

## 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<sup>1\*</sup>, Tajik P<sup>2</sup>, Shafiei Sh<sup>3</sup>, Dodel M<sup>4</sup>, Arbabi F<sup>5</sup>

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*, *Itga6*) 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  $87.4 \pm 2.4$  and  $81.8 \pm 3.1$ , respectively which decreased to  $65 \pm 1.7$  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.

# تأثیر نانورشته پلی‌ال‌لاکتیک اسید بر القاء کلول‌های اسپرماتوگونی منجمد- یخ‌گشایی شده گوساله در محیط آزمایشگاه

\*<sup>۱</sup> پیمان رحیمی‌فیلی ، پرویز تاجیک ، شیوا شفیعی ، مصصومه دودل ، فاطمه اربابی

## خلاصه:

سابقه و هدف: ایجاد شرایط بهینه جهت کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه، به کشف تمامی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در اسپرماتوژنر و دستورزی در ژن‌ها کمک شایانی می‌نماید. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر بررسی تاثیر داربست نانو-رشته پلی‌ال‌لاکتیک اسید بر تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-یخ‌گشایی شده 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 انجام و یخ‌گشایی در دو گروه مجزا کشت داده شدند: ۱- گروه شاهد: کشت سلول به صورت ساده ۲- گروه تیمار: کشت سلول‌ها بر روی نانورشته. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی FBS ۵ درصد و در حضور ۴۰ng/ml GDNF 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, Itga6, BCL6) با روش RT-PCR (RT-PCR) با روش پایانی کشت در تمامی گروه‌ها ارزیابی شد.

نتایج: درصد حیات سلول‌ها پس از جداسازی و افزودن محلول انجامد به ترتیب  $4\pm 2/4$  و  $87/4\pm 3/1$  و  $81/8\pm 3/1$  درصد بود که پس از یخ-گشایی این میزان به  $65\pm 1/1$  درصد کاهش یافت ( $P<0.01$ ). مساحت کلونی‌های مشتق از اسپرماتوگونی گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد در روز ۱۳ افزایش معنی‌دار داشت ( $P<0.05$ ). 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 سلول‌های منجمد-ذوب شده اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه فراهم می‌آورد.

**واژگان کلیدی:** سلول بنیادی، اسپرماتوگونی، نانورشته پلی‌ال‌لاکتیک اسید، انجام-یخ‌گشایی

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

## مقدمه

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقطه آغاز فرآیند اسپرماتوژنر می‌باشند. این سلول‌ها در علوم مختلف از جمله: بیولوژی و بیوتکنولوژی (پژوهشی، دامپزشکی و کشاورزی) کاربردهای فراوانی دارند [۱]. انجام مطالعات در ابعاد سلولی و مولکولی اسپرماتوگونی همواره با مشکلاتی مثل کم تعداد بودن این جمعیت سلولی در میان سلول‌های زیایی بیضه و مشکل در خالص‌سازی آن‌ها بدليل نبود نشان‌گر سطحی اختصاصی سلول‌های اسپرماتوگونی همراه است [۲]:

<sup>۱</sup> استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

<sup>۲</sup> استاد، گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۳</sup> دانش‌آموخته دکتری تخصصی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۴</sup> کارشناس بخش نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، مرکز تحقیقات فناوری بنیاده، تهران

<sup>۵</sup> دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

\***نشان نویسنده مسئول:**

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

تلفن: ۰۸۳ ۳۸۲۲۵۹۹

تلفن: ۰۸۳ ۳۸۲۲۰۰۴۱

پست الکترونیک: peymanrahimi@razi.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۱/۳۰

تاریخ دیافت: ۹۳/۰۷/۶

از این‌رو ایجاد روشی کارا در جهت کشت و تکثیر این جمعیت سلولی در محیط آزمایشگاه بسیار مهم و حائز اهمیت است. امروزه کشت، انجام و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روش جدیدی است که به کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل دخیل در تاباوری 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 تزايد 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 موقفيت تکنیک پیوند که تابعی از تعداد سلول‌های است را افزایش می‌دهد [۵]. از آنچایی که به طور 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 به عنوان یکی از راه‌کارهای 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 مورفو‌لولوژیکی

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 توئینیکا واژینالیس و در توئینیکا آلووجینا ایجاد شد. بافت پیرون زد از پارانشیم بیضه در ناحیه برش، بهوسیله قیچی استریل برداشته شده (با ابعاد  $1 \times 1 \times 1$  سانتی‌متر) و در محیط انتقالی (DMEM, FBS, GIBCO, UK) حاوی  $10$  درصد سرم جنین گاو (Sigma, USA) و  $100$  واحد در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و  $100$  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  $15$  میلی‌لیتری در مجاورت یخ، طی زمانی کمتر از  $2$  ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. سلول‌های تشکیل دهنده لوله‌های منی‌ساز طی دو مرحله هضم آنزیمی بر اساس روشی که قبل 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 آنتی‌بیوتیک و آنزیم-های  $1\text{ mg/ml}$  collagenase type IV  $1\text{ mg/ml}$  trypsin و hyaluronidase type II محصول شرکت Sigma، آمریکا در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت تقریباً  $60$  دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. طی مرحله اول هضم آنزیمی، لوله‌های منی‌ساز و در مرحله دوم، سلول‌های داخل لوله‌های منی‌ساز (بهطور عمدۀ سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی) استخراج گردید. سپس، ساتریفوژ به مدت  $5$  دقیقه با دور  $130\text{ g}$  صورت گرفت و مایع رویی که مخلوطی از سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و مایویید بود از فیلتر نایلونی  $55$  میکرومتری عبور داده شد. با ساتریفوژ سوسپانسیون حاصله ( $800\text{ g}$  به مدت  $2$  دقیقه)، سلول‌های انفرادی رسوب داده شد. رسوب سلولی به دست آمده در مقدار مناسب DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک و  $5$  درصد سرم جنین گاو حل گردید.

#### انجماد سلول

انجماد بر اساس روش ایزدیار و همکاران انجام شد

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 تزايد این سلول‌ها فراهم می‌کنند [۸]. از آنجایی که نانوفیبرها پارامترهای سلولی از جمله شکل سلول، اسکلت سلولی اکتن و رسوب فیبرونکتین را تحت تاثیر قرار می‌دهند، کاملاً محتمل است که محیط کشت‌های حاوی نانوفیبر بتوانند به‌واسطه فنوتیپ سلول‌های لایه تغذیه کننده، سلول‌های بنیادی را به صورت مستقیم و غیرمستقیم تحت تاثیر قرار دهند [۹] با توجه به پتانسیل گاو در تولید حیوانات ترازیخته و تولید زیست‌داروها تاکنون مطالعات زیادی در مورد جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گاوی انجام پذیرفته است [۱۰-۱۲]. 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 موقفيت‌آمیز استفاده از نانوفیبر PLLA در تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را گزارش نموده‌اند [۱۳]. هم‌چنین، شاکری و همکاران با کشت سلول‌های اسپرماتوگونی موش به مدت  $10$  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 نانورشه 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 نانورشه بر تکثیر سلول‌های منجمد-یخ گشایی شده اسپرماتوگونی گاوی انجام شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### حیوانات

جهت استخراج اسپرماتوگونی از  $5$  راس گوساله نر  $3$  تا  $5$  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  $13$  تا  $15$  سانتی‌متر متغیر بود.

