Original Article

The effect of poly L-lactic acid nanofiber on the induction of colony formation of frozen-thawed bovine spermatogonial stem cells in vitro

Rahimi-Feyli P[1*], Tajik P[2], Shafiei Sh[3], Dodel M[4], Arbabi F[5]

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, I. R. Iran.
2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran.
3- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran.
4- Department of Nanotechnology and Tissue Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, I. R. Iran.
5- Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, I. R. Iran.

Received September 28, 2014; Accepted February 19, 2015

Abstract:

Background: Preparing a suitable condition for in vitro culture of spermatogonial stem cells can help discover all of the molecular mechanisms involving in spermatogenesis and pave the way for gene manipulation. This study aimed to evaluate the effect of a poly L-lactic acid (PLLA) nanofiber on the proliferation of frozen-thawed bovine spermatogonial stem cells in vitro.

Materials and Methods: The isolated spermatogonial cells from the prepubertal bull were frozen-thawed and cultured in two groups: the control group (C) including the spermatogonial cells and the treatment group (T) including the spermatogonial cells seeded onto PLLA. The cells in both groups were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum and 40 ng/ml glial cell line-derived neurotropic factor (GDNF) for 2 weeks. Colony assay was conducted on days 4, 7, 10 and 13 after the beginning of the culture. Expression of spermatogonial genes (*PLZF, BCL6, GFRα-1, VASA, Itgα6*) in the culture was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on the last day of the experiment.

Results: The viability rates of fresh cells before and after the addition of cryoprotectant agent were 87.4±2.4 and 81.8±3.1, respectively which decreased to 65±1.7 after the thawing ($P<0.01$). Moreover, the results showed that the surface area of colonies derived from spermatogonia were significantly greater in the treatment group compared to the control group on day 13 ($P<0.05$). Finally, RT-PCR revealed the expression of all spermatogonial stem cell (SSC) markers in both groups.

Conclusion: The PLLA nanofiber can provide a suitable microenvironment for frozen-thawed SSCs in an in vitro-culture system.

Keywords: Stem cell, Spermatogonia, Nanofiber, Freezing-thawing

* **Corresponding Author.**
Email: peymanrahimi@razi.ac.ir
Tel: 0098 83 383 22599
Fax: 0098 83 383 20041

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2015; Vol. 19, No 1, Pages 15-23

Please cite this article as: Rahimi-Feyli P, Tajik P, Shafiei Sh, Dodel M, Arbabi F. The effect of poly L-lactic acid nanofiber on the induction of colony formation of frozen-thawed bovine spermatogonial stem cells in vitro. ***Feyz*** 2015; 19(1): 15-23.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

تاثیر نانورشته پلی‌اِل‌لاکتیک اسید بر القاء کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-یخ‌گشایی شده گوساله در محیط آزمایشگاه

پیمان رحیمی‌فیلی[1*] ، پرویز تاجیک[2] ، شیوا شفیعی[3] ، معصومه دودل[4] ، فاطمه اربابی[5]

خلاصه:

سابقه و هدف: ایجاد شرایط بهینه جهت کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه، به کشف تمامی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در اسپرماتوژنز و دستورزی در ژن‌ها کمک شایانی می‌نماید. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر بررسی تاثیر داربست نانو-رشتهٔ پلی‌ال‌لاکتیک اسید بر تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-یخ‌گشایی‌شده گوساله در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: استخراج و تخلیص سلول‌ها از بیضه گوساله ۳ تا ۵ ماهه با روش هضم آنزیمی دو مرحله‌ای و حذف تمایزی صورت پذیرفت. سلول‌ها پس از انجماد و یخ‌گشایی در دو گروه مجزا کشت داده شدند: ۱- گروه شاهد: کشت سلول به‌صورت ساده ۲- گروه تیمار: کشت سلول‌ها بر روی نانورشته. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی FBS ۵ درصد و در حضور GDNF ۴۰ng/ml به-مدت ۲ هفته کشت داده شدند. ارزیابی کلونی‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ کشت صورت پذیرفت. بیان ژن‌های (*PLZF, GFRα-1, VASA, Itgα6, BCL6*) با روش RT-PCR در روز پایانی کشت در تمامی گروه‌ها ارزیابی شد.

نتایج: درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی و افزودن محلول انجماد به‌ترتیب ۸۷/۴±۲/۴ و ۸۱/۸±۳/۱ درصد بود که پس از یخ-گشایی این میزان به ۶۵±۱/۷ درصد کاهش یافت ($P<۰/۰۱$). مساحت کلونی‌های مشتق از اسپرماتوگونی گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد در روز ۱۳ افزایش معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). در پایان کشت تمامی ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی بیان شد.

نتیجه‌گیری: آن‌گونه که از نتایج حاصل از این مطالعه برمی‌آید نانورشته پلی‌ال‌لاکتیک اسید، ریزمحیطی مناسب در جهت کشت سلول-های منجمد- ذوب شده اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه فراهم می‌آورد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی، اسپرماتوگونی، نانورشته پلی ال-لاکتیک اسید، انجماد-یخ‌گشایی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴، صفحات ۲۳-۱۵

مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقطه آغاز فرآیند اسپرماتوژنز می‌باشند. این سلول‌ها در علوم مختلف از جمله: بیولوژی و بیوتکنولوژی (پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی) کاربردهای فراوانی دارند [۱]. انجام مطالعات در ابعاد سلولی و مولکولی اسپرماتوگونی همواره با مشکلاتی مثل کم‌تعداد بودن این جمعیت سلولی در میان سلول‌های زایای بیضه و مشکل در خالص‌سازی آن‌ها به‌دلیل نبود نشانگر سطحی اختصاصی سلول-های اسپرماتوگونی همراه است [۲]؛ از این‌رو ایجاد روشی کارا در جهت کشت و تکثیر این جمعیت سلولی در محیط آزمایشگاه بسیار مهم و حائز اهمیت است. امروزه کشت، انجماد و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روش جدیدی است که به کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل دخیل در ناباروری را بهتر بررسی نمود [۳]. هم‌چنین، کشت آزمایشگاهی این سلول‌ها به تولید حیوانات ترا-ریخته کمک می‌نماید [۴]. فراهم نمودن محیط کشتی که بتواند قدرت خودنوزایی و تزاید این سلول‌ها را در محیط آزمایشگاه زیاد کند از دو جهت حائز اهمیت می‌باشد: اول آنکه امکان دستورزی در ژن آن‌ها را زیاد می‌کند و دوم اینکه احتمال موفقیت تکنیک پیوند که تابعی از تعداد سلول‌هاست را افزایش می‌دهد [۵]. از آنجایی‌که به‌طور طبیعی ریز محیط (*Niche*) زندگی سلول‌های اسپرماتوگونی درون لوله‌های منی‌ساز به‌وسیله سلول‌های سوماتیک مختلف، غشاء پایه و ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌شود، می‌توان از ماتریکس خارج سلولی به‌عنوان یکی از راه-کارهای مناسب در جهت تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی بهره جست [۶]. ورود نانورشته‌ها به عرصه کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی تازگی دارد. داربست‌های نانو به‌واسطه ساختار رشته‌ای، متخلخل و نسبت بالای سطح به حجم، شباهت مورفولوژیکی

[1] استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

[2] استاد، گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[3] دانش‌آموخته دکتری تخصصی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[4] کارشناس بخش نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، تهران

[5] دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

* **نشانی نویسنده مسئول:**

کرمانشاه، بلوار کیهانشهر، روبروی پزشکی قانونی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

تلفن: ۰۸۳۳۸۳۲۲۵۹۹ **دورنویس:** ۰۸۳۳۸۳۲۰۰۴۱

پست الکترونیک: peymanrahimi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۶ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۱۱/۳۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

زیادی به ماتریکس خارج سلولی دارد؛ لذا، سبب چسبندگی، رشد، تکثیر بهتر و هم‌چنین پیش‌برد عملکرد سلول‌ها می‌شود [۷]. از جمله محاسنی که محیط‌های کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی دارند این است که سطح بیشتری را برای چسبندگی و در نتیجه تزاید این سلول‌ها فراهم می‌کنند [۸]. از آنجایی‌که نانوفیبرها پارامترهای سلولی از جمله شکل سلول، اسکلت سلولی اکتین و رسوب فیبرونکتین را تحت تاثیر قرار می‌دهند، کاملا محتمل است که محیط کشت‌های حاوی نانوفیبر بتوانند به‌واسطه‌ی فنوتیپ سلول‌های لایه تغذیه‌کننده، سلول‌های بنیادی را به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم تحت تاثیر قرار دهند [۹]. با توجه به پتانسیل گاو در تولید حیوانات تراریخته و تولید زیست‌داروها تاکنون مطالعات زیادی در مورد جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاوی انجام پذیرفته است [۱۲-۱۰]. هم‌چنین، تاثیر استفاده از نانوفیبر بر تکثیر و تمایز انواع سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های مغز استخوان، فیبروبلاست، سلول‌های پیش‌ساز عصبی و اسپرماتوگونی موش ارائه شده است. اصلاحی و همکاران اثرات موفقیت‌آمیز استفاده از نانوفیبر PLLA در تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را گزارش نموده‌اند [۱۳]. هم‌چنین، شاکری و همکاران با کشت سلول‌های اسپرماتوگونی موش به‌مدت ۱۰ روز بر روی ماتریکس نانوفیبر پلی‌آمیدی مشاهده کردند که تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه با نانوفیبر به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه بدون نانوفیبر می‌باشد [۱۴]. تاکنون تاثیر استفاده از نانورشته در کشت آزمایشگاهی اسپرماتوگونی گاو مورد بررسی قرار نگرفته است و لذا، پژوهش حاضر در راستای ایجاد محیط کشت بهینه آزمایشگاهی، و به‌منظور بررسی تاثیر نانورشته بر تکثیر سلول‌های منجمد-یخ گشایی شده اسپرماتوگونی گاوی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

جهت استخراج اسپرماتوگونی از ۵ راس گوساله نر ۳ تا ۵ ماهه نژاد هلشتاین در موسسه تحقیقات دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. این گوساله‌ها دارای جیره غذایی استاندارد بوده و از سلامت جسمانی کامل برخوردار بودند. محیط اطراف بیضه (Scrotal Circumference) این حیوانات تقریباً بین ۱۳ تا ۱۵ سانتی‌متر متغیر بود.

