

تأثیر اسکافولد نانوفایبر PLLA بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد - ذوب شده موش نابالغ

ندا اصلاحی **M.Sc.**، محمودرضا حاجی قاسم **Ph.D.**، مهرداد بختیاری **Ph.D.**، محمدتقی جغتایی **Ph.D.**،
محمود ایوبیان **Ph.D.**، محمد حسین اسدی **Ph.D.**، سید مرتضی گروجی **Ph.D.**

* گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

*** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آذر ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی تأثیر اسکافولد نانوفایبر PLLA بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد - ذوب شده موش نابالغ

مواد و روش‌ها: سلول‌های اسپرماتوگونی از موش ۶-۳ روزه با دو مرحله هضم آنزیمی جدا و با روش حذف تمایزی خالص‌سازی گردید. سلول‌های جدا شده در چهار گروه کشت داده شدند: ۱- کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی تازه، ۲- سلول‌های اسپرماتوگونی تازه روی نانوفایبر PLLA، ۳- کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده، ۴- سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد- ذوب شده روی نانوفایبر PLLA. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد FCS و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF به مدت سه هفته کشت شدند. طی مدت کشت تعداد و قطر کلونی‌ها بررسی شد. پس از سه هفته، حضور سلول‌های اسپرماتوگونی در کلونی‌ها به وسیله RT-PCR برای ژن‌های *PLZF*، *Oct4*، *GFR α -1*، *VASA*، *ITGA6*، *ITGB1* ارزیابی و به‌طور نیمه کمی نیز بررسی شد. معنی‌داری میان گروه‌ها به کمک آزمون‌های آماری Repeated measures و ANOVA تعیین شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که درصد حیات سلول‌ها در گروه سلول تازه (گروه کنترل ۱ و آزمون ۱) $2/2 \pm 25/89$ و در گروه سلول منجمد $3/56 \pm 63$ بود که درصد حیات این سلول‌ها نسبت به گروه سلول تازه به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p \leq 0/001$). تعداد کلونی‌های حاصل از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی روی نانوفایبر PLLA (گروه آزمون ۱ و آزمون ۲) در مقایسه با گروه‌های کنترل (گروه کنترل ۱ و کنترل ۲) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0/001$). همچنین قطر کلونی‌ها در گروه آزمون ۱ (کشت سلول‌های تازه بدون نانوفایبر) نسبت به گروه کنترل ۱ (کشت سلول‌های تازه بدون نانوفایبر) اختلاف معنی‌داری نداشت ولی در گروه آزمون ۲ (کشت سلول‌های منجمد- ذوب شده روی نانوفایبر) نسبت به گروه کنترل ۲ (کشت سلول‌های تازه روی نانوفایبر) کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0/01$). در پایان کشت تمامی ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی بیان شدند ولی کاهش معنی‌داری در بیان نسبی برخی ژن‌های اسپرماتوگونی در کشت سلول‌های منجمد- ذوب شده روی نانوفایبر دیده شد.

نتیجه‌گیری: نانوفایبر PLLA باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تازه و منجمد-ذوب شده در محیط کشت می‌شود ولی بر میزان نسبی بیان ژن‌های اسپرماتوگونی اثری ندارد.

کلید واژه‌ها: نانوفایبر PLLA، سلول بنیادی اسپرماتوگونی، انجماد

✉ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی،

Email: Skoruji@tums.ac.ir

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۵۹۸۳

مقدمه

اسپرماتوژنز یک فرایند پویا است که در آن اسپرماتوگونی دیپلوئید تحت ۱۰ تقسیم میتوز و ۲ تقسیم میوز تبدیل به اسپرماتوزوای هاپلوئید می‌شود [۱]. این فرایند از بلوغ شروع شده و تا پایان عمر ادامه دارد که در موش ۳۵ روز و در انسان ۶۴ روز است [۲]. اسپرماتوگونی‌ها روی غشای پایه لوله‌های منی ساز قرار دارند، بنابراین در همان محل تقسیم و تمایز می‌یابند. آن‌ها درصد خیلی کمی از سلول‌های بیضه را تشکیل می‌دهند. از 10^6 سلول در بیضه موش، تقریباً 10^4 عدد از آن، سلول بنیادی است [۳]. امروزه کشت سلول‌های اسپرماتوگونی، انجماد و پیوند آن‌ها راه جدیدی است که به کمک آن می‌توان بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و عوامل مؤثر در ناباروری را بهتر مورد مطالعه قرار داد [۴]. روش انجماد بهترین روش برای نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. برای افزایش میزان زنده ماندن سلول‌ها مطالعات زیادی صورت گرفته و ضد یخ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این بررسی‌ها نشان داده که دی متیل سولفوکسید (DMSO; Dimethyl sulfoxide) برای انجماد سلول اسپرماتوگونی بهتر است و بعد از انجماد بیشتر سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها زنده می‌مانند [۵]. از طرفی؛ میزان موفقیت پیوند بستگی زیادی به تعداد سلول پیوندی دارد [۶]. بنابراین تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه زمینه مناسبی را در درمان ناباروری به وجود خواهد آورد.