#### أخذ نمونه از بیضه

آرام‌بخشی با استفاده از زایلازین صورت گرفت. پس از

ارزیابی کلونی‌های مشتق از اسپرما توگونی تعداد و مساحت کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرما توگونی (شکل شماره ۱)، در روزهای ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ پس (Olympus، مک میکروسکوپ معکوس IX71® inverted microscope) از شروع کشت، به کمک میکروسکوپ معکوس (Sigma-Aldrich، USA) ساکاروز (Sigma-Aldrich، USA) و با غلظت ۲X بود، خلی آرام طی ۱۰-۱۵ دقیقه به شکل قطره قطره به تعلق سلولی اضافه شد و به لوله‌های انجام (Switzerland ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس لوله‌ها به- بیضی استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های اسپرما توگونی جهت ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های حاصل از کلونی‌های اسپرما توگونی (*GFR-1*, *BCI6*, *PLZF*, *VASA*) و (*Itgα6*) از روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای mRNA پلی‌مراز (RT-PCR) استفاده شد و بیان ژن در سطح مطالعه گردید. طراحی پرایمر طبق مطالعات قبلی [۱۷، ۱۰] انجام پذیرفت (جدول شماره ۱). در روز آخر کشت به منظور استخراج RNA، پس از تریپسینه کردن کلونی‌های اسپرما توگونی درصد (RNA) با استفاده از کیت تجاری SPINTM-INTRON، KOREA استخراج گردید. عملیات استخراج طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس، با استفاده از RT-PCR با استفاده از کیت تجاری VeTeKTM ONE-STEP (RT-PCR PreMix Kit, INtRON, South Korea) دستورالعمل کیت و با استفاده از دستگاه ترموماسیکلر (BIORAD®, USA) انجام پذیرفت. جهت آشکارشدن بیان ژن‌ها از ژل آگاروز با غلظت ۱/۲ درصد در بافر TAE ۱x استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از رنگ SYBER® Green انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در داخل هر چاهک ژل ریخته شد. به ترتیب از چپ به راست در داخل چاهک‌های هر ژل، Ladder، نمونه بدون RNA (کنترل متفاوت)، نمونه بافت بیضه به عنوان کنترل مثبت (توضیح: در هر بار نمونه‌گیری یک تکه از بافت بیضه به صورت 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 به طور متوسط ۴۵ دقیقه بود. سپس، ژل با دستگاه ترانس لومینوتو (UVP, France)

[۱۶]؛ بدین صورت که سوسپانسیون سلولی از قبل در حجم‌های ۰/۵ ml الیکوت و آماده شد. سپس، محلول انجامد که مشتمل از محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱/۴M دی- متیل سولفونکسید (Sigma-Aldrich, USA) و ساکاروز (Sigma-Aldrich, USA) و با غلظت ۲X مهیا شده بود، خلی آرام طی ۱۰-۱۵ دقیقه به شکل قطره قطره به تعلق سلولی اضافه شد و به لوله‌های انجام (Switzerland ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس لوله‌ها به- صورت خلی 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 انجامد به مدت ۱ ساعت در یخچال ۴°C سانتی‌گراد، ۱ تا ۲ ساعت در فریزر -۲۰°C سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، به فریزر -۸۰°C سانتی‌گراد منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت به تانک نیتروژن مایع منجمد، لوله انجامد از تانک نیتروژن مایع خارج شد و به مدت ۲ دقیقه در بن ماری ۳۸°C سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، آرام آرام روی تعلیق سلولی، محیط DMEM ریخته شده و به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰۰ (معادل ۳۲۰۰ RPM) سانتریفوژ شد و محیط رویی دور ریخته شد.

#### کشت سلول‌های استخراج شده

پس از شمارش، تعداد ۳۰۰ هزار سلول از سوسپانسیون مخلوط سلول‌های اسپرما توگونی 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<sub>2</sub> 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) و Plasma treated و سنتز شده با روش الکتروسپین) 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 مجدد اضافه می‌شد. در نتیجه سلول‌های گروه شاهد به صورت ساده و سلول‌های گروه آزمون بر روی نانورشته کشت داده شدند.

## تجزیه و تحلیل آماری

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  $(43 \pm 0.07)$  میلی‌متر مربع به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد  $(2 \pm 0.06)$  میلی‌متر مربع بود ( $P < 0.05$ ). در بقیه روزها هم اگرچه مساحت کلونی‌ها در گروه آزمون بیش از شاهد بود، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نبود (جدول شماره ۳).

برای بررسی وجود اختلاف بین گروه‌ها اطلاعات به دست آمده از ۵ نمونه‌گیری مستقل توسط آزمون آماری t استفاده شد. برای ارزیابی تاثیر محلول انجام‌دادی بر زنده‌مان سلول‌ها از آزمون Repeated measure ANOVA (Chicago, USA) (SPSS Inc., version 16) مورد استفاده شد. نرم افزار SPSS Inc., (Chicago, USA) (version 16) میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SE) محاسبه شده است.

## نتایج

**بررسی بیان ژن RT-PCR آزمایش**  
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).

میزان حیات سلول‌ها پس از جداسازی  $87.4 \pm 2.4\%$  در صد بود که پس از افزودن محلول انجام‌داد و قبیل از سرد کردن (آزمون میزان سمیت محلول انجام‌دادی) به  $81.8 \pm 3.1\%$  در صد رسید که تفاوت معنی‌داری با میزان حیات سلول‌های تازه نداشت. این امر دلیل بر عدم سمیت محلول انجام‌داد می‌باشد. پس از بخ‌گشایی این میزان به  $65 \pm 1.7\%$  در صد کاهش یافت که با میزان حیات سلول‌ها قبل و بعد از اضافه کردن محلول انجام تفاوت معنی‌داری دارد ( $P < 0.01$ ).

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')	جهت باز (bp)	دماه آتبیلینگ (°C)
VASA	TGCTACTCCTGGAAAGACTGA	CGGTCTGCTAACATCTCA	۲۹۶	۵۷
PLZF	CCAGCAGATTCTGGAGTATGCA	GCATACAGCAGGTCATCCAAGTC	۷۵	۶۱
BCL6	AGGGCACAGGAACTCTTTC	CCTCCTTGGCTTGAGTGTGTTT	۱۱۶	۶۱
GFR1	CAAGTGGAGCACATCTGAA	GGCAGGAACAGAAGAGCATC	۲۲۰	۶۰
ITGA6	AGGGATGTGGAGACGACAAC	TCTTGGTGGATTCTTGG	۳۲۹	۶۰
GAPDH	TGACCCCTTCATTGACCTTC	TACTCAGCACCAGCATCACC	۱۸۰	۵۹

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

گروه	مجموع مساحت کلونی (mm <sup>2</sup> )
روز ۱۳	۴
روز ۱۰	۷
روز ۷	۰.۰۶ $\pm$ ۰.۰۰۲
روز ۰.۰۴ $\pm$ ۰.۰۰۳	۰.۰۴ $\pm$ ۰.۰۰۲
شاهد	۰.۰۱ $\pm$ ۰.۰۰۵
آزمون	۰.۰۱ $\pm$ ۰.۰۰۷

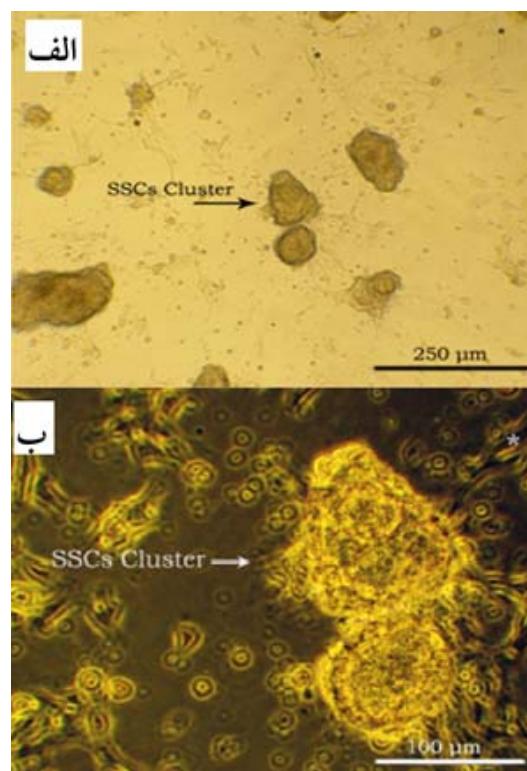
\* در داخل هر ستون، اختلاف آماری در بین اعداد دارای بالاونی متفاوت معنی‌دار است  
† شاهد: کشت سلول به صورت معمولی، آزمون: کشت سلول بر روی نانورشته