اخذ نمونه از بیضه

آرام‌بخشی با استفاده از زایلازین صورت گرفت. پس از آماده‌سازی موضع جراحی (Scrotum)، بی‌حسی موضعی با تزریق لیدوکایین به داخل طناب اسپرماتیک و زیر پوست ناحیه برش ایجاد شد. در ناحیه استوایی بیضه، برشی بر روی هر دو لایه تونیکا واژینالیس و در تونیکا آلبوجینا ایجاد شد. بافت بیرون زده از پارانشیم بیضه در ناحیه برش، به‌وسیله قیچی استریل برداشته شده (با ابعاد ۱×۱×۱ سانتی‌متر) و در محیط انتقالی (DMEM, GIBCO, UK) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS, Sigma, USA) و ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استرپتومایسین (GIBCO, UK) قرار گرفت. سپس، موضع جراحی بخیه گردید و درمان متعاقب جراحی (تجویز آنتی‌بیوتیک و ضد التهاب) اعمال شد. در هیچ‌یک از حیوانات مورد استفاده در این مطالعه مشکلی متعاقب جراحی مشاهده نگردید.

جداسازی سلول

نمونه اخذ شده از بیضه در محیط انتقالی درون لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری در مجاورت یخ، طی زمانی کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. سلول‌های تشکیل دهنده لوله-های منی‌ساز طی دو مرحله هضم آنزیمی بر اساس روشی که قبلا توسط van Pelt و همکاران [۱۵] توضیح داده شده، از نمونه استخراج گردید؛ به‌طور خلاصه، بافت بیضه پس از چندین بار شستشو در DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک تا حد ممکن به قطعات کوچک تقسیم شده و در DMEM حاوی آنتی بیوتیک و آنزیم-های 1 mg/ml collagenase type IV، 1 mg/ml hyaluronidase type II و 1 mg/ml trypsin (هر سه آنزیم محصول شرکت Sigma، آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت تقریبا ۶۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. طی مرحله اول هضم آنزیمی، لوله‌های منی‌ساز و در مرحله دوم، سلول‌های داخل لوله‌های منی‌ساز (به‌طور عمده سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی) استخراج گردید. سپس، سانتریفوژ به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰g صورت گرفت و مایع رویی که مخلوطی از سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و مایوید بود از فیلتر نایلونی ۵۵ میکرومتری عبور داده شد. با سانتریفوژ سوسپانسیون حاصله (۸۰۰g به‌مدت ۲ دقیقه)، سلول‌های انفرادی رسوب داده شد. رسوب سلولی به‌دست آمده در مقدار مناسب DMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۵ درصد سرم جنین گاو حل گردید.

انجماد سلول

انجماد بر اساس روش ایزدیار و همکاران انجام شد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

[۱۶]؛ بدین‌صورت که سوسپانسیون سلولی از قبل در حجم‌های ۰/۵ ml الیکوت و آماده شد. سپس، محلول انجماد که متشکل از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱/۴M دی-متیل سولفوکسید (Sigma-Aldrich, USA) و ۰/۰۷ M ساکاروز (Sigma-Aldrich, USA) و با غلظت ۲X مهیا شده بود، خیلی آرام طی ۱۵-۱۰ دقیقه به شکل قطره قطره به تعلیق سلولی اضافه شد و به لوله‌های انجماد (Cryovial, TPP, Switzerland) ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس لوله‌ها به-صورت خیلی آرام تکان داده شد تا محیط با سلول‌ها مخلوط شود و ارزیابی درصد حیات سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو ۰/۰۴ درصد و لام هموسیتومتر انجام شد. در مرحله بعد لوله انجماد به‌مدت ۱ ساعت در یخچال ۴° سانتی‌گراد، ۱ تا ۲ ساعت در فریزر ۲۰°- سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، به فریزر ۸۰°- سانتی‌گراد منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت به تانک نیتروژن مایع ۱۹۶°- سانتی‌گراد انتقال داده شد. جهت یخ‌گشایی تعلیق سلولی منجمد، لوله انجماد از تانک نیتروژن مایع خارج شد و به‌مدت ۲ دقیقه در بن ماری ۳۸° سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، آرام آرام روی تعلیق سلولی، محیط DMEM ریخته شده و به‌مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰۰ (معادل RPM ۳۲۰۰) سانتریفوژ شد و محیط رویی دور ریخته شد.

کشت سلول‌های استخراج شده

پس از شمارش، تعداد ۳۰۰ هزار سلول از سوسپانسیون مخلوط سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی در DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک و ۵ درصد سرم جنین گاو در ۲ چاهک از پلیت ۴ خانه مخصوص کشت سلول (TPP, Switzerland) در دمای ۳۷°c و حضور ۵ درصد CO_2 برای مدت ۲ هفته کشت داده شد. نکته قابل توضیح اینکه از روز قبل از کشت کف یکی از چاهک‌ها با نانورشته (پلی‌ال‌لاکتیک اسید؛ PLLA، Random وPlasma treated و سنتز شده با روش الکتروسپن) پوشانده شد. از ابتدای کشت، فاکتور رشد مورد نظر (ng/ml ۴۰GDNF) به گروه‌های آزمایشی اضافه شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۷۲ ساعت یک‌بار تعویض شد و فاکتور رشد مجددا اضافه می‌شد. در نتیجه سلول‌های گروه شاهد به‌صورت ساده و سلول‌های گروه آزمون بر روی نانورشته کشت داده شدند.