استفاده از داربست‌ها برای کاشت سلول‌ها در سال ۱۹۹۰ توسط ناتون و همکارانش انجام شد [۷]. ویژگی‌های داربست‌ها شبیه به ماتریکس خارج سلولی است که نقش مهم در سیگنال‌های فیزیکی و شیمیایی تکثیر دارد [۸]. این ماده زمینه یا

ماتریکس خارج سلولی دارای پروتئین‌هایی مثل کلاژن [۹ و ۱۰]، فیبرونکتین [۱۱] و ژلاتین [۱۲] است. اخیراً در برخی مطالعات شواهدی مبنی بر این موضوع که ماتریکس‌های خارج سلولی از جمله فیبرونکتین و لامینین می‌تواند به‌عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول‌های بنیادی استفاده شود و خاصیت خودنوزایی در این سلول‌ها را تقویت نماید، مطرح شده است [۱۳]. علاوه بر این دیده شده است که استفاده از محیط کشت پوشیده با لامینین سبب افزایش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاه در موش و انسان می‌شود [۱۵-۱۳].

تاکنون گزارش‌های بسیاری در مورد اثر نانو فایبرها بر تمایز و تکثیر انواع سلول‌های بنیادی ارایه شده‌است. تاکنون سلول‌های استرومایی مغز استخوان را روی اسکافولد PLLA کشت شد و تکثیر سلولی مشاهده شد [۱۶ و ۱۷]. همچنین فیبروبلاست‌ها و استئوبلاست‌های جمجمه رت نیز روی PLLA کشت و تکثیر شدند [۱۸]. زی (Xie) و همکاران برای ترمیم عصبی بهتر از سلول‌های پیش‌ساز عصبی به همراه نانوفیبرها استفاده کردند و نتایج معنی‌داری مشاهده نمودند [۱۹]. سایت (Sait) و همکاران از اسکافولد PLLA که poly (L-lactic acid) است برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان به هیپاتوسیت‌ها استفاده کردند و تمایز هشت تا هجده برابر را نسبت به گروه بدون نانوفایبر مشاهده کردند [۲۰]. اسمیت (Smith) و همکاران میزان تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی را روی نانوفیبرهای ماتریکسی و ورقه‌های صاف بررسی کردند [۲۱]. نتایج آنان نشان داد که بعد از ۲۶ روز میزان تکثیر و تمایز سلول‌ها روی نانوفیبرها به‌طور معنی‌داری بیشتر از ورقه‌های صاف بود.

در این تحقیق با توجه به اهمیت کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و کاربرد روز افزون و آثار متفاوت نانوفایبرها

سرعت ۳۰۰g (معادل ۱۲۰۰RPM) سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ محیط بالای رسوب ته لوله با محیط DMEM تازه جایگزین شد. این کار باعث حذف بافت بینابینی، از قطعات بیضه شد و قطعات لوله‌های منی‌ساز که حاصل اولین مرحله از هضم آنزیمی بودند وارد مرحله دوم هضم آنزیمی شدند. قطعات لوله‌های منی‌ساز حاصل از اولین مرحله هضم آنزیمی، برای هضم بیشتر و جداسدن سلول‌ها از قطعات لوله‌های منی‌ساز، در محیطی مشابه مرحله اول، این قطعات به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. طی این مدت یک بار، محلول فوق توسط سمپلر و به مدت یک دقیقه به طور کامل هم زده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون مجدداً به مدت ۳ تا ۵ دقیقه به کمک پیست کردن و سمپلر تجمعات سلولی موجود در تعلیق تا حد امکان خرد شدند. سپس تعلیق فوق برای جداسازی قطعات هضم نشده با سرعت ۳۰g (معادل ۴۰۰RPM) سانتریفوژ شد. قطعات هضم نشده لوله‌های منی‌ساز در ته لوله رسوب کرده و سلول‌های منفرد و برخی از تجمعات سلولی در بالای تعلیق قرار گرفت. سوپ سلولی بالای رسوب پس از عبور از فیلترهای نایلونی ۷۰ میکرومتری با یکبار سانتریفوژ کردن شستشو شد. تعلیق حاصل اغلب حاوی سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی و تعداد کمی سلول‌های بافت بینابینی بود.

به منظور خالص‌سازی از روش differential plating استفاده شد که در این روش سلول‌های بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت ۱۰ درصد سرم کشت شد. سلول‌های سوماتیک (سرتولی، فیبروبلاست و میویدی) در این مدت به کف ظرف می‌چسبند. سلول‌های باقیمانده و سلول‌های نجسبیده به ته ظرف از محلول خارج شد. سلول‌ها مجدداً کشت و محیط کشت حاوی ۰.۵٪ سرم و GDNF 10ng/ml نوترکیب موشی (Invitrogen Tech-line, USA) به آن اضافه شد. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی به کمک یک لام نئوبار شمارش شد. درصد حیات سلول‌ها به کمک محلول ۰/۰۴ درصد تریپان بلو ارزیابی شد.

بر سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نابالغ تازه و منجمد-ذوب شده به مدت سه هفته روی نانوفیبر PLLA کشت و ارزیابی شدند.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه از موش‌های نوزاد شش روزه نر نژاد NMRI برای برداشت سلول استفاده شد. موش‌های مادر پس از خریداری از مؤسسه رازی کرج در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی تهران تحت شرایط مناسب نور و تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از زایمان نوزادهای نر ۳ تا ۶ روزه مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی

از بیضه‌های تعداد ۱۰۰ سر موش نوزاد ۳-۶ روزه نژاد NMRI برای جداسازی سلول، استفاده شد. برای هر بار جداسازی سلول در هریک از گروه‌ها، بیضه‌های حداقل ۵ سر موش نوزاد استفاده شد. بیضه‌ها پس از جداسازی از حیوان تا انتقال آن‌ها به محیط کشت برای شستشو روی یخ نگهداری شدند. بعد از شستشو در PBS و محیط کشت DMEM (Gibco, Paisley, UK) کپسول بیضه جدا شد و سپس به محیط کشت DMEM حاوی کلاژناز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma, St. Louis, MO, USA)، تریپسین یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma, St. Louis, MO, USA)، هیالورونیداز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sigma, St. Louis, MO, USA). (تمامی آنزیم‌ها از شرکت سیگما خریداری شده است)، برای اولین مرحله هضم آنزیمی منتقل شد. در این مرحله بیضه‌های بدون کپسول در محیط کشت حاوی آنزیم به طور مکانیکی قطعه قطعه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. طی این مدت هر ۱۰ دقیقه یک بار محلول به آرامی توسط سمپلر و به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. پس از طی این مرحله، محیط حاوی سلول‌ها و قطعات لوله‌های منی‌ساز، به مدت ۱ دقیقه با

هضم آنزیمی بیضه تازه به مدت سه هفته روی اسکافولد نانوفایبر در حضور محیط DMEM دارای ۵ درصد سرم و فاکتور رشد GDNF، در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

انجماد سلول‌ها به روش انجمادی ایزدیار (Izadyar) و همکاران انجام شد [۵۵]. بلافاصله بعد از جداسازی سلول‌ها، درصد حیات آن‌ها بررسی شد. سپس در حالی که سلول‌ها روی یخ قرار داشتند تا شروع مراحل بعدی در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر تعلیق سلولی به یک ویال انجمادی ۱/۸ میلی‌لیتر (Cryovial, Nunc, Denmark) منتقل شد. به همان حجم تعلیق سلولی، محلول انجمادی (۱۰٪ (v/v) دی‌متیل سولفوکسید (DMSO Sigma, USA)، ۱۰٪ (v/v) سرم (FCS) ۰/۰۷M ساکارز در محیط کشت DMEM) به شکل قطره قطره (در طی ۱۵-۱۰ دقیقه) اضافه شد. سپس محلول انجمادی با تعلیق سلولی به طور کامل مخلوط شد. در این مرحله نیز درصد حیات سلول‌ها ارزیابی شد. ویال انجمادی حاوی تعلیق سلولی و محلول انجمادی برای مدت ۲۴ ساعت به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. بعد از ۲۴ ساعت، ویال‌های انجمادی برای نگهداری طولانی مدت در نیتروژن مایع غوطه ور شدند. ویال‌ها بعد از نیتروژن مایع به حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲ دقیقه منتقل شد. پس از انتقال محتویات ویال به یک لوله استریل، دو حجم محیط DMEM دارای ۵ درصد سرم به شکل قطره قطره به آن اضافه شد. سپس تعلیق رقیق شده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰g (معادل ۳۲۰ RPM) سانتریفوژ شد و رسوب ایجاد شده در ته لوله به محیط DMEM دارای سرم آلبومین گاوی منتقل شد. پس از شمارش سلول‌ها درصد حیات آن‌ها ارزیابی شد. تعلیق سلولی ذوب شده برای کشت استفاده شد.

کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

در این تحقیق سلول‌های اسپرماتوگونی به دست آمده در چهار گروه مورد مطالعه (کشت ساده یا کشت روی رشته‌های نانو خریداری شده از شرکت بن یاخته، به مدت سه هفته در شرایط آزمایشگاه در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GDNF و ۵ درصد (Gibco) کشت داده شدند. هر گروه آزمایشی ۴ بار تکرار شد.

گروه‌های آزمایش عبارت بود از:

کنترل ۱: کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه

سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از هضم آنزیمی بیضه تازه به مدت سه هفته در حضور محیط DMEM دارای ۵ درصد سرم و فاکتور رشد GDNF، در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

آزمون ۱: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه، کشت روی رشته‌های نانو

سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از هضم آنزیمی بیضه تازه به مدت سه هفته روی اسکافولد نانوفایبر در حضور محیط DMEM دارای ۵ درصد سرم و فاکتور رشد GDNF، در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

کنترل ۲: کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده حاصل از بیضه تازه

سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده حاصل از هضم آنزیمی بیضه تازه به مدت سه هفته در حضور محیط DMEM دارای ۵ درصد سرم و فاکتور رشد GDNF، در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

آزمون ۲: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده حاصل از بیضه تازه، کشت روی رشته‌های نانو

سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده حاصل از

جدول ۱. نام و مشخصات پرایمر ژن‌های خاص سلول‌های زاینده و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و ژن (housekeeping) GAPDH در RT-PCR

اندازه (جفت باز)	دمای آنلینگ (°C)	توالی پرایمر (3'-5')	نام ژن
۱۴۹	۵۹-۶۰	F: 5' GAT AAT CAT TTA GCA CAG CCT C 3' R: 5' GTC AAC AGA TGC AAA CAC AG 3'	<i>Mvh</i> (<i>VASA</i>)
۱۴۸	۶۰	F: 5' CTC AGA ATA TCA AGC TCC CT 3' R: 5' AAA CAC TAA TAG AGC CAG CA 3'	<i>ITGa6</i>
۱۳۰	۶۰	F: 5' AAT TGT CTG CGT ATC TAC TGG 3' R: 5' ACA TCT GAT ATG AAC GGG AC 3'	<i>GFRa-1</i>
۱۱۵	۶۰	F: 5' GAC ATT ACT CAG ATC CAA CCA 3' R: 5' AGG TAG TAG AGA TCA ATA GGG T 3'	<i>ITGB1</i>
۱۲۹	۶۰	F: 5' GAA CTA GCA TTG AGA ACC GT 3' R: 5' CAT ACT CGA ACC ACA TCC TTC 3'	<i>Oct4</i>
۱۳۷	۶۱	F: 5' CCCGTTGGGGGTCAGC TAGAA3' R: 5' CTGCAAGGTGGGGCGG TGTA3'	<i>PLZF</i>
۱۲۵	۶۰	F: 5' CAA CTC CCA CTC TTC CAC TT3' R: 5' GCA GCG AAC TTT ATT GAT GGT A 3'	<i>GAPDH</i>

مقایسه نیمه کمی ژن‌ها

برای مقایسه کیفی میان ژن‌ها، از هر پرایمر برای تمام گروه‌های RNA استخراج شده، سه بار تکرار انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (Gibco) و به وسیله gel red آنالیز شد. RT-PCR برای ژن‌های اختصاصی اسپرماتوگونی شامل *PLZF*, *Oct4*, *GFRa-1*, *VASA*, *IGA6*، و *IGBI* انجام و نسبت بیان هر کدام به *GBDH* بررسی شد. PCR برای هر کدام از ژن‌ها سه بار انجام شد.

انجماد و ذوب سلول‌های اسپرماتوگونی

ارزیابی کلونی‌ها

ارزیابی کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در پایان هفته‌های اول، دوم و سوم از نظر تعداد و قطر کلونی‌ها ارزیابی انجام شد. عکس برداری از کلونی‌ها به وسیله میکروسکوپ معکوس (Ziess, Germany) مجهز به دوربین، انجام گرفت. سپس با نرم افزار Image J قطر آن‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از حداقل ۴ بار تکرار برای محاسبه میانگین و انحراف معیار استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های حاصل از کلونی‌های اسپرماتوگونی (*PLZF*, *Oct4*, *GFRa-1*, *VASA*, *ITGA6*، *ITGB1*) همچنین ارزیابی پرایمرهای طراحی شده مربوط به رونوشت‌های (transcripts) خاص سلول‌های زاینده (جدول ۱) از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (RT-PCR) استفاده شد. بیان ژن در سطح mRNA مطالعه شد. برای این منظور سلول‌های مشتق از کلونی‌های کشت شده بعد از سه هفته کشت از تمامی گروه‌ها (به‌عنوان تیمارهای مورد آزمایش)، سلول‌های اسپرماتوگونی بلافاصله پس از هضم آنزیمی و بافت بیضه موش نوزاد (به‌عنوان کنترل مثبت) بررسی شد. برای انجام RT-PCR، ابتدا استخراج RNA از نمونه‌ها طبق کیت کیاژن (ساخت کشور آلمان) انجام شد و سپس با استفاده از دستگاه UV اسپکتروفتومتری غلظت آن‌ها بررسی شد. در مرحله بعد ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده با استفاده از کیت کیاژن صورت گرفت؛ سپس PCR ژن‌های مورد نظر با استفاده از کیت fermentas (ساخت کشور بلاروس) انجام شد و در نهایت برای بررسی کیفیت محصول RNA و بررسی محصول واکنشی PCR از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

بررسی آماری

تجزیه و تحلیل اطلاعات آماری برای تعیین بهینه سازی شرایط و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه به کمک آزمون Repeated measure و ANOVA (به همراه آزمون تکمیلی Tukey-test) و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. معنی‌داری در حدود $p \leq 0.05$ تعیین شد.

یافته‌ها

بررسی درصد حیات سلول‌ها پس از انجماد و

جداسازی

در گروه کنترل ۱ و آزمون ۱ پس از جداسازی بیضه از موش نابالغ ۶ روزه، طی دو مرحله هضم آنزیمی ابتدا بافت بینابینی حذف شد و در مرحله دوم تحت تأثیر آنزیم‌ها، لوله‌های منی‌ساز به شکل تعلیقی از سلول‌های ژرم در آمد و به مدت سه هفته کشت شدند. همان‌گونه که در جدول ۲ دیده می‌شود، درصد حیات سلول‌ها در این گروه، پس از جداسازی سلول‌ها و قبل از شروع کشت $89/25 \pm 2/2$ بود. در گروه کنترل ۲ و آزمون ۲ پس از جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی به کمک دو مرحله هضم آنزیمی سلول‌ها با روش ایزدیار و همکاران در محلول انجمادی منجمد شد و پس از ذوب، به مدت ۳ هفته کشت شدند. پس از ذوب و قبل از شروع کشت، درصد حیات سلول‌ها در این گروه $63 \pm 3/56$ بود. درصد حیات این سلول‌ها نسبت به گروه سلول تازه به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0.001$).

درصد حیات سلول‌های تازه پس از فرآیند جداسازی آنزیمی $89/25 \pm 2/2$ بود. این میزان پس از قراردعی آن‌ها در محلول انجمادی و قبل از آغاز سرد کردن (آزمون سمیت محلول انجمادی) کاهش یافت و به $82/5 \pm 4/2$ رسید که تفاوت معنی‌داری با درصد حیات سلول‌های جدا شده نداشت. این نشان داد که محلول انجمادی اثر سمی قابل ملاحظه‌ای بر حیات سلول‌ها ندارد.

جدول ۲. میزان حیات سلول‌ها پس از جداسازی و انجماد-ذوب سلول‌ها

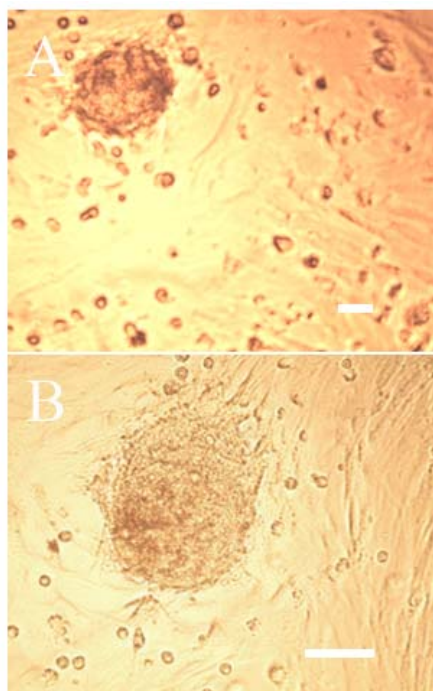
درصد حیات	گروه‌های آزمایش
$89/25 \pm 2/2$	کنترل ۱ و آزمون ۱ (سلول تازه)
$82/5 \pm 4/2$	تست سمیت محلول انجمادی
$63 \pm 3/56^*$	کنترل ۲ و آزمون ۲ (سلول منجمد-ذوب شده)

*: نسبت به گروه سلول‌های تازه معنی دار است. ($p \leq 0.001$)

بررسی تعداد کلونی‌های سلول‌های

اسپرماتوگونی در گروه‌ها

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت قادر به کلونی‌زایی هستند و ریخت‌شناسی این کلونی‌ها تفاوت چندانی با یکدیگر نداشت (شکل ۱). پس از شمارش کلونی‌ها طی کشت میانگین تعداد کلونی‌ها در چهار گروه با یکدیگر مقایسه شد:



شکل ۱. نمونه‌ای از مورفولوژی کلونی‌های بدست آمده از A: کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه (بار: ۳۰ میکرومتر) و B: کشت ساده سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده حاصل از بیضه تازه (بار: ۳۰ میکرومتر)

آزمون ۲، $35/75 \pm 2/5$ بود.

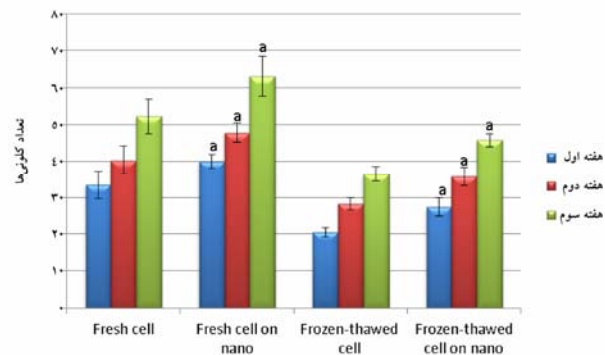
برای بررسی آثار نانو گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) مقایسه شدند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون (کشت روی نانو) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های بدون نانو داشتند. ($p \leq 0.001$) برای بررسی آثار انجماد گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) هر یک به‌طور جداگانه مقایسه شدند. گروه کنترل ۲ نسبت به گروه کنترل ۱ و گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱ کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.001$).

در پایان هفته سوم تعداد کلونی‌ها در گروه کنترل ۱، $36/5 \pm 1/91$ ، آزمون ۲، کنترل ۱، $63 \pm 5/35$ ، آزمون ۱، $52/25 \pm 4/65$ ، آزمون ۲، $45/75 \pm 1/71$ بود. برای بررسی آثار نانو گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) مقایسه شدند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون (کشت روی نانو) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های بدون نانو داشت ($p \leq 0.001$). برای بررسی آثار انجماد گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) هر یک به‌طور جداگانه مقایسه شدند. گروه کنترل ۲ نسبت به گروه کنترل ۱ ($p \leq 0.001$) و گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱ کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.001$).

بررسی قطر کلونی‌ها در گروه‌های کنترل و آزمون

بطور کلی در بررسی قطر کلونی‌ها در گروه‌های کنترل و آزمون تفاوت معنی‌داری در بین هفته‌ها مختلف مشاهده نشد؛ اگر چه این اختلاف در بین گروه‌ها معنی‌دار است. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود قطر کلونی‌ها در گروه آزمون ۱ نسبت به گروه کنترل ۱ اختلاف معنی‌داری نداشت ولی آزمون ۲ نسبت به گروه کنترل ۲ کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.01$). بنابراین در گروه‌های دارای نانو افزایش قطر نسبت به گروه‌های بدون نانو مشاهده نشد. برای بررسی آثار انجماد،

در پایان هفته اول تعداد کلونی‌ها در گروه کنترل ۱، $33/5 \pm 3/7$ ، آزمون ۱، $40 \pm 1/83$ ، کنترل ۲، $20/5 \pm 1/29$ و آزمون ۲، $27/5 \pm 2/2$ بود. برای بررسی آثار نانو گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) مقایسه شدند. نتایج آنالیز آماری نشان داد (شکل ۲) که تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون (کشت روی نانو) افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های بدون نانو نشان داد ($p \leq 0.001$).



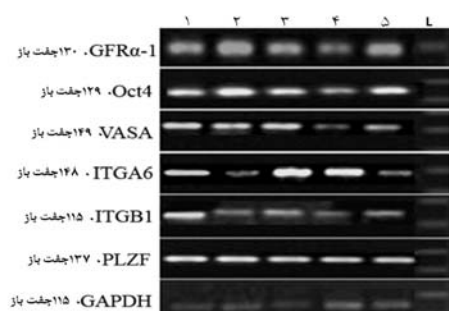
شکل ۲. مقایسه میانگین \pm انحراف معیار تعداد کلونی‌ها به ازای 10^5 سلول کشت شده در زمان‌های مختلف بین گروه‌های کنترل و گروه‌های آزمون

a: در مقایسه با گروه کنترل خود در همان هفته از نظر آماری معنی‌دار است ($p \leq 0.001$).

Fresh cell: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه،
Fresh cell on nano: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه روی نانوفایبر،
Frozen-thawed cell: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده،
Frozen-thawed cell on nano: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده روی نانوفایبر

برای بررسی آثار انجماد گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) هر یک به‌طور جداگانه مقایسه شدند. گروه کنترل ۲ نسبت به گروه کنترل ۱ کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p \leq 0.001$) و در گروه‌های آزمون (استفاده از نانو) گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱ کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.001$).

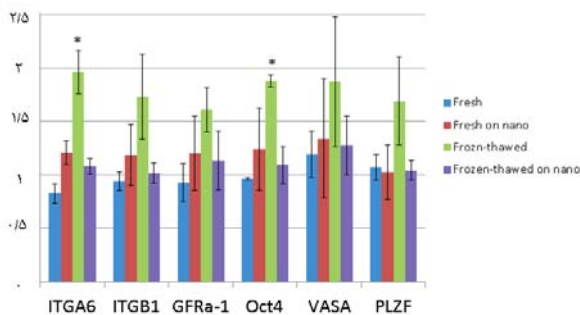
در پایان هفته دوم تعداد کلونی‌ها در گروه کنترل ۱، $40/25 \pm 3/86$ ، آزمون ۱، $47/75 \pm 2/63$ ، کنترل ۲، $28/25 \pm 1/71$ و



شکل ۴. نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های زاینده با روش RT-PCR. ستون ۱: سلول‌های به‌دست آمده از هضم آنژیومی قبل از کشت، ستون ۲: سلول‌های بدست آمده از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه، ستون ۳: سلول‌های بدست آمده از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه روی نانوفایبر، ستون ۴: سلول‌های بدست آمده از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده، ستون ۵: سلول‌های بدست آمده از کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده روی نانوفایبر، L: Ladder

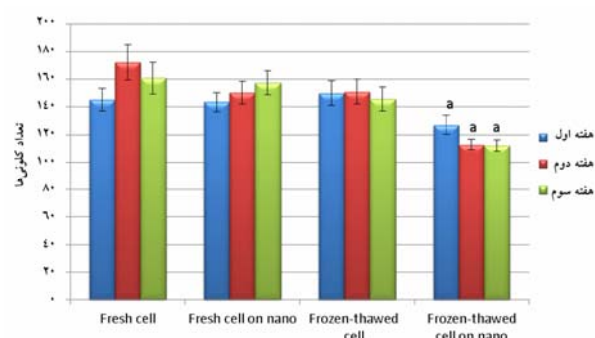
ارزیابی نیمه کمی نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه‌های آزمایش

برای بررسی نیمه کمی بیان ژن‌ها در گروه‌های آزمایش پس از سه بار تکرار و سه نمونه از هر گروه، از نرم افزار UVItect استفاده شد و نتایج ثبت شد. سپس بیان هر ژن نسبت به ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل ارزیابی شد و نتایج حاصل نشان داد که تنها تفاوت معنی‌داری در میزان نسبی بیان ژن‌های *Oct4* و *ITGA6* میان گروه‌ها وجود دارد (شکل ۵).



شکل ۵. ارزیابی نیمه کمی نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های زاینده در گروه‌های آزمایش. * میزان نسبی بیان ژن با تمامی گروه‌ها در همان ژن تفاوت معنی‌داری دارد ($p \leq 0.05$). Fresh cell: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه، Fresh cell on nano: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه بر روی نانوفایبر، Frozen-thawed cell: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده، Frozen-thawed cell on nano: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده بر روی نانوفایبر.

گروه‌های کنترل (بدون نانو) و آزمون (دارای نانو) هر یک به‌طور جداگانه مقایسه شدند. قطر کلونی‌ها در گروه کنترل ۲ نسبت به گروه کنترل ۱ اختلاف معنی‌داری نداشت ولی قطر کلونی‌ها در گروه آزمون ۲ نسبت به گروه آزمون ۱ کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.01$).



شکل ۳. مقایسه میانگین \pm انحراف معیار قطر کلونی‌ها در زمان‌های مختلف بین گروه‌های کنترل و آزمون. a: در مقایسه با گروه کنترل خود در همان هفته از نظر آماری کاهش معنی‌داری داشت ($p \leq 0.01$).

Fresh cell: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه، Fresh cell on nano: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از بیضه تازه روی نانوفایبر، Frozen-thawed cell: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده، Frozen-thawed cell on nano: کشت سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده روی نانوفایبر

بررسی مولکولی نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با روش RT-PCR و ارزیابی نیمه کمی آن‌ها در گروه‌های آزمایش

همان‌گونه که در شکل ۴ دیده می‌شود، برای بررسی بیان ژن‌ها در گروه‌های کنترل و آزمون در هر بار PCR، بیان یکی از ژن‌ها ارزیابی شد و ژن‌های *PLZF*، *Oct4*، *GFRα-1*، *VASA*، *ITGA6*، *ITGB1* در تمامی گروه‌ها بیان شد. این ژن‌ها در بافت بیضه موش نوزاد و سلول‌های به‌دست آمده از هضم آنژیومی (به‌عنوان کنترل مثبت) و سلول‌های حاصل از گروه‌های کنترل و آزمون دارای باند مشخصی بودند.

بمٹ

در سال‌های اخیر با وجود درمان موفق بیش از ۷۰ درصد سرطان‌های بیضه در کودکان با استفاده از اشعه و شیمی‌درمانی، درصد بالایی از آن‌ها در بلوغ دچار ازواسپرمی یا کاهش چشمگیر تعداد اسپرم می‌شوند. این امر می‌تواند کیفیت زندگی آن‌ها را به خطر بیندازد [۴]. در دهه‌های گذشته اکثر پژوهشگران تلاش‌های زیادی را در خصوص اسپرم‌زایی پستانداران در محیط آزمایشگاهی انجام داده‌اند. اگر چه هدف نهایی اسپرم‌زایی کامل در محیط آزمایشگاه، حاصل نشده اما پیشرفت‌های زیادی در این زمینه صورت گرفته است. در شرایط محیط کشت سلول‌های بنیادی فقط سلول‌هایی اسپرماتوگونی که قادر به ایجاد کلونی هستند. بنابراین تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به دلیل تعداد بسیار کم آن‌ها تحت سیستم محیط کشت خوب ابزار مهمی برای پژوهش و هم‌این‌طور روش درمانی برای ترمیم و تولید مجدد اسپرم‌زایی در افراد نابارور است [۲۲].

تعداد خیلی کمی از سلول‌های بیضه را سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تشکیل می‌دهند [۳]. استفاده از روش‌های کشت (برای بقا، تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها و موفقیت پیوند) و انجماد (به منظور نگهداری طولانی مدت آن‌ها) به همراه پیوند، دریچه‌ای را برای مطالعه بیولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی باز کرده است. تاکنون انجماد اسپرماتوگونی در موش، رت، همستر، خرگوش، سگ، گوساله، خوک و اسب انجام شده است. این دستاوردها نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی اکثر گونه‌ها می‌تواند به منظور حفظ اسپرم‌زایی منجمد شود [۲۲] به منظور انجماد بافت بیضه روش‌های مختلفی به کار برده شده است که از این میان، حفظ سلول‌های اسپرماتوگونی،

سرتولی و بستر بافتی بیضه نابالغ به وسیله انجماد در DMSO موفقیت‌آمیزتر بوده است [۲۳]. تاکنون تلاش‌های زیادی برای بهبود شرایط محیط کشت به منظور افزایش بقای سلول‌ها و تکثیر آن‌ها صورت گرفته است ولی به دلیل عدم آگاهی از نیازهای تغذیه‌ای این سلول‌ها موفقیت چشمگیری مشاهده نشده است. افزودن سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد تا حدودی به بهبود محیط کشت و در نتیجه تکثیر و زنده ماندن این سلول‌ها کمک کرده است. فاکتور نوروتروفیکی سلول گلیال (GDNF) نیز توسط سلول‌های سرتولی تولید و با اتصال به گیرنده خود بر سطح سلول‌های اسپرماتوگونی باعث پاسخ‌های درون سلولی می‌شود [۲۶-۲۴].

اخیراً در برخی مطالعات شواهدی مبنی بر این موضوع که ماتریکس‌های خارج سلولی از جمله فیبرونکتین و لاینین یا کلاژن می‌تواند به عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول‌های بنیادی استفاده شود و خاصیت خودنوزایی در این سلول‌ها را تقویت نماید، مطرح شده است [۱۳]. بنابراین در پژوهش حاضر از نانوفایبر PLLA به عنوان ماتریکس خارج سلولی در گروه‌های آزمون استفاده و اثر این نانوفایبر بر میزان تکثیر سلول‌های بنیادی در کشت سلولی روی آن بررسی شد.

به منظور جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی موش نابالغ ۳ تا ۶ روزه تهیه و پس از خارج کردن بیضه آن‌ها طی دو مرحله هضم آنزیمی، سلول‌ها جدا شدند و با افزودن GDNF به محیط کشت در دو گروه با و بدون نانوفایبر کشت داده شدند. در موش ۶ روزه نر طناب‌های بیضه فقط شامل سلول‌های بنیادی و سرتولی است [۲۷-۲۹]؛ بنابراین در مطالعات مختلف در زمینه بیولوژی، پیوند و تکامل رده سلول‌های اسپرماتوگونی از موش‌های نر ۶ روزه استفاده می‌شود [۳۰-۳۲].

روزه با سلول‌های سرتولی، افزایش تعداد و قطر را مشاهده کردند که از آنجایی که کلونی‌ها c-kit را بیان کردند، احتمالاً این کلونی‌ها تمایز یافته بودند [۳۶]. کروجی (Koruji) و همکاران در هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی بالغ با سرتولی افزایش تعداد و قطر کلونی را مشاهده کردند ولی در گروه‌های انجمادی آن‌ها نیز با کاهش تعداد و قطر روبرو بودند [۳۷].

برای تأیید بیشتر ماهیت این سلول‌ها علاوه بر ریخت‌شناسی، از RT-PCR استفاده شد. با استفاده از روش RT-PCR بیان ژن‌های شاخص سلول‌های زاینده در سطح mRNA بررسی شد که نتