



Original Paper

## Effects of Alkaline Phosphatase, GATA, and BMP Expression on Three Populations of Cells: Spermatogonial Stem Cells, Embryonic Cells, and Embryonic Stem-Like Cells in Mice

Emad Reza<sup>1</sup> , Hossein Azizi (Ph.D)\*<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> M.Sc Student of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

<sup>2</sup> Ph.D in Cellular and Molecular Biology, Stem Cells, Associate Professor, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

### Abstract

**Background and Objective:** Alkaline phosphatase, BMP, and GATA proteins are important factors in the process of spermatogenesis. This study aims to investigate the effect of alkaline phosphatase, GATA, and BMP expression on spermatogenic stem cells, embryonic cells, and embryonic stem-like cells (ES-like) in C57BL mice.

**Methods:** In this experimental study, spermatogonial stem cells were isolated from three heads of 4-week-old C57BL mice, and embryonic stem cells and ES-like cells were prepared. Alkaline phosphatase staining test was performed on spermatogenic stem cells, embryonic cells, and ES-like cells. The expression of BMP and GATA genes was analyzed using Fluidigm PCR. Protein-protein interaction networks were isolated and drawn using databases.

**Results:** Positive alkaline phosphatase expression in stem cells and negative expression in testicular Sertoli cells indicated the presence of this enzyme in pluripotent cells. The gene expression of BMP and GATA in spermatogonial stem cells (6.3 and 2.7, respectively), embryonic cells (3.2 and 4.4, respectively), and ES-like cells (8.5 and 2.5, respectively) was positive, but not statistically significant. Bioinformatics studies showed the regulatory role of these genes and their direct effect on alkaline phosphatase.

**Conclusion:** BMP and GATA genes, along with alkaline phosphatase enzymes, play a crucial role in controlling embryonic and spermatogonial stem cells, maintaining their pluripotency, and guiding them towards differentiated cells.

**Keywords:** Embryonic Stem Cells, Adult Germline Stem Cells, Alkaline Phosphatase, GATA Transcription Factors, Bone Morphogenetic Protein Receptors.

\*Corresponding Author: Hossein Azizi (Ph.D), E-mail: h.azizi@ausmt.ac.ir

Received 12 Jun 2022

Final Revised 30 Jul 2022

Accepted 5 Sep 2022

Published Online 21 Jun 2023

Cite this article as: Reza E, Azizi H. [Effects of Alkaline Phosphatase, GATA, and BMP Expression on Three Populations of Cells: Spermatogonial Stem Cells, Embryonic Cells, and Embryonic Stem-Like Cells in Mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 25(1): 29-37. [Article in Persian]





## تحقیقی

# اثر بیان آلکالین فسفاتاز، GATA و BMP بر سلول‌های بنیادی اسپرم ساز، سلول‌های جنینی و شبه سلول‌های بنیادی جنینی در موش‌های نژاد C57BL

عماد رضا<sup>۱</sup>، دکتر حسین عزیزی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.  
<sup>۲</sup> دکتری زیست شناسی سلولی و مولکولی، سلول‌های بنیادی، دانشیار، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

## چکیده

زمینه و هدف: آلکالین فسفاتاز و پروتئین‌های BMP و GATA از جمله فاکتورهای اثرگذار در فرآیند اسپرم‌زایی هستند. این مطالعه به منظور تعیین اثر بیان آلکالین فسفاتاز، GATA و BMP بر سلول‌های بنیادی اسپرم ساز، سلول‌های جنینی و شبه سلول‌های بنیادی جنینی (ES-like) در موش‌های نژاد C57BL انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از ۳ سر موش ۴ هفته‌ای نژاد C57BL، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like تهیه شدند. سپس تست رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز بر روی سلول‌های بنیادی اسپرم ساز، سلول‌های جنینی و شبه سلول‌های بنیادی جنینی انجام شد. در ادامه با استفاده از Fluidigm PCR بیان ژن‌های BMP و GATA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از آن شبکه ارتباطی پروتئین - پروتئین آنها با استفاده از پایگاه‌های داده، جداسازی و رسم گردید.

یافته‌ها: بیان مثبت آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی و بیان منفی آن در سلول‌های سرتولی بیضه نشان از وجود این آنزیم در سلول‌های پرتوان داشت. ژن BMP و ژن GATA در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (به ترتیب ۳/۶ و ۲/۷)، جنینی (به ترتیب ۲/۳ و ۴/۴) و ES-like (به ترتیب ۵/۸ و ۲/۵) بیان ژن مثبت داشتند که این مقادیر از نظر آماری معنی‌دار نبودند. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان از نقش تنظیم‌کنندگی این ژن‌ها و اثر مستقیم آنها بر آلکالین فسفاتاز داشت.

نتیجه‌گیری: ژن‌های BMP و GATA و آنزیم آلکالین فسفاتاز جزو فاکتورهای کنترل‌کننده سلول‌های بنیادی جنینی و اسپرماتوگونی بوده و در حفظ پرتوانی آنها و همچنین در هدایت آنها به سمت سلول‌های تمایز یافته نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی جنسی بالغ، آلکالین فسفاتاز، فاکتورهای رونویسی GATA، گیرنده‌های پروتئینی مورفوژتیک استخوان

\* نویسنده مسؤل: دکتر حسین عزیزی، پست الکترونیکی [h.azizi@ausmt.ac.ir](mailto:h.azizi@ausmt.ac.ir)

نشانی: آمل، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، دانشکده زیست فناوری، گروه زیست فناوری، تلفن ۰۱۱-۴۴۴۲۱۲۵

وصول ۱۴۰۱/۳/۲۲ اصلاح‌نهایی ۱۴۰۱/۵/۸ پذیرش ۱۴۰۱/۶/۱۴ انتشار ۱۴۰۲/۳/۳۱

## مقدمه

مانند سلول‌های رده زاینده جنینی (EG)، سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSC) در سطوح بالایی بیان می‌شود.<sup>۱</sup> سطوح بیان AP معیار کمتر استفاده شده‌ای برای تشخیص تمایز بین سلول‌های تمایزنیافته و تمایز یافته است. زیرا سطح بیان آن بسته به تمایز، متفاوت است. AP یک نشانگر عمومی سلول‌های بنیادی است و برای شناسایی محیط سلول‌های بنیادی در شرایط *in vivo* استفاده شده است.<sup>۲</sup> علاوه بر کاربردهای خاص سلول‌های بنیادی، می‌توان از آنها برای ردیابی سلول‌های تراریخته در آزمایش‌های پیوند استفاده کرد. زیرا AP به عنوان نشانگری برای شناسایی این سلول‌ها استفاده شده است. فعالیت AP به وضوح با بیان

اسپرماتوژن (اسپرم‌زایی) یکی از فرآیندهای مهم و سازمان‌یافته بدن است که طی آن اسپرم بالغ برای تولید مثل ایجاد می‌شود. در طول این مسیر فاکتورهای گوناگونی نقش دارند. آلکالین فسفاتازها (AP) جزو آنزیم‌هایی هستند که مولکول‌های حاوی فسفات را در شرایط قلبیایی هیدرولیز می‌کنند. در بدن انسان، چهار نوع مختلف از این آنزیم شامل نوع روده‌ای، جفتی، شبه‌جفتی و غیرجفتی وجود دارد. ایزوآنزیم غیراختصاصی آلکالین فسفاتاز در بافت کلیه، استخوان و کبد بیان می‌شود.<sup>۳</sup> علاوه بر این طی مطالعات دیگر مشخص شده است که AP در سایر انواع سلول‌های بنیادی پرتوان

سر تولی همزمان با اولین تقسیم اسپرم‌زایی، القا می‌شود و سلول‌های GATA-1 مثبت در طول رشد بیضه قبل از بلوغ به‌طور یکنواخت در بین تمام لوله‌ها توزیع می‌شوند.<sup>۱۳</sup> اخیراً دریافتند که GATA-1 در لوله‌های اسپرماتوگونی بیضه موش نیز بیان می‌شود. یکی از مهم‌ترین پرسش‌های باقی مانده در فیزیولوژی تولید مثل مردان، توضیح مکانیسم یا مکانیسم‌هایی است که توسط آنها چرخه اسپرم‌زایی تنظیم می‌شود. شواهد رو به رشد از این فرضیه حمایت می‌کنند که وابستگی عملکردی سلول‌های جنسی و سر تولی در لوله‌های اسپرماتوگونی ممکن است نقشی محوری در تنظیم اسپرماتوژنز داشته باشد. بخش قابل توجهی از سلول‌ها پس از بالغ شدن حیوانات، GATA-1 آنها منفی شده است.<sup>۱۵،۱۴</sup> GATA-1 ممکن است با تنظیم بیان گروهی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های سر تولی در تنظیم شروع چرخه اسپرم‌زایی شرکت کند.

از طرفی با توجه نتایج قبلی ما<sup>۱۶</sup> رده سلولی شبیه به سلول‌های بنیادی جنینی (ES-like) به دست آمده است. با بررسی بیشتر روی این رده سلولی، می‌توان به نتایج کامل و دقیق‌تری در رابطه با کشت و تمایز آنها دست یافت و از این منبع به عنوان یکی از منابع مهمی که دسترسی آسانی دارند؛ در زمینه درمان بیماری‌ها به روش سلول‌درمانی به خصوص درمان بیماری ناباروری، استفاده نمود. این مطالعه به منظور تعیین اثر بیان آلکالین فسفاتاز، GATA و BMP بر سلول‌های بنیادی اسپرم ساز، سلول‌های جنینی و شبه سلول‌های بنیادی جنینی (ES-like) در موش‌های نژاد C57BL انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳ سر موش ۴ هفته‌ای نژاد C57BL در سال ۱۴۰۱ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل (IR.AUSMT.REC.1400.29) قرار گرفت. پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

**هضم آنزیمی بافت بیضه:** ابتدا سلول‌های بیضه را از موش‌ها جداسازی کردیم. در ادامه در محلول نمکی بافر فسفات (USA) (Invitrogen Co.) PBS; Phosphate-buffered saline قرار دادند. در مرحله بعدی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه از کپسول بیضه جدا (دکپسوله) و در این حین به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول بافری HBSS که حاوی یون Ca و Mg بود؛ همچنین به همراه آنزیم‌های هضم کننده کلاژناز تیپ IV (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، DNase (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و دیسپاز (با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قرار داده شد. عملکرد آنزیم‌های هضم کننده در FBS ۱۰ درصد متوقف شده و سپس محلول حاصل برای به دست آوردن سوسپانسیون تک سلولی، پیپتاژ

آن مرتبط است و تنظیم دقیق آن به جای برخی از مسیرهای سیگنالینگ، توسط میکرو محیط اطراف آن صورت می‌گیرد.<sup>۵</sup> بنابراین بیان و فعالیت AP عمدتاً از طریق وضعیت رشد سلول‌ها یا بافت‌ها تنظیم می‌شود. به طور کلی بیان AP یک نشانگر مناسب برای فرآیندهای تمایز، هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی برای انواع سلول‌ها است.<sup>۶</sup>

برخی از پروتئین‌ها وجود دارند که در حفظ حالت تمایز نیافته سلول‌ها و یا هدایت آنها به سمت مسیرهای تمایزی نقش دارند. پروتئین‌های مورفوژنیک استخوان (BMPs) در بسیاری از جنبه‌های زیست‌شناسی رشد سلول‌ها نقش اساسی دارند.<sup>۷</sup> قبلاً نشان داده شده است که BMP7، BMP8a و BMP8b از گروه A60 ژن‌های BMP دارای اثرات افزایشی در اسپرم‌زایی و حفظ یکپارچگی اپیدیدیم در ناحیه‌های سر و Caput (کاپوت) هستند. در ادامه مشخص شد که BMP4 از گروه Dpp دارای یک الگوی بیان منحصر به فرد در رشد بیضه و اپیدیدیم است.<sup>۸</sup> مردان هتروزیگوت در ژن BMP4 عمدتاً در زمینه باروری به دلیل انحطاط سلول‌های زاینده، دچار مشکل شده‌اند که نتیجه این موضوع کاهش تعداد اسپرم و تحرک اسپرم را نشان می‌دهد. جالب‌تر این که برخی از این نرها که دچار وجود ژن‌های جهش یافته BMP7 و BMP8 هستند؛ تخریب گسترده اپیتلیوم اپیدیدیم را نشان می‌دهند.<sup>۹</sup> داده‌های ژنتیکی نیاز بخشی خاص از گروه‌های مختلف BMP را برای بقای اپیتلیوم اپیدیدیم نشان می‌دهند و پیامدهای مهمی بر سلامت باروری مردان و احتمالاً کنترل تولد دارند.<sup>۱۱</sup>

BMP ها اعضای ابرخانواده فاکتور رشد TGFh بوده و حاوی چندین پلی‌پپتید هستند که از نظر ساختاری مرتبط؛ اما از نظر عملکردی متنوع هستند و شامل TGFhs، Activins/Inhibins، Nodal، MIS و BMPs هستند. بیش از ۲۰ عضو BMP در گونه‌های مختلف از C. elegans تا انسان شناسایی شده است. آنها با تنظیم تکثیر سلولی، تمایز سلولی، مرگ سلولی و سرنوشت سلولی در طول جنین‌زایی و در جنبه‌های متعددی از اندام‌زایی نقش مهمی ایفا می‌کنند.<sup>۱۱</sup> به نظر می‌رسد BMP4 به‌طور گسترده‌ای در طول جنین‌زایی موش و در بزرگسالان بیان شده است. اکثر جهش یافته‌های هموزیگوت BMP4 طی گاسترولاسیون اولیه با نقص در مزودرم و تشکیل سلول‌های زاینده می‌میرند. BMP2 برای رشد آمیون و قلب مورد نیاز است و همچنین در تعیین سرنوشت سلول‌های زایا نقش دارد.<sup>۱۲</sup> که این موارد نشان از نقش اساسی این فاکتور در تمایز سلول‌های بنیادی دارد.

یکی دیگر از عوامل مهم و اثرگذار GATA-1 است که به وفور در یک زیر مجموعه مجزا از سلول‌های مجاور اپیتلیوم اسپرماتوگونی در لوله‌های بیضه موش بیان می‌شود. بیان GATA-1 در سلول‌های

cdNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه دناتوره شد. محصولات حاصل تا ۵ برابر رقیق شدند. سپس با Universal PCR Master Mix و TaqMan در یک سیستم BioMark تجزیه و تحلیل شدند. هر نمونه در دو تکرار فنی آنالیز شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، آنها با GAPDH و تغییر بیان mRNA در سلول‌های تغذیه کننده MEF، نرمال شدند.

**رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز:** سلول‌های ESC-like و سلول‌های بنیادی اسپرم ساز با NBT/BCIP (BCIP: 5-bromo-4- NBT:4-Nitro blue tetrazolium chloride) pH=۹/۵، TMN-Puffer در chloro-3-indolyl-phosphate رنگ‌آمیزی شدند. این واکنش با استفاده از آب دیونیزه متوقف شد و با ۴ درصد PFA تثبیت گردید. پس از شست و شو، نمونه‌ها با ژلاتین گلیسرول کایزر قالب‌گیری شدند و سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

**ایجاد شبکه اتصالات پروتئین-پروتئین و تجزیه و تحلیل مجموعه ژن‌ها و نقش آنها:** ژن‌های دخیل در فرآیند اسپرم‌زایی و همچنین ژن‌های با ارتباط مستقیم در تنظیم بیان آلکالین فسفاتاز، در NCBI و COREMINE شناسایی شدند و در پایگاه‌های داده آنالیز STRING (v 11.5) برای ساخت شبکه PPI مورد استفاده قرار گرفتند. از نرم‌افزار Cytoscape (V 2.8.3) برای ایجاد، تجزیه و تحلیل شبکه PPI و ارتباط‌های آنها استفاده شد. سپس نقش‌های بیولوژیکی ژن‌ها و محل بیان آنها در شبکه PPI گره‌های همسایه نشان داده شد و تجزیه و تحلیل ارتباط ژن‌های عملکردی با استفاده از تجزیه و تحلیل STRING Enrichment در نرم‌افزار Cytoscape انجام گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تمام آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار شدند. میانگین بیان ژن‌ها در گروه‌ها محاسبه شد و گروه‌ها با استفاده از تست نرمالیتی، نرمال بودن و عدم نرمال بودن داده‌ها سنجیده شدند. سپس با توجه به عدم نرمال بودن داده‌ها، از تست ناپارامتریک کوریسکال واریانس برای سنجش معنی‌داری استفاده شد. در ادامه آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) به همراه آزمون‌های Tamhane's T2 و Dunnett's T3 برای سنجش همبستگی و تفاوت بیان میان رده‌های سلولی در نرم‌افزار آماری SPSS-26 مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری همه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

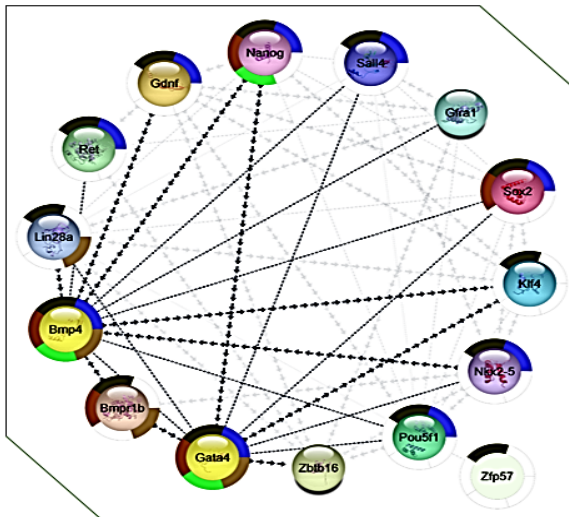
#### یافته‌ها

پس از رسم شبکه ارتباطی پروتئین-پروتئین، نحوه ارتباط ژن‌ها با یکدیگر نمایش داده شد. (شکل یک). آلکالین فسفاتاز با ژن‌هایی همچون Lin28، Gfra1، Sall4، Ret، Nanog، Sox2، Oct4، Klf4، GATA و BMP ارتباط مستقیم داشتند. ژن‌های BMP، GATA

بعد از سانتی‌فیوژ و حذف محلول بالایی، نمونه‌ها با محلول DMEM/F12 (DMEM/Nutrient Mixture F-12) شسته و سپس از فیلتر نایلونی عبور داده شدند. بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتی‌فیوژ شدند. محلول رویی حذف و سلول‌های باقیمانده در محیط کشت مخصوص سلول‌های اسپرماتوگونی کشت داده شدند.<sup>۱۷</sup>

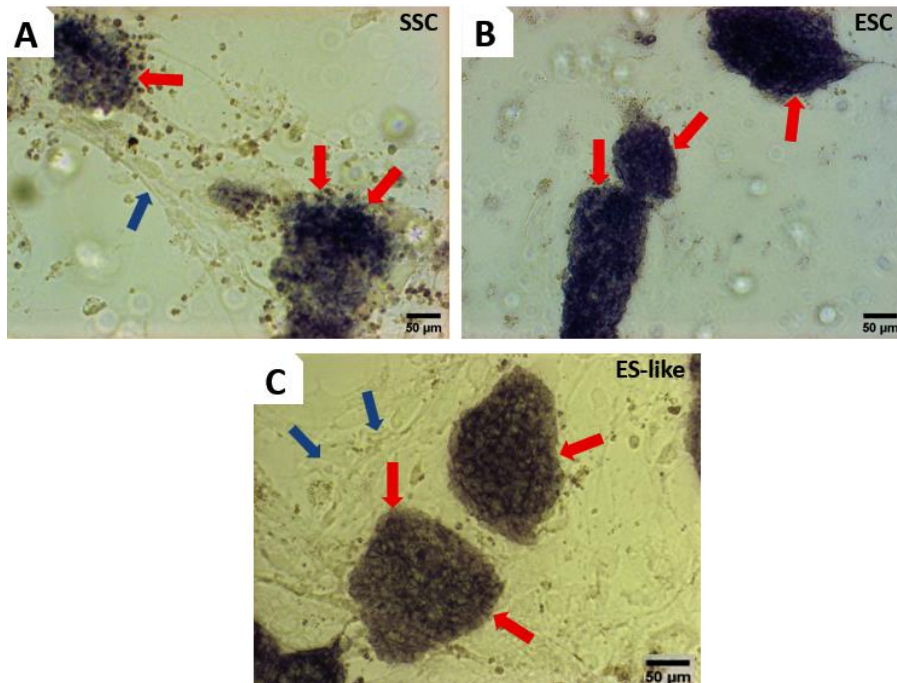
**کشت سلول‌های بیضه:** سلول‌های منفرد حاصل روی ظروف کشت پوشش داده شده با ژلاتین ۰/۲ درصد قرار داده شد که تقریباً  $10^5 \times 0.2/0.5$  سلول در هر  $3/8$  سانتی‌متر مربع سلول‌های کشت شده در محیط GSC موش (mGSC) شامل محیط stemPro-34، ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر D-گلوکز (USA) (Sigma Aldrich)، یک درصد مکمل N2 (USA) (Invitrogen)، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (USA) (Sigma Aldrich)، یک درصد ویتامین‌های MEM NEAA (USA) (PAA)، یک درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین (USA) (PAA)، یک درصد آمینواسیدهای غیر ضروری (USA) (PAA)، ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرادیول (USA) (Sigma Aldrich)، ۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر پروژسترون (USA) (Sigma Aldrich)، یک درصد L-گلوتامین (USA) (PAA)، ۰/۱ درصد  $\beta$ -mercaptoethanol (Invitrogen) (USA)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر EGF (USA) (Sigma Aldrich)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر FGF (USA) (Sigma Aldrich)، ۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF (USA) (Sigma Aldrich)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر LIF (USA) (Millipore)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (USA) (Sigma Aldrich)، ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیرویک اسید (USA) (Sigma Aldrich)، یک میکروگرم بر میلی‌لیتر DL - لاکتیک اسید (USA) (Sigma Aldrich) و استرادیول ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، پروژسترون ۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ES-FBS یک درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت شدند.<sup>۱۸</sup>

**تجزیه و تحلیل بیان ژن در سیستم Fluidigm Biomark:** چیپ‌های مخصوص برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های سلول‌های پرتوان و سلول‌های زایا از جمله BMP و GATA استفاده شد. ژن‌خانه‌دار GAPDH برای کنترل استفاده شد. در هر نمونه، حدود ۱۰۰ سلول به صورت دستی از کشت‌های سلولی مختلف (با میکروبیپیت یا میکرومانیپلاتور) برداشته شد و بلافاصله منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در فرآیندی با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، mRNA به cdNA رونویسی معکوس شد. رونویسی معکوس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس انجام شد که با حرارت دادن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۲ دقیقه) غیرفعال شد.



| شماره ارجاع | توصیف                            | مقدار FDR | رنگ |
|-------------|----------------------------------|-----------|-----|
| GO:0048598  | جنین زایی                        | 1.34E-7   | ■   |
| GO:0007548  | تمایز جنسی                       | 1.1E-4    | ■   |
| GO:0007276  | گامت زایی                        | 0.0331    | ■   |
| GO:0030510  | تنظیم مسیر پیام رسانی فاکتور BMP | 0.0025    | ■   |
| GO:0010468  | تنظیم بیان ژن                    | 4.8E-6    | ■   |

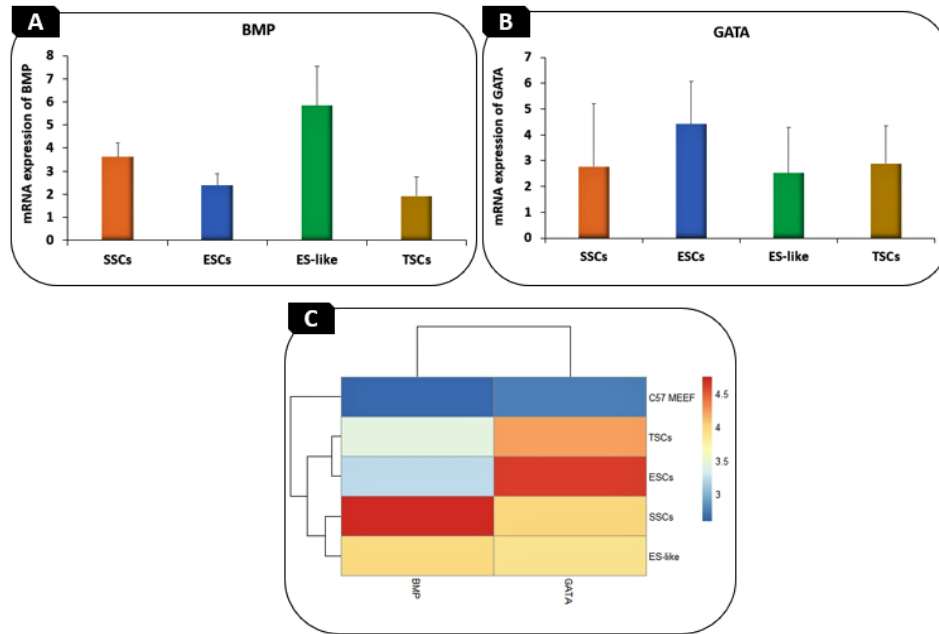
شکل ۱: شبکه ارتباطی ژن‌های BMP و GATA و همچنین نحوه اثر آنها بر یکدیگر و ژن‌های مرتبط.



شکل ۲: بیان آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی اسپرم ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like (پیکان قرمز). سلول‌های فیبروبلاست با بیان منفی (پیکان آبی).

رنگ‌آمیزی شدیدی را مشابه mESCs نشان دادند. در ادامه آزمایشات بررسی Fluidigm PCR برای تعیین میزان بیان ژن BMP صورت گرفت که طبق نتایج به دست آمده مشاهده گردید که بیان این ژن در هر سه رده سلولی مورد آزمایش مثبت و البته سطح بیان آنها پایین بود (شکل ۳). این ژن در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، جنینی و ES-like به ترتیب مقدار بیان ۳/۶، ۲/۳ و ۵/۸ (مثبت) داشت که این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. میزان بیان این ژن در سلول‌های TSCs ۱/۹ و مثبت بود. هیچکدام از رده‌های سلولی بیان معنی داری نسبت به دیگری نداشتند. در ادامه تست Fluidigm PCR نتایج بیان ژن GATA بررسی شد. این ژن نیز بیان

Gdnf و Zbtb16، Nanog، Klf4 بیشترین ارتباط را با هم داشتند که در این مقاله به بررسی دو مورد از آنها شامل BMP و GATA پرداخته شد. در این شکل محل دقیق بیان هر یک از این فاکتورها نیز مشخص شده است که در راهنمای شکل یک قابل مشاهده است. پس از رنگ‌آمیزی و بیان آلکالین فسفاتاز، سلول‌های بنیادی تمایز نیافته که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، جنینی و نیز سلول‌های ES-like هستند؛ بیان مثبت آنها مشاهده شد (شکل ۲). سلول‌های سرتولی بیضه و فیبروبلاست بیان منفی داشتند. در حالی که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تا حدی برای AP مثبت بودند که رنگ‌آمیزی ضعیف‌تر را نشان دادند و سلول‌های ES-like



شکل ۳: بررسی میزان mRNA ژن‌های BMP و GATA با استفاده از Fluidigm PCR (A) و BMP و GATA در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، جنینی و شبه جنینی بیان مثبتی داشتند. رسم نمودار Heatmap و مقایسه بیان ژن‌های GATA و BMP در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، جنینی و ES-like ها (با استفاده از برنامه نویسی R). ژن‌های دارای بیان بالاتر با رنگ قرمز و ژن‌های دارای بیان کمتر با رنگ آبی، نمایش داده شده‌اند (C).

جنینی موش و انسان قرار می‌دهد. ICM بر خلاف سلول‌های تروفوبلاست در مرحله بلاستوسیست، نشان‌دهنده فعالیت بسیار بالا AP است. این موضوع نشان می‌دهد که ICM هرچه به سمت تمایز به رده‌های سلولی تخصص یافته پیش می‌رود؛ بیان AP در آن کاهش می‌یابد.<sup>۱</sup> همچنین مشاهده شده که آلکالین فسفاتاز در جمعیت‌های سلولی تخصصی مانند سلول‌های PG و در بافت‌ها به عنوان مثال در استئوبلاست‌ها ظاهر می‌شود.<sup>۱</sup> آزمایشات ما نیز دقیقاً نتایج این گروه را تأیید می‌کند که این آنزیم در سلول‌های بنیادی پرتوان بیان می‌شود؛ اما در سلول‌های تمایز یافته بیان آن کم می‌شود. فعالیت بالای AP با اکثر سلول‌های بنیادی مرتبط است. سلول‌های سرطانی جنینی، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPS) فعالیت بالای AP را نشان می‌دهند.<sup>۵</sup> در آزمایش Akcakaya و همکاران سلول‌های ES موش از سلول‌های پرتوان ICM جدا شدند. در این زمان، ژن *Akp5* (کد کننده EAP) به طور غالب بیان می‌شود. با این حال، سلول‌های ES موش ژن *Akp2* (کد کننده TNAP) را نیز بیان می‌کنند که برای تعیین حالت تمایز نیافته آنها استفاده می‌شود.<sup>۱۹</sup> در جنین انسان، فعالیت GCAP در سلول‌های PG، بر خلاف سلول‌های ES انسان که در آن TNAP شناسایی می‌شود؛ مشاهده می‌شود. همچنین سلول‌های EC انسانی هر دو آنزیم TNAP و GCAP را بیان می‌کنند.<sup>۲۱،۲۰</sup>

در ادامه بررسی بیان ژن BMP صورت گرفت که نتیجه آن بیان مثبت این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی و اسپرم‌ساز را نمایان کرد. بر اساس همسانی توالی‌های این ژن، BMP ها به چندین دسته

مثبتی را در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like نشان داد. ژن GATA در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، جنینی و ES-like به ترتیب مقدار بیان ۲/۷، ۴/۴ و ۲/۵ (مثبت) داشت که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین در سلول‌های TSCs نیز این ژن میزان بیان ۲/۸ و مثبت بود. در ادامه بررسی‌ها، نمودار Heatmap برای مقایسه بیان ژن‌های مورد نظر در رده‌های سلولی آزمایش شده صورت گرفت. طبق نمودار دندروگرام حاصل مشاهده گردید که سلول‌های بنیادی جنینی و ES-like به نیای مشترکی برمی‌گردند و تأیید کننده شباهت این دو رده سلولی با هم بود.

با توجه به شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و جنینی که جزو پرتوان‌ها هستند؛ بیان مثبت دارند و در سلول‌های بالغ و تمایز یافته نیز بیان مثبت داشتند.

## بحث

در این مطالعه، ابتدا رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like انجام شد. همان‌طور که در برخی دیگر از آزمایش‌ها در رده سلول‌های بنیادی جنینی مشاهده شده است؛<sup>۱</sup> این رده سلولی نیز نتایج مثبتی از بیان آنها را نشان داد. به‌طور مشابه در مطالعه Štefková و همکاران کاهش سطح و کاهش فعالیت AP را در سلول‌های ES را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که بیان نشانگرهای پرتوان مانند Oct4، Nanog و Zfp42 بدون تغییر باقی مانده است.<sup>۱</sup> با این حال سطح بیان بالا و فعالیت بالای AP، آن را جزو نشانگرهای سلول‌های بنیادی

در بین تمام لوله‌ها توزیع می‌شوند. با این حال، تعداد سلول‌های GATA-1 مثبت پس از آن کاهش می‌یابد و تنها در ناحیه محیطی لوله‌های اسپرماتوگونی در مراحل VII، VIII و IX اسپرم زایی در بیضه موش بالغ یافت شده است.<sup>۲۵</sup> در مقابل، تقریباً هر سلول سرتولی در موش‌های جهش یافته که همگی فاقد تعداد قابل توجهی از سلول‌های زاینده هستند؛ GATA-1 را بیان می‌کنند. بنابراین نشان می‌دهد که بیان این فاکتور رونویسی به طور منفی توسط موش‌ها کنترل می‌شود. سلول‌های زایای بالغ در این مشاهدات نشان می‌دهند که فاکتور رونویسی GATA-1 یک تنظیم کننده خاص چرخه اسپرم‌زایی در سلول‌های سرتولی است. اخیراً دریافتند که GATA-1 در لوله‌های اسپرم ساز بیضه موش نیز بیان می‌شود. با این حال، بیان ضعیف GATA-1 در سیتوپلاسم پیش‌سازهای سلول سرتولی در برجستگی تناسلی و سلول‌های بیضه موش نوزاد مشاهده شد. این داده‌ها نشان می‌دهد که سیگنال‌ها ممکن است بیان سیتوپلاسمی GATA-1 را در این سلول‌های نابالغ سرتولی نشان دهند. GATA-1 ممکن است با تنظیم بیان گروهی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های سرتولی در تنظیم شروع چرخه اسپرم‌زایی شرکت کند.<sup>۲۶</sup> داده‌های ارایه شده Wakabayashi و همکاران به وضوح نشان می‌دهد که GATA-1 در سلول‌های رده سرتولی بیان می‌شود و بیان GATA-1 در سلول‌های سرتولی همزمان با اولین تقسیم اسپرم‌زایی در بیضه موش پیش از بلوغ القا می‌شود. GATA-1 منحصراً در مراحل VII، VIII و IX اسپرم زایی در بیضه‌های موش بالغ بیان می‌شود؛ اما بیان GATA-1 در سایر مراحل سرکوب می‌شود.<sup>۲۷</sup> چنانچه در این مطالعه شرایط انجام تست‌های میکروآرای برای بررسی دقیق‌تر تعداد ژن‌های بیشتری که در این فرایند نقش دارند؛ فراهم می‌گردید؛ نتایج بسیار دقیق‌تر و کارآمدتری به دست می‌آمد. همچنین با افزایش تجهیزات تصویربرداری‌های پیشرفته از جمله میکروسکوپ کونفوکال در داخل کشور، می‌توان پیشرفت فراوانی در امر بررسی بهتر و مطالعات فراتر در این زمینه نمود. بر اساس مطالعات بررسی شبکه پروتئین-پروتئین دو ژن BMP و GATA، این دو ژن که ارتباط مستقیم در تنظیم بیان و فعالیت آلکالین فسفاتاز دارند؛ جزو ژن‌های اثرگذار در تنظیم اسپرماتوژنز هستند و در سلول‌های جنسی و بیضه بیان می‌شوند. همچنین این ژن‌ها با برخی دیگر از ژن‌های تنظیم کننده این فرآیند پیچیده ارتباط دارند و موجب تنظیم بیان و فعالیت یکدیگر می‌شوند. ژن‌هایی از جمله *Gdnf*، *Ret*، *Nanog*، *Klf4*، *Sox2*، *Pou5f1*، *Zbtb16*، *BMP1b* و *GATA* جزو این شبکه ارتباطی مستقیم هستند. در نتیجه بررسی بیان این ژن‌ها و نقش هر یک، بسیار کمک کننده است تا مکانیسم پیام‌رسانی اسپرماتوژنز به طور کامل درک گردد. همچنین با کشف و یا شناخت منابع جدید سلول‌های بنیادی پرتوان و استفاده هدفمند از آنها، می‌توان امیدوار بود که در

گروه‌بندی می‌شوند. دسته DPP (BMP2، BMP4 و DPP) در یک انتهای طیف قرار دارد و پس از آن دسته A60 (BMP5-8) وجود دارد.<sup>۸</sup> به نظر می‌رسد BMP4 به‌طور گسترده در طول جنین‌زایی موش و در بزرگسالان بیان شده است. اکثر جهش یافته‌های هموزیگوت BMP4 طی گاسترولاسیون اولیه با نقص در مزودرم و تشکیل سلول‌های زاینده می‌میرند.<sup>۲۲</sup> BMP در رشد و تعیین سرنشت سلول‌های زایا اهمیت دارد.<sup>۲۳</sup> BMP8a و BMP8b در سلول‌های زایای مردانه بیان می‌شوند. سطوح پایین در اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت‌ها در قبل از بلوغ و سطوح بالای بیان آنها در اسپرماتیدهای گرد (round spermatids) ظاهر می‌شوند. غیرفعال‌سازی هدفمند این ژن‌ها، گاهی منجر به انحطاط سلول‌های زاینده می‌شود.<sup>۲۴</sup> BMP7، BMP8a، BMP8b و A60 از دسته A60 ژن‌های BMP دارای نقش افزایشی در اسپرم‌زایی و حفظ یکپارچگی اپیدیدیم ناحیه‌های سر و کاپوت هستند. طی مطالعه Hu و همکاران گزارش شد که BMP4 دارای یک الگوی بیان منحصر به فرد در رشد بیضه و اپیدیدیم است. مردان با BMP4 هتروزیگوت که در زمینه باروری عمدتاً به خطر افتاده‌اند؛ به دلیل انحطاط سلول‌های زاینده، کاهش تعداد اسپرم و کاهش تحرک اسپرم است. برخی به‌جای جهش یافته‌های BMP7 و BMP8، تخریب گسترده اپیتلیوم اپیدیدیم را در ناحیه بدنه اسپرم نشان می‌دهند.<sup>۹</sup> در بین اعضای شناخته شده دسته A60، BMP7، BMP8a، BMP8b و سلول‌های زایای بیضه بیان می‌شوند.<sup>۹</sup> علاوه بر این Hu و همکاران به همراه تیم‌های خود گزارش کردند؛ BMP7 و BMP8a نیز در اپیدیدیم بیان می‌شوند.<sup>۸</sup> غیرفعال‌سازی هدفمند این ژن‌ها نشان داده است که این ژن‌ها در اسپرم‌زایی و حفظ یکپارچگی اپیدیدیم نقش دارند. در ادامه برای بررسی بیشتر عملکرد BMP ها در تولید مثل و اسپرماتوژنز، بیان چندین ژن شناخته شده دیگر BMP را غربال کردند و دریافتند که BMP4 نیز در بیضه با یک الگوی مشخص بیان می‌شود.<sup>۸</sup> همچنین با توجه به بیان مثبت این ژن در سلول‌های سرتولی بیضه می‌توان حدس زد این ژن علاوه بر حضور در حالت پرتوانی سلول، در حالت تمایز یافته آن نیز حضور دارد و می‌تواند نقشی در هدایت این سلول‌ها در جهت اختصاصی شدن ایفا کند.

در انتها نیز بررسی بیان ژن GATA مورد بررسی قرار گرفت. این ژن نیز بیان مثبتی در سلول‌های بنیادی اسپرم ساز و جنینی داشت. در بررسی موش‌های جهش یافته طبیعی و ناقص نشان داده شده که GATA-1 تنها در رده سلول‌های سرتولی در بیضه موش بیان می‌گردد؛<sup>۲۵</sup> همانطور که ما نیز بیان این ژن در سلول‌های سرتولی بیضه را مشاهده کردیم. بیان GATA-1 در سلول‌های سرتولی همزمان با اولین تقسیم اسپرم زایی القا می‌شود و سلول‌های با بیان GATA-1 مثبت در طول رشد بیضه، قبل از بلوغ، به طور یکنواخت

است. آلکالین فسفاتاز به همراه ژن‌های BMP و GATA که در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان مثبت داشتند؛ در سلول‌های ES-like نیز حضور مثبت داشتند و این اشتراک می‌تواند راه را برای آزمایش‌های بعدی در زمینه تولید اسپرم بالغ از سلول بنیادی ES-like باز کند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب (۱۵/۲۰/۱۲۱۲۴) مورخ ۱۴۰۰/۹/۶ امور پژوهش و فناوری دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل بود و با حمایت مالی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل و توافق‌نامه همکاری بین دانشگاه هایدلبرگ آلمان (MOU) انجام گردید. بدین‌وسیله از Professor Thomas Skutella تشکر می‌گردد که ما را در انجام تست‌های مولکولی در دانشگاه هایدلبرگ یاری نمودند. بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

### References

1. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 628368. doi: 10.1155/2015/628368
2. Fishman WH. Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin Biochem.* 1990 Apr; 23(2): 99-104. doi: 10.1016/0009-9120(90)80019-f
3. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem.* 2014 Jul; 29(3): 269-78. doi: 10.1007/s12291-013-0408-y
4. Tang Z, Chen H, He H, Ma C. Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2019 Apr; 113: 32-43. doi: 10.1016/j.trac.2019.01.019
5. Niu X, Ye K, Wang L, Lin Y, Du D. A review on emerging principles and strategies for colorimetric and fluorescent detection of alkaline phosphatase activity. *Anal Chim Acta.* 2019 Dec; 1086: 29-45. doi: 10.1016/j.aca.2019.07.068
6. Aziz H, Mahmood A, Zaib S, Saeed A, Shafiq Z, Pelletier J, et al. Synthesis, characterization, in vitro tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and intestinal alkaline phosphatase (IAP) inhibition studies and computational evaluation of novel thiazole derivatives. *Bioorganic Chemistry.* 2020 Sep; 102: 104088. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104088
7. Ghasemi Hamidabadi H, Nazm Bojnordi M, Azizi H, Rezaei N. [The effect of BMP4 on mouse embryonic stem cell proliferation and differentiation into primordial germ cells]. *SJKU.* 2019; 24(3): 110-20. doi: 10.29252/sjku.24.3.110 [Article in Persian]
8. Hu J, Chen YX, Wang D, Qi X, Li TG, Hao J, et al. Developmental expression and function of Bmp4 in spermatogenesis and in maintaining epididymal integrity. *Dev Biol.* 2004 Dec; 276(1): 158-71. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.034
9. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis.* 2003 Jan; 35(1): 43-56. doi: 10.1002/gene.10167
10. Divya D, Bhattacharya T. Bone morphogenetic proteins (BMPs) and their role in poultry. *World's Poultry Science Journal.* 2021; 77(3): 539-64. doi: 10.1080/00439339.2021.1959274
11. Lochab AK, Extavour CG. Bone Morphogenetic Protein

آینده‌ای نزدیک بتوان به کمک این سلول‌ها از روش‌های درمانی، سلول درمانی استفاده کرد و بیماری‌هایی از جمله ناباروری را درمان نمود.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آلکالین فسفاتاز یکی از فاکتورهای نمایان‌کننده سلول‌های بنیادی پرتوان است و در سلول‌های تمایز یافته بیان آن کاهش می‌یابد. هر چند برخی از سلول‌های تمایز یافته نیز بیان مثبت داشتند. همچنین مشخص شد؛ این آنزیم به همراه ژن‌های BMP و GATA جزو فاکتورهای جلوگیری‌کننده از تمایز سلول‌های بنیادی هستند و نیز این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی اسپرم‌ساز بیان می‌شوند. بیان مثبت این ژن‌ها در رده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های ES-like نیز نشان‌دهنده نقش آنها در حفظ حالت پرتوانی این سلول‌ها است. بیان BMP و GATA در سلول‌های تمایز یافته نشان‌دهنده نقش آن در هدایت سلول‌های بنیادی به سمت تمایز

(BMP) signaling in animal reproductive system development and function. *Dev Biol.* 2017 Jul; 427(2): 258-69. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.002

12. Sun YC, Cheng SF, Sun R, Zhao Y, Shen W. Reconstitution of gametogenesis in vitro: meiosis is the biggest obstacle. *J Genet Genomics.* 2014 Mar; 41(3): 87-95. doi: 10.1016/j.jgg.2013.12.008

13. Lowry JA, Atchley WR. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *J Mol Evol.* 2000 Feb; 50(2): 103-15. doi: 10.1007/s002399910012

14. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, Wilson DB, Ritvos O, Butzow R, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep; 85(9): 3476-83. doi: 10.1210/jcem.85.9.6828

15. Haveri H, Westerholm-Ormio M, Lindfors K, Mäki M, Savilahti E, Andersson LC, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol.* 2008 Apr; 8: 9. doi: 10.1186/1471-230X-8-9

16. Azizi H, Conrad S, Hinz U, Asgari B, Nanus D, Peterziel H. Derivation of Pluripotent Cells from Mouse SSCs Seems to Be Age Dependent. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 8216312. doi: 10.1155/2016/8216312

17. Azizi H, Ghasemi Hamidabadi H, Skutella T. Differential Proliferation Effects after Short-Term Cultivation of Mouse Spermatogonial Stem Cells on Different Feeder Layers. *Cell J.* 2019 Jul; 21(2): 186-93. doi: 10.22074/cellj.2019.5802

18. Azizi H, Skutella T, Shahverdi A. Generation of Mouse Spermatogonial Stem-Cell-Colonies in A Non-Adherent Culture. *Cell J.* 2017 Jul-Sep; 19(2): 238-49. doi: 10.22074/cellj.2016.4184

19. Akcakaya H, Aroymak A, Gokce S. A quantitative colorimetric method of measuring alkaline phosphatase activity in eukaryotic cell membranes. *Cell Biology International.* 2007; 31(2): 186-90. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.11.014

20. Langer D, Ikehara Y, Takebayashi H, Hawkes R, Zimmermann H. The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal



- and adult neurogenic zones. *Neuroscience*. 2007 Dec; 150(4): 863-79. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.064
21. Kermer V, Ritter M, Albuquerque B, Leib C, Stanke M, Zimmermann H. Knockdown of tissue nonspecific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation. *Neurosci Lett*. 2010 Nov; 485(3): 208-11. doi: 10.1016/j.neulet.2010.09.013
22. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci*. 2000 Apr; 113(Pt 7): 1101-09. doi: 10.1242/jcs.113.7.1101
23. Puglisi R, Montanari M, Chiarella P, Stefanini M, Boitani C. Regulatory role of BMP2 and BMP7 in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse. *Eur J Endocrinol*. 2004 Oct; 151(4): 511-20. doi: 10.1530/eje.0.1510511
24. Ciller IM, Palanisamy SK, Ciller UA, McFarlane JR. Postnatal expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in the mouse testis. *Physiol Res*. 2016 Nov; 65(4): 673-82. doi: 10.33549/physiolres.933193
25. Ketola I, Anttonen M, Vaskivuo T, Tapanainen JS, Toppari J, Heikinheimo M. Developmental expression and spermatogenic stage specificity of transcription factors GATA-1 and GATA-4 and their cofactors FOG-1 and FOG-2 in the mouse testis. *Eur J Endocrinol*. 2002 Sep; 147(3): 397-406. doi: 10.1530/eje.0.1470397
26. Lindeboom F, Gillemans N, Karis A, Jaegle M, Meijer D, Grosveld F, et al. A tissue-specific knockout reveals that Gata1 is not essential for Sertoli cell function in the mouse. *Nucleic Acids Res*. 2003 Sep; 31(18): 5405-12. doi: 10.1093/nar/gkg723
27. Wakabayashi J, Yomogida K, Nakajima O, Yoh K, Takahashi S, Engel JD, et al. GATA-1 testis activation region is essential for Sertoli cell-specific expression of GATA-1 gene in transgenic mouse. *Genes Cells*. 2003 Jul; 8(7): 619-30. doi: 10.1046/j.1365-2443.2003.00658.x