ارزیابی کلونی‌های مشتق از اسپرماتوگونی

تعداد و مساحت کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی (شکل شماره ۱)، در روزهای ۴، ۷ ، ۱۰ و ۱۳ پس از شروع کشت، به کمک میکروسکوپ معکوس (Olympus, IX71® inverted microscope) مجهز به عدسی چشمی مدرج بررسی شد. برای محاسبه مساحت کلونی‌ها از مساحت بیضی استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی

جهت ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های حاصل از کلونی‌های اسپرماتوگونی (*VASA*، *PLZF*، *BCl6*، *GFR-1* و *Itgα6*) از روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) استفاده شد و بیان ژن در سطح mRNA مطالعه گردید. طراحی پرایمر طبق مطالعات قبلی [۱۷،۱۰] انجام پذیرفت (جدول شماره ۱). در روز آخر کشت به‌منظور استخراج RNA، پس از تریپسینه کردن کلونی‌های اسپرماتوگونی درصد حیات ارزیابی شد و RNA با استفاده از کیت تجاری (RNA-SPIN™-INTRON, KOREA) استخراج گردید. عملیات استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس، با استفاده از دستگاه UV اسپکتروفتومتری غلظت نمونه‌ها بررسی شد. RT-PCR با استفاده از کیت تجاری (VeTeK™ ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit, INtRON, South Korea) و طبق دستورالعمل کیت و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BIORAD®, USA) انجام پذیرفت. جهت آشکارشدن بیان ژن‌ها از ژل آگاروز با غلظت ۱/۲ درصد در بافر TAE 1x استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از رنگ SYBER®Green انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در داخل هر چاهک ژل ریخته شد. به‌ترتیب از چپ به راست در داخل چاهک‌های هر ژل، Ladder، نمونه بدون RNA (کنترل منفی)، نمونه بافت بیضه به‌عنوان کنترل مثبت (توضیح: در هر بار نمونه‌گیری یک تکه از بافت بیضه به‌صورت جداگانه برای استخراج RNA استفاده شد و RNA استخراج شده تا روز آزمایش RT-PCR در فریزر نگهداری شد)، نمونه گروه شاهد و نمونه تیمار ریخته شد. مدت زمان الکتروفورز ژن به‌طور متوسط ۴۵ دقیقه بود. سپس، ژل با دستگاه ترانس لومینوتور (UVP, France) مورد ارزیابی قرار گرفت.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی وجود اختلاف بین گروه‌ها اطلاعات به‌دست آمده از ۵ نمونه‌گیری مستقل توسط آزمون آماری t استفاده شد. برای ارزیابی تاثیر محلول انجمادی بر زنده‌مان سلول‌ها از آزمون Repeated measure ANOVA استفاده شد. نرم افزار آماری مورد استفاده SPSS (version 16, SPSS Inc., Chicago, USA) بود و $P<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. تمامی اعداد و ارقام موجود در جداول به‌صورت (میانگین±خطای استاندارد Mean±SE) محاسبه شده است.

نتایج

میزان حیات سلول‌ها پس از جداسازی ۸۷/۴±۲/۴ درصد بود که پس از افزودن محلول انجماد و قبل از سرد کردن (آزمون میزان سَمیت محلول انجمادی) به ۸۱/۸±۳/۱ درصد رسید که تفاوت معنی‌داری با میزان حیات سلول‌های تازه نداشت. این امر دلیل بر عدم سمیت محلول انجماد می‌باشد. پس از یخ‌گشایی این میزان به ۶۵±۱/۷ درصد کاهش یافت که با میزان حیات سلول‌ها قبل و بعد از اضافه کردن محلول انجماد تفاوت معنی‌داری دارد ($P<۰/۰۱$).

تعداد کلونی‌های مشتق از سلول‌های اسپرماتوگونی

تعداد کلونی‌های مشتق شده از اسپرماتوگونی در گروه آزمون اگرچه در تمامی روزهای ارزیابی بیشتر از شاهد بود، اما در هیچ‌یک از روزها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول شماره ۲). مجموع مساحت کلونی‌های مشتق شده از اسپرماتوگونی در روز سیزدهم کشت در گروه آزمون (۰/۴۳±۰/۰۷ میلی‌متر مربع) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد (۰/۲±۰/۰۶ میلی‌متر مربع) بود ($P<۰/۰۵$). در بقیه روزها هم اگرچه مساحت کلونی‌ها در گروه آزمون بیش از شاهد بود، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نبود (جدول شماره ۳).

بررسی بیان ژن

آزمایش RT-PCR

برای اطمینان یافتن از ماهیت بنیادینگی سلول‌های کشت شده، بیان ۶ ژن در سطح mRNA بررسی شد و مشاهده گردید که تمامی ژن‌ها در سلول‌های کشت شده بیان گردیده‌اند (شکل شماره ۳).

جدول شماره ۱- نام و مشخصات پرایمر ژن‌های خاص سلول‌های زاینده و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مورد استفاده در مطالعه

نام ژن	Forward Primer (5′-3′)	Reverse Primer (5′-3′)	جفت باز (bp)	دمای آنیلینگ (C°)
VASA	TGCTACTCCTGGAAGACTGA	CGGTCTGCTGAACATCTCTA	۲۹۶	۵۷
PLZF	CCAGCAGATTCTGGAGTATGCA	GCATACAGCAGGTCATCCAAGTC	۷۵	۶۱
BCL6	AGGGCACAGGGAACTCTTTTC	CCTCCTTTGGCTTGAGTGTTTT	۱۱۶	۶۱
GFR1	CAAGTGGAGCACATCTCGAA	GGCAGGAACAGAAGAGCATC	۲۲۰	۶۰
ITGA6	AGGGATGTGGAGACGACAAC	TCTTTGGTGGGATTCTTTGG	۳۲۹	۶۰
GAPDH	TGACCCCTTCATTGACCTTC	TACTCAGCACCAGCATCACC	۱۸۰	۵۹

جدول شماره ۲- تعداد کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف

گروه	تعداد کلونی			
	روز ۴	روز ۷	روز ۱۰	روز ۱۳
شاهد	۱۰/۶۷±۴/۷۱	۱۶±۳/۴۶	۱۸/۶۷±۵/۲	۲۲±۵/۲۹
آزمون	۱۱/۳۳±۳/۱۸	۲۰±۲/۸۸	۲۵/۳۳±۶/۶۹	۳۲/۳۳±۴/۷

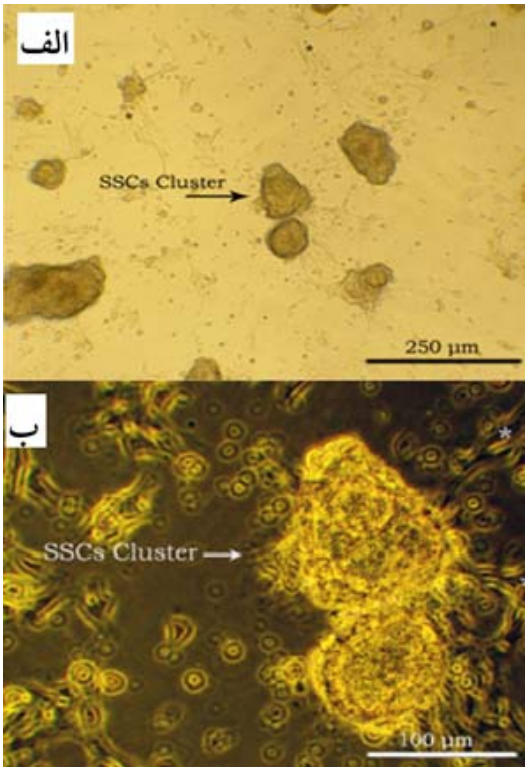
شاهد: کشت سلول به‌صورت معمولی؛ آزمون: کشت سلول بر روی نانورشته

جدول شماره ۳- مجموع مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد مطالعه در روزهای مختلف

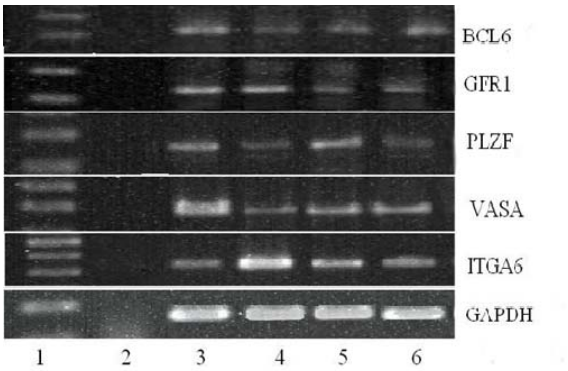
گروه	مجموع مساحت کلونی (mm^2)			
	روز ۴	روز ۷	روز ۱۰	روز ۱۳
شاهد	۰/۰۴±۰/۰۰۳	۰/۰۶±۰/۰۰۲	۰/۱۲±۰/۰۵	[a]۰/۲±۰/۰۶
آزمون	۰/۰۵±۰/۰۰۱	۰/۱۹±۰/۰۷	۰/۲۲±۰/۰۲	[b]۰/۴۳±۰/۰۷

* در داخل هر ستون، اختلاف آماری در بین اعداد دارای بالانویس متفاوت معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$) شاهد: کشت سلول به‌صورت معمولی، آزمون: کشت سلول بر روی نانورشته

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]



شکل شماره ۱-الف) تصویر مربوط به روز دهم کشت است. کلونی‌های اسپرماتوگونی بر روی لایه‌ای از سلول‌های سرتولی قرار گرفته‌اند. سلول‌های سرتولی با ایجاد ساختاری مناسب و ترشح فاکتورهای رشد و سایتوکین‌های مختلف نقشی بسیار مهم در رشد و تغذیه اسپرماتوگونی ایفا می‌کنند (میله: ۲۵۰ میکرومتر).
شکل شماره ۱-ب) تصویر قبلی با بزرگ‌نمایی بیشتر. پیکان: کلونی اسپرماتوگونی، ستاره: زوائد سلول‌های سرتولی (میله: ۱۰۰ میکرومتر).



شکل شماره ۲- بیان ژن‌های مربوط به سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد. ۱: Ladder؛ ۲: کنترل منفی (بدون RNA)؛ ۳: سلول تازه بلافاصله پس از جداسازی؛ ۴: بافت بیضهٔ تازه؛ ۵: گروه آزمون؛ و ۶: گروه شاهد

بحث

دست‌یابی به تکنیک‌های جدید جداسازی و کشت، مسیر-های منجر به تحقیقات نوین در زمینه بیولوژی سلول‌های بنیادی را هموارتر خواهد نمود و منتج به درک بیشتر ما از فیزیولوژی این سلول‌ها و توسعه تکنیک‌های جدید در این حوزه خواهد شد [۱۸]. راه‌های مختلفی به‌منظور دستیابی به خلوص بالاتر، بقا و تکثیر بهتر سلول‌ها به‌کار گرفته شده است؛ از جمله این راه‌کارها انتخاب سلول‌های اسپرماتوگونی حیوان نوزاد، افزودن فاکتورهای رشد به محیط کشت [۵]، به‌کارگیری بسترهای کشت متفاوت و ماتریکس-های برون سلولی مختلف [۱۹]، هم‌کشتی با لایه تغذیه‌کننده یا STO (6-thioguanine resistant ouabain resistant) [۲۰] و سرتولی [۲۱]، BEF (Bovine embryonic fibroblast) [۲۲]، افزودن سرم [۲۳]، استفاده از محیط‌های بدون سرم [۲۴] و غنی از پتاسیم یا KSOM (K simplex optimization medium) است [۲۵]. در همین رابطه اهمیت مولکول‌های تشکیل دهنده ماتریکس برون‌سلولی از دیدگاه بیولوژیکی در تکامل و رشد سلول در مطالعات آزمایشگاهی به‌خوبی نشان داده شده است. ورود نانورشته‌ها به عرصه کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی تازگی دارد. باتوجه به اینکه ساختار این داربست‌های نانویی شباهت ریخت‌شناسی زیادی به ماتریکس خارج سلولی دارد سبب چسبندگی، رشد، تکثیر و پیش‌برد بهتر عملکرد سلول‌ها می‌شود [۷]. دیده شده است که کشت سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت ۳ بعدی نانورشته سبب حفظ خاصیت تزاید و خودنوزایی این سلول‌ها شده است [۲۶]. تاکنون تاثیر نانورشته‌ها بر تزاید و تمایز سلول‌های بنیادی قلب [۲۷]، سلول‌های استئوبلاست [۲۸]، سلول‌های بنیادی جنینی [۲۹]، هپاتوسیت [۳۰] و سلول‌های پیش-ساز عصبی [۳۱] بررسی شده و نتایج تحقیقات بسیار موفقیت آمیز بوده است. اخیراً اصلاحی و همکاران با کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده و هم‌چنین سلول‌های حاصل از بیضه منجمد-ذوب شده موش بر روی نانورشته پلی‌ال‌لاکتیک اسید به‌مدت ۳ هفته نشان داده‌اند که این امر سبب افزایش کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش در محیط آزمایشگاه می‌شود [۱۳]. تفاوت جزیی در نتایج حاصل از مطالعه این محققان با مطالعه حاضر را می‌توان به طول مدت کشت (طول مدت کشت در مطالعه این محققان ۳ هفته و در مطالعه حاضر ۲ هفته می‌باشد)، تفاوت گونه‌ای (موش و گاو) و تفاوت غلظت GDNF (۱۰ و ۴۰ نانوگرم) عنوان کرد. در مطالعه حاضر با توجه به روند افزایشی تعداد کلونی‌ها در طول مدت آزمایش بالاخص در گروه تیمار، چه بسا با افزایش طول دوره کشت تعداد کلونی‌ها در گروه تیمار با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار پیدا می‌کرد. هم‌چنین، شاکری و همکاران گزارش کردند که کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه موش بر روی نانورشته اولترا وِب به‌مدت ۷ روز، تعداد کلونی‌ها،

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

تعداد سلول به ازای هر کلونی، میانگین مساحت کلونی و زنده‌مان را در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌دهد [۱۴]. احتمالا نانورشته به‌واسطه ساختار شبیه غشاء پایه و با ایجاد بر هم‌کنش مناسب سلولی و چسبندگی مناسب سلول به این داربست مسیر سیگنالی سلول را بهبود می‌بخشد [۱۴،۹]. دلیل تفاوت‌های جزیی این مطالعه با مطالعه حاضر را نیز می‌توان به تفاوت جنس نانوفیبر مورد استفاده در آزمایش نسبت داد. در مطالعه حاضر تعداد کلونی‌هایی که بر روی نانورشته کشت داده شد در تمامی روزها بیشتر از گروه شاهد بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. در عین حال مجموع مساحت کلونی‌های که بر روی نانورشته کشت داده شدند در روز ۱۳ کشت به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$). دلیل احتمالی این امر این است که تعداد زیادی از سلول‌های سرتولی که حامیان اصلی اسپرماتوگونی هستند، به‌دلیل حجم بالای سیتوپلاسم در اثر انجماد دچار مرگ سلولی می‌شوند. نانورشته به‌دلیل ساختار سه‌بعدی و متخلخل می‌تواند از رشد این سلول‌ها در حین کشت حمایت کند و در نتیجه با گذشت زمان محیط دلخواه رشد سلول‌های اسپرماتوگونی شکل می‌گیرد. همان‌طور که اشاره شد ساختار سه بعدی نانورشته در مقایسه با کشت ساده، شباهت بیشتری به اندام‌های طبیعی بدن دارد. از جمله محاسنی که محیط‌های کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی دارند این است که سطح بیشتری را برای چسبندگی و در نتیجه تزاید این سلول‌ها فراهم می‌کند [۸]. از آنجایی‌که نانورشته‌ها پارامترهای سلولی از جمله شکل سلول، اسکلت سلولی اکتین و رسوب فیبرونکتین را تحت تاثیر قرار می‌دهند، کاملا محتمل است که محیط کشت‌های حاوی نانورشته بتوانند به‌واسطه‌ی فنوتیپ سلول‌های لایه تغذیه کننده، سلول‌های بنیادی را به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم تحت تاثیر قرار دهند [۹]. توسعه و پیشرفت در تکنیک‌های کشت و انجماد آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حیوانات مزرعه‌ای لازمه انجام تکنیک پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی در این گونه‌ها می‌باشد. انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی امکان بقای طولانی‌مدت این سلول‌ها، بدون ایجاد اثرات مخرب آشکار بر عملکردشان را فراهم می‌سازد. انجماد بهترین روش برای حفظ طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است [۱۶]. در این مطالعه درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی از بافت بیضه ۸۷/۴±۲/۴ بود و پس از اضافه کردن محلول انجماد این میزان به ۸۱/۸±۳/۱ درصد رسید و گرچه روند کاهشی داشت، اما اختلاف معنی‌دار نبود و این نشان‌دهنده این است که محلول انجماد برای سلول‌ها حالت سمی نداشته است. به‌دلیل اینکه DMSO در دمای اتاق برای سلول‌ها حالت سمی دارد، لذا همیشه بایستی پس از اضافه کردن محلول انجماد درصد حیات را سنجید. اما پس از انجماد میزان حیات سلول‌ها به ۶۵±۱/۷ درصد رسید که تفاوت معنی‌داری با درصد حیات سلول‌های تازه داشت. معمولا در بهترین حالت درصد حیات ۷۰ درصد گزارش شده است [۱۶]. جهت اثبات بنیادینگی سلول‌های کشت شده و تایید وجود اسپرماتوگونی در میان سلول‌های کشت شده از روش RT-PCR بهره گرفته شد و بیان ژن‌ها در سطح mRNA بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده بیان کلیه ژن‌های مورد نظر (*VASA*، *GFRα-1*، *PLZF*، *Itgα6* و *Bcl6*) در تمام گروه‌ها بود. اگرچه تاکنون هیچ نشانگر اختصاصی جهت تشخیص قطعی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شناخته نشده است، اما بیان چند نشانگر مختلف اطلاعات مهمی را درباره انواع سلول‌های اسپرماتوگونی در مورد جوندگان و سایر گونه‌ها فراهم می‌کند [۳۲]. در این مطالعه سعی شد تا حد امکان از نشانگرهایی استفاده شود که در مجموع بتوان تا حد زیادی بیان آن‌ها را به سلول‌های اسپرماتوگونی تعمیم داد. نشانگر *VASA* مختص سلول‌های زایا می‌باشد. *Oct4* نیز نشانگر عمومی برای سلول‌های بنیادی می‌باشد [۳۳]. هم‌چنین بیان *Itgα6*، *PLZF* و *GFRα-1* در اسپرماتوگونی گاو اثبات شده است [۱۰]. هم‌چنین، دیده شده است که *Bcl6* نقشی بسیار مهم در خودنوزایی سلول‌های بنیادی ایفا می‌نماید [۱۷]. نکته حائز اهمیت در این مطالعه این است که طول مدت کشت در این مطالعه ۲ هفته بوده است و در تمامی روزها تعداد و مساحت کلونی‌های اسپرماتوگونی در گروه نانو بیشتر از شاهد بوده است (اگرچه این اختلاف معنی‌دار نبوده)، لذا امکان این امر وجود داشت که با افزایش طول دوره کشت (به‌طور مثال به‌مدت یک‌ماه) این اختلاف معنی‌دار شود. نویسندگان پیشنهاد می‌دهند مطالعات بعدی در خصوص کشت بلندمدت اسپرماتوگونی گاو بر روی نانورشته و با استفاده از فاکتور رشدهای مختلف سلولی طراحی شود و قضاوت در این خصوص تنها با تکیه بر این مطالعه تا حدود زیادی مشکل می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان به مفید بودن استفاده از نانورشته در تکثیر سلول‌های منجمد اسپرماتوگونی تا حدودی اذعان نمود. بااین‌وجود، نویسندگان انجام مطالعات تکمیلی در این خصوص را مفید می‌دانند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۱۳/۶/۷۵۰۸۰۱۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیریت محترم قطب کاربرد سلول بنیادی در سلول درمانی و مهندسی بافت دانشگاه تهران که هزینه انجام این طرح پژوهشی را متقبل شدند و هم‌چنین آقایان دکتر علی لکزیان، دکتر محمد زمانی، دکتر جواد راغ، مهندس موسوی و مهندس عیسی‌نژاد که در انجام نمونه‌گیری و کارهای عملی ما را یاری نمودند، کمال تشکر را به‌جا آورند.

