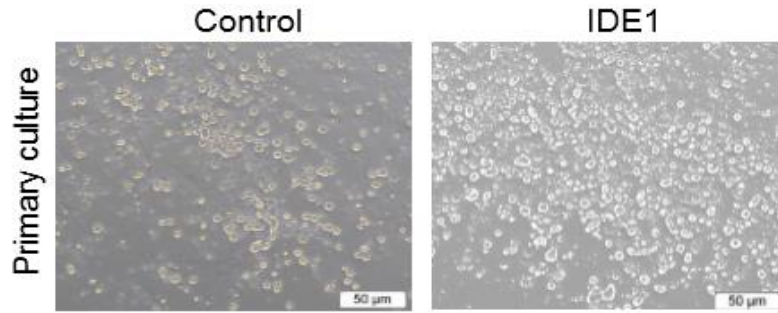
وایت و همکاران [1] گزارش نموده‌اند که مسیرهای پیام‌رسانی TGF- β /Activin/Nodal در سلول‌های PGC جوجه در شرایط *in vivo* و *in vitro* فعال است و منجر به خودنوزایی PGC در ترکیب با FGF2 و انسولین می‌شود. یخ کشی و همکاران [13] بیان داشته‌اند که فعال‌سازی مسیر پیام‌رسان TGF- β در سلول‌های PGC بلدرچین با استفاده از لیگاند Activin A منجر به فسفریلاسیون SMAD2/3 می‌شود که در نهایت تکثیر سلول‌های PGC مشتق از غدد جنسی بلدرچین را در پی خواهد داشت.

۳-۶- تولید سلول‌های PGC تحت شرایط کشت تعریف‌شده با استفاده از کوچک مولکول IDE1

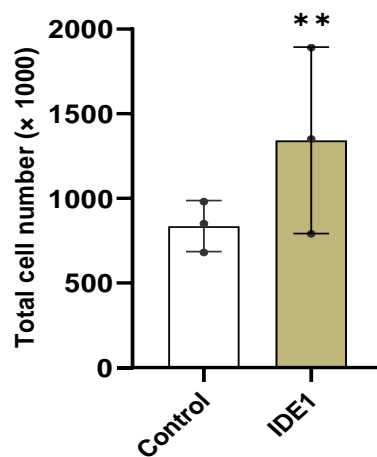
بررسی نقش IDE1 در نرخ تکثیر سلول‌های PGC جوجه نشان داد که تیمار سلول‌های PGC با کوچک مولکول IDE1 منجر به افزایش نرخ تکثیر به میزان ۶۴٪ و خودنوزایی سلول‌های به مدت‌زمان ۲۵ روز پس از کشت اولیه در مقایسه با گروه کنترل گردید (شکل ۱۱ و شکل ۱۲)، اما منجر به کشت طولانی مدت در شرایط آزمایشگاهی نگردید (جدول ۵).

ارزیابی بیان ژن‌های SMAD2، SMAD3 و LEFTY1 در گروه‌های آزمایشی IDE1 و کنترل به منظور بررسی نقش مسیر سیگنالینگ TGF/ β نشان داد که تیمار با IDE1 منجر به افزایش بیان ژن‌های Smad2، Smad3 و LEFTY1 در مقایسه با گروه کنترل شد (شکل ۱۳). این نتایج نقش IDE1 در فعال‌سازی تکثیر PGCs جوجه با القای فسفریلاسیون SMAD2 و فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF/ β را تایید می‌کند ولی منجر به

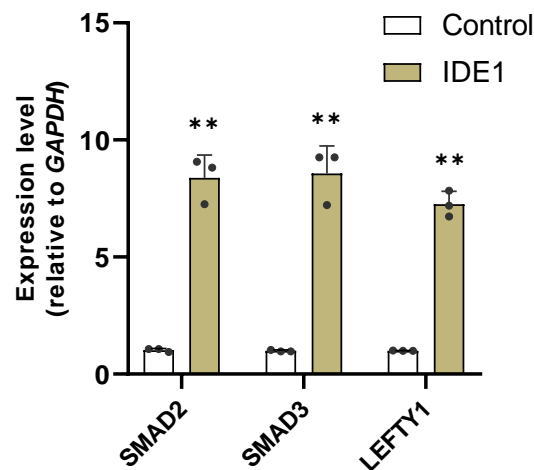
رفع چالش عدم توانایی کشت طولانی مدت سلول PGC نگردید. نتایج پژوهش بروویک و همکاران [40] نشان می‌دهد که کوچک مولکول IDE1 مشابه با اثرات Activin A منجر به القای فسفوریلاسیون SMAD2 پس از ۲۴ ساعت یا بیشتر می‌شود.