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

گروه	تعداد کلونی
روز ۱۳	۱۰
روز ۷	۴
روز ۰.۱۶ $\pm$ ۰.۰۶	۰.۱۶ $\pm$ ۰.۰۶
شاهد	۰.۲۲ $\pm$ ۰.۲۹
آزمون	۰.۱۱ $\pm$ ۰.۱۸

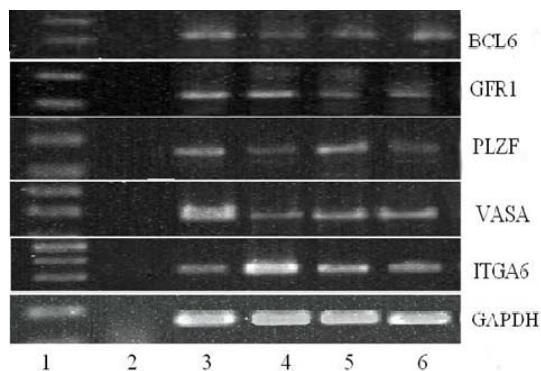
شاهد: کشت سلول به صورت معمولی؛ آزمون: کشت سلول بر روی نانورشته

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 به منظور دستیابی به خلوص بالاتر، بقا و تکثیر بهتر سلول‌ها به کار گرفته شده است؛ از جمله این راه‌کارها انتخاب سلول‌های اسپرماتوگونی حیوان نوزاد، افزودن فاکتورهای رشد به محیط کشت [۵]، به کارگیری بسترها کشت متفاوت و ماتریکس-های برون سلولی مختلف [۱۹]، هم‌کشتی با لایه تغذیه‌کننده یا [۲۰] (6-thioguanine resistant ouabain resistant) STO (Bovine embryonic fibroblast) BEF [۲۱]، استفاده از محیط‌های بدون سرم [۲۴] و (K simplex optimization KSOM) از پتانسیم یا medium) است [۲۵]. در همین رابطه اهمیت مولکول‌های تشکیل دهنده ماتریکس برون‌سلولی از دیدگاه بیولوژیکی در تکامل و رشد سلول در مطالعات آزمایشگاهی به خوبی نشان داده شده است. ورود نانورشته‌ها به عرصه کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی تازگی دارد. با توجه 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 جنبینی در محیط کشت ۳ بعدی نانورشته سبب حفظ خاصیت تزايد و خودنویزی این سلول‌ها شده است [۲۶]. تاکنون تاثیر نانورشته‌ها بر تزايد و تمایز سلول‌های بنیادی قلب [۲۷]، سلول‌های استئوبلاست [۲۸]، سلول‌های بنیادی جنبینی [۲۹]، هپاتوسيت [۳۰] و سلول‌های پیش‌ساز 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 پیشه منجمد-ذوب شده موش بر روی نانورشته پلی‌ال‌لاکتیک اسید به مدت ۳ هفته نشان داده‌اند که این امر سبب افزایش کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش در محیط آزمایشگاه می‌شود [۱۳]. تفاوت جزئی 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 بیشه موش بر روی نانورشته اولترا وب به مدت ۷ روز، تعداد کلونی‌ها،



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 بلافارسله پس از جداسازی؛ ۴: بافت بیضه 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

به دلیل اینکه DMSO در دمای اتاق برای سلول‌ها حالت سمی دارد، لذا همیشه بایستی پس از اضافه کردن محلول انجماد در صد حیات را سنجید. اما پس از انجماد میزان حیات سلول‌ها به  $65\pm1/7$  درصد رسید که تفاوت معنی‌داری با درصد حیات سلول‌های تازه داشت. عموماً در بهترین حالت درصد حیات  $70$  درصد گزارش شده است [۱۶]. جهت اثبات بنیادینگی سلول‌های کشت شده و تایید وجود اسپرماتوگونی در میان سلول‌های کشت شده از mRNA RT-PCR بهره گرفته شد و بیان ژن‌ها در سطح *VASA* بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده بیان کلیه ژن‌های مورد نظر (*VASA*, *RT-PCR*, *Itga6*, *PLZF*, *GFRα-1*, *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 نشان‌گرها برای استفاده شود که در مجموع بتوان تا حد زیادی بیان آن‌ها را به سلول‌های اسپرماتوگونی تعیین کرد. نشان‌گر *VASA* مختص سلول‌های زایا می‌باشد. *Oct4* نیز نشان‌گر عمومی برای سلول‌های بنیادی می‌باشد [۳۳]. هم‌چنین بیان *Itga6* و *PLZF* در اسپرماتوگونی *Bcl6* گاو اثبات شده است [۱۰]. هم‌چنین، دیده شده است که 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  $2$  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 (به طور مثال به مدت یک‌ماه) این اختلاف معنی‌دار شود. نویسنده‌گان پیشنهاد می‌دهند مطالعات بعدی در خصوص کشت بلندمدت اسپرماتوگونی گاو بر روی نانورشته و با استفاده از فاکتور رشدی‌های مختلف سلولی طراحی شود و قضایت 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. با این وجود، نویسنده‌گان انجام مطالعات تکمیلی در این خصوص را مفید می‌دانند.

تعداد سلول به ازای هر کلونی، میانگین مساحت کلونی و زنده‌مان را در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌دهد [۱۴]. احتمالاً نانورشته به‌واسطه ساختار شبیه غشاء پایه و با ایجاد بر هم کنش مناسب سلولی و چسبندگی مناسب سلول به این داریست مسیر سیگنالی سلول را بهبود می‌بخشد [۱۴,۹]. دلیل تفاوت‌های جزئی 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 کلونی‌هایی که بر روی نانورشته کشت داده شدند در روز  $13$  کشت به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ( $P<0.05$ ). دلیل احتمالی این امر این است که تعداد زیادی از سلول‌های سرتولی که حامیان اصلی اسپرماتوگونی هستند، به دلیل 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 محاسبتی که محیط‌های کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی دارند این است که سطح بیشتری را برای چسبندگی و در نتیجه تزايد این سلول‌ها فراهم می‌کند [۸]. از آنجایی که نانورشته‌ها پارامترهای سلولی از جمله شکل سلول، اسکلت سلولی اکتن و رسوپ فیبرونکتین را تحت تاثیر قرار می‌دهند، کاملاً محتمل است که محیط کشت‌های حاوی نانورشته بتواند به‌واسطه فنوئیپ سلول‌های لایه تغذیه کننده، سلول‌های بنیادی را به صورت مستقیم و غیرمستقیم تحت تاثیر قرار دهد [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  $87/4\pm2/4$  بود و پس از اضافه کردن محلول انجماد این میزان به  $81/8\pm3/1$  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.

هزینه انجام این طرح پژوهشی را متقابل شدند و همچنین آقایان دکتر علی لکزیان، دکتر محمد زمانی، دکتر جواد راغ، مهندس موسوی و مهندس عیسی نژاد که در انجام نمونه گیری و کارهای عملی ما را یاری نمودند، کمال تشکر را به جا آورند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۱۳/۶/۷۵۰۸۰۱۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه تهران می باشد. نویسندها بر خود لازم می دانند از مدیریت محترم قطب کاربرد سلول بنیادی در سلول درمانی و مهندسی بافت دانشگاه تهران که

### 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, Khademhosseini 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-Rijssenbilt 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, Arfaei AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial 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.

- [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.