References:

[1] Travis AJ, Kim Y, Meyers-Wallen V. Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. ***Reprod Domest Anim*** 2009: 44(2): 22-8.

[2] Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2011: 9: 141.

[3] Dym M, He Z, Jiang J, Pant D, Kokkinaki M. Spermatogonial stem cells: unlimited potential. ***Reprod Fertil Dev*** 2009: 21(1): 15-21.

[4] Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. ***Methods Cell Biol*** 2008: 86: 59-84.

[5] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2004:101(47): 16489-94.

[6] de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. ***Reproduction*** 2001:121(3): 347-54.

[7] Schindler M, Nur EKA, Ahmed I, Kamal J, Liu HY, Amor N, et al. Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. ***Cell Biochem Biophys*** 2006: 45(2): 215-27.

[8] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khadem-hosseini A, Kobayashi H. Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold. ***J Control Release*** 2007: 117(3): 380-6.

[9] Schindler M, Ahmed I, Kamal J, Nur EKA, Grafe TH, Young Chung H, et al. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture. ***Biomaterials*** 2005: 26(28): 5624-31.

[10] de Barros FR, Worst RA, Saurin GC, Mendes CM, Assumpcao ME, Visintin JA. alpha-6 integrin expression in bovine spermatogonial cells purified by discontinuous Percoll density gradient. ***Reprod Domest Anim*** 2012: 47(6): 887-90.

[11] Herrid M, Davey RJ, Hutton K, Colditz IG, Hill JR. A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. ***Reprod Fertil Dev*** 2009: 21(3): 393-9.

[12] Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. ***Reproduction*** 2008: 136(5): 543-57.

[13] Eslahi N, Hadjighassem MR, Joghataei MT, Mirzapour T, Bakhtiyari M, Shakeri M, et al. The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. ***Int J Nanomedicine*** 2013: 8: 4563-76.

[14] Shakeri M, Kohram H, Shahverdi A, Shahneh AZ, Tavakolifar F, Pirouz M, et al. Behavior of mouse spermatogonial stem-like cells on an electrospun nanofibrillar matrix. ***J Assist Reprod Genet*** 2013: 30(3): 325-32.

[15] vanPelt AMM, Morena AR, vanDisselEmiliani FMF, Boitani C, Gaemers IC, deRooij DG, et al. Isolation of the synchronized a spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. ***Biol Reprod*** 1996: 55(2): 439-44.

[16] Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. ***J Androl*** 2002: 23(4): 537-45.

[17] Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. ***Development*** 2012: 139(10): 1734-43.

[18] Meachem S, von Schonfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective. ***Reproduction*** 2001: 121(6): 825-34.

[19] Siu MK, Cheng CY. Extracellular matrix : recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. ***Biol Reprod*** 2004: 71(2): 375-91.

[20] Maekawa M, Nishimune Y. In-vitro proliferation of germ cells and supporting cells in the neonatal mouse testis. ***Cell Tissue Res*** 1991: 265(3): 551-4.

[21] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse sperma-togonial stem cell colony formation under several culture conditions. ***In Vitro Cell Dev Biol Anim*** 2009:45(5): 281-9.

[22] Oatley JM, Reeves JJ, McLean DJ. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. ***Biol Reprod*** 2004: 71(3): 942-7.

[23] Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. ***Tissue Cell*** 1998: 30(4): 389-97.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]

[24] Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. ***Reproduction*** 2002: 124(6): 791-9.
[25] Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. ***Biol Reprod*** 1999: 61(1) 225-30.
[26] Nur EKA, Ahmed I, Kamal J, Schindler M, Meiners S. Three-dimensional nanofibrillar surfaces promote self-renewal in mouse embryonic stem cells. ***Stem Cells*** 2006: 24(2): 426-33.
[27] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Hattori S, Matsuoka R, Kawaguchi N. Micro and nano-scale in vitro 3D culture system for cardiac stem cells. ***J Biomed Mater Res A*** 2010: 94(1): 1-8.
[28] Garreta E, Genove E, Borros S, Semino CE. Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold. ***Tissue Eng*** 2006: 12(8): 2215-27.
[29] Smith LA, Liu X, Hu J, Wang P, Ma PX. Enhancing osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells by nanofibers. ***Tissue Eng*** 2009: 15(7): 1855-64.
[30] Sun T, Chan ML, Quek CH, Yu H. Improving mechanical stability and density distribution of hepatocyte microcapsules by fibrin clot and gold nano-particles. ***J Biotechnol*** 2004: 111(2): 169-77.
[31] Xie J, Willerth SM, Li X, Macewan MR, Rader A, Sakiyama-Elbert SE, et al. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. ***Biomaterials*** 2009: 30(3): 354-62.
[32] Hermann BP, Sukhwani M, Hansel MC, Orwig KE. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? ***Reproduction*** 2010: 139(3): 479-93.
[33] Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. ***Dev Biol*** 2005: 279(1): 114-24.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-20]