شکل ۱۱- تاثیر فاکتورهای رشد IDE1 روی تکثیر و خودنوزائی سلول‌های PGC.
Figure 11- Effect of IDE1 on proliferation and self-renewal of chicken PGCs.



شکل ۱۲- تاثیر کوچک مولکول‌های IDE1 روی تکثیر سلول‌های PGC.
Figure 12- Effect of IDE1 Small molecule on the expansion of chicken PGCs.



شکل ۱۳- ارزیابی بیان ژن‌های پایین دست مسیر سیگنالینگ TGF-β سلول‌های PGCs با استفاده از qRT-PCR (***: p < 0.001).

Figure 13- Characterization expansion of genes downstream from TGF-β signaling of PGCs by qRT-PCR.

جدول ۵- نرخ زنده‌مانی و کشت طولانی‌مدت سلول‌های PGC جوجه در حضور کوچک مولکول (IDE1 و SB431542) و فاکتور رشد Activin A.

Table 5- Survival rate and long-term culture of chicken PGCs on Small molecule (IDE1 and SB431542) and Activin A growth factors.

Treatments	Days of Cell Culture	Number of Cell Passages	Number of Eggs
Control	25	7	300
Activin A	25	8	300
IDE1	25	8	300
SB431542	7	2	300

کوچک مولکول IDE1 با فعال‌سازی SMAD2 در خودنوزایی سلول‌های PSC انسانی نقش دارد [40]. اخیراً از این کوچک مولکول‌ها در کشت سلول‌های بنیادی پرتوان پستانداران بدون نیاز به فاکتورهای رشد، به‌منظور حفظ و تقویت پرتوانی استفاده می‌شود [14]، [15]. نتایج این تحقیق بیان می‌دارد که احتمالاً فسفوریلاسیون SMAD2/3 توسط IDE1 ممکن است نقش کلیدی در حفظ بیان OCT4 و NANOG داشته باشد که برای شناسایی سلول‌های زایای و خودنوزایی آن‌ها ضروری است.

۴- نتیجه‌گیری

از آنجاکه، مسیر سیگنال دهی TGF- β /Activin/Nodal در PGC موشی منجر به مهار خودنوزایی می‌شود، به‌عنوان مهم‌ترین مسیر مرتبط با خودنوزایی و کشت طولانی‌مدت در سلول‌های PGC جوجه محسوب می‌شود. به‌گونه‌ای که در مطالعه حاضر، فعال‌سازی این مسیر با استفاده از فاکتور رشد Activin A و کوچک مولکول IDE1 منجر به حفظ پرتوانی PGCs به مدت ۲۵ روز از طریق افزایش بیان ژن‌های پایین دست مسیرهای سیگنالی SMAD2/3CA شد، اما این فعال‌سازی موفق به تولید لاین تکثیرپذیر PGC و کشت طولانی‌مدت آن نشد. این مطالعه نشان می‌دهد که SMAD2/3 کوفاکتورهای رایج و قدرتمندی هستند که باعث ایجاد پرتوانی و خودنوزایی در PGCs جوجه در کوتاه‌مدت می‌شوند. در مجموع، شواهد *in vitro* و *in vivo* نشان داد که PGC جوجه با توجه به تکوین منحصر به فرد آن از نظر رفتار عملکردی و ماشین‌های انتقال سیگنال با PGC پستانداران کاملاً متفاوت است و ارتباط همه مسیرهای سیگنالی با همدیگر منجر به تولید لاین سلولی می‌شود. اگرچه اخیراً مطالعات متعددی تولید سلول‌های PGC را نشان داده‌اند، اما بازنمایی همه ویژگی‌های پرتوانی در کشت طولانی‌مدت پایدار هنوز به دست نیامده است. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های PGC جوجه، تولید لاین‌های PGC نیازمند تلاش‌های بیشتری برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی و گفتگوی متقابل بین مسیرهای سیگنالی مختلف است. دستیابی به سلول‌های تکثیرپذیر PGC جوجه در جهت تولید واکسن و آنتی‌بادی مونوکلونال یکی از موضوعات مورد توجه محققان در سراسر جهان است که ضرورت مطالعات زمینه‌ای و تثبیت پروتوکول‌های جداسازی و کشت این سلول‌های وجود دارد. عدم وجود گزارشی در این زمینه در ایران منجر گردید که مطالعه حاضر برنامه‌ریزی گردد.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دوره دکتری رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور مصوب در دانشگاه گیلان و پژوهشگاه رویان استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از اعضای هیئت علمی پژوهشگاه سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان (تهران، ایران) و دانشگاه گیلان (رشت، ایران) که ما را در انجام و ارتقای کیفی این تحقیق یاری دادند، اعلام کنند.

عدم تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

منابع

- [1] Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., ... & McGrew, M. J. (2015). FGF, Insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem cell reports*, 5(6), 1171–1182. DOI:10.1016/j.stemcr.2015.10.008
- [2] Nakamura, Y., Tsai, M., Takeda, K., Nirasawa, K., & Tagami, T. (2013). Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the Japanese quail. *Journal of reproduction and development*, 59(6), 580–587. DOI:10.1262/jrd.2013-065

- [3] Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49–92. DOI:10.1002/jmor.1050880104
- [4] Naito, M., Nirasawa, K., & Oishi, T. (1990). Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *Journal of experimental zoology*, 254(3), 322–326. DOI:10.1002/jez.1402540311
- [5] Tajima, A., Hayashi, H., Kamizumi, A., Ogura, J., Kuwana, T., & Chikamune, T. (1999). Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *Journal of experimental zoology*, 284(7), 759–764. DOI:10.1002/(SICI)1097-010X(19991201)284:7<759::AID-JEZ5>3.0.CO;2-6
- [6] Bednarczyk, M. (2014). Avian primordial germ cells and their application. *Slovak journal of animal science*, 2014(4), 185–187.
- [7] Lillico, S. G., Sherman, A., McGrew, M. J., Robertson, C. D., Smith, J., Haslam, C., ... & Sang, H. M. (2007). Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*, 104(6), 1771–1776. DOI:10.1073/pnas.0610401104
- [8] Choi, J. W., Kim, S., Kim, T. M., Kim, Y. M., Seo, H. W., Park, T. S., ... & Han, J. Y. (2010). Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS one*, 5(9), e12968. DOI:10.1371/journal.pone.0012968
- [9] Macdonald, J., Glover, J. D., Taylor, L., Sang, H. M., & McGrew, M. J. (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS one*, 5(11), e15518. DOI:10.1371/journal.pone.0015518
- [10] Tang, X., Zhang, C., Jin, Y., Ge, C., & Wu, Y. (2007). Pro-proliferating effect of homologous somatic cells on chicken primordial germ cells. *Cell biology international*, 31(9), 1016–1021. DOI:10.1016/j.cellbi.2007.03.014
- [11] Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00432-X
- [12] Lee, H. C., Lim, S., & Han, J. Y. (2016). Wnt/ β -catenin signaling pathway activation is required for proliferation of chicken primordial germ cells in vitro. *Scientific reports*, 6(1), 34510. DOI:10.1038/srep34510
- [13] Yakhkeshi, S., Rahimi, S., Sharafi, M., Hassani, S. N., Taleahmad, S., Shahverdi, A., & Baharvand, H. (2018). In vitro improvement of quail primordial germ cell expansion through activation of TGF-beta signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 119(6), 4309–4319. DOI:10.1002/jcb.26618
- [14] Hassani, S. N., Totonchi, M., Farrokhi, A., Taei, A., Larijani, M. R., Gourabi, H., & Baharvand, H. (2012). Simultaneous SUPPRESSION of TGF- β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains. *Stem cell reviews and reports*, 8(2), 472–481. DOI:10.1007/s12015-011-9306-y
- [15] Hassani, S. N., Totonchi, M., Gourabi, H., Schöler, H. R., & Baharvand, H. (2014). Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem cells and development*, 23(3), 193–208. DOI:10.1089/scd.2013.0368
- [16] Van De Lavoie, M. C., Collarini, E. J., Leighton, P. A., Fesler, J., Lu, D. R., Harriman, W. D., ... & Etches, R. J. (2012). Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS one*, 7(5), e35664. DOI:10.1371/journal.pone.0035664
- [17] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), E45. DOI:10.1093/nar/29.9.e45
- [18] Van De Lavoie, M. C., Diamond, J. H., Leighton, P. A., Mather-Love, C., Heyer, B. S., Bradshaw, R., ... & Etches, R. J. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441(7094), 766–769. DOI:10.1038/nature04831
- [19] Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99–117.
- [20] Pauklin, S., & Vallier, L. (2015). Activin/nodal signalling in stem cells. *Development (Cambridge)*, 142(4), 607–619. DOI:10.1242/dev.091769
- [21] Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00847-X
- [22] Pain, B., Clark, M. E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., & Etches, R. J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 122(8), 2339–2348. DOI:10.1242/dev.122.8.2339
- [23] Etches, R. J. (2006). The hard cell(s) of avian transgenesis. *Transgenic research*, 15(5), 521–526. DOI:10.1007/s11248-006-9018-2
- [24] Lin, S., & Talbot, P. (2011). Methods for culturing mouse and human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology*, 690, 31–56. DOI:10.1007/978-1-60761-962-8_2
- [25] Park, T. S., & Han, J. Y. (2012). piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 109(24), 9337–9341. DOI:10.1073/pnas.1203823109
- [26] Xie, L., Lu, Z., Chen, D., Yang, M., Liao, Y., Mao, W., ... & Lu, Y. (2019). Derivation of chicken primordial germ cells using an indirect Co-culture system. *Theriogenology*, 123, 83–89. DOI:10.1016/j.theriogenology.2018.09.017
- [27] Tonus, C., Cloquette, K., Ectors, F., Piret, J., Gillet, L., Antoine, N., ... & Grobet, L. (2016). Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reproduction, fertility and development*, 28(5), 628–639.

- [28] Intarapat, S., & Stern, C. D. (2013). Chick stem cells: Current progress and future prospects. *Stem cell research*, 11(3), 1378–1392. DOI:10.1016/j.scr.2013.09.005
- [29] Zou, Q., Wu, M., Zhong, L., Fan, Z., Zhang, B., Chen, Q., & Ma, F. (2016). Development of a xeno-free feeder-layer system from human umbilical cord mesenchymal stem cells for prolonged expansion of human induced pluripotent stem cells in culture. *PLoS one*, 11(2), e0149023. DOI:10.1371/journal.pone.0149023
- [30] Germeraad, W. T. V., Asami, N., Fujimoto, S., Mazda, O., & Katsura, Y. (1994). Efficient retrovirus-mediated gene transduction into murine hematopoietic stem cells and long-lasting expression using a transwell coculture system. *Blood*, 84(3), 780–788. DOI:10.1182/blood.v84.3.780.bloodjournal843780
- [31] Sip, C. G., Bhattacharjee, N., & Folch, A. (2014). Microfluidic transwell inserts for generation of tissue culture-friendly gradients in well plates. *Lab on a chip*, 14(2), 302–314.
- [32] England, M. A., & Matsumura, G. (1993). Primordial germ cells in the primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. *Journal of anatomy*, 183, 67–73. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1259854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [33] Kuwana, T., Miyayama, Y., Kajiura, Y., & Fujimoto, T. (1987). Behavior of chick primordial germ cells moving toward gonadal primordium in vitro: Scanning electron microscopic study. *The anatomical record*, 219(2), 164–170. DOI:10.1002/ar.1092190209
- [34] Han, J. Y., & Park, Y. H. (2018). Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1), 1–11. DOI:10.1186/s40104-018-0234-4
- [35] Vallier, L., Alexander, M., & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of cell science*, 118(19), 4495–4509. DOI:10.1242/jcs.02553
- [36] Mullen, A. C., Orlando, D. A., Newman, J. J., Lovén, J., Kumar, R. M., Bilodeau, S., ... & Young, R. A. (2011). Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell*, 147(3), 565–576. DOI:10.1016/j.cell.2011.08.050
- [37] Estarás, C., Akizu, N., García, A., Beltrán, S., de la Cruz, X., & Martínez-Balbás, M. A. (2012). Genome-wide analysis reveals that Smad3 and JMJD3 HDM co-activate the neural developmental program. *Development (Cambridge, England)*, 139(15), 2681–2691. DOI:10.1242/dev.078345
- [38] Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N. C., Moreno, I., & Burks, D. (2015). Activin/nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes & development*, 29(7), 702–717.
- [39] Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimosato, D., ... & Miyazono, K. (2007). Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *Journal of cell science*, 120(1), 55–65.
- [40] Borowiak, M., Maehr, R., Chen, S., Chen, A. E., Tang, W., Fox, J. L., ... & Melton, D. A. (2009). Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 4(4), 348–358. DOI:10.1016/j.stem.2009.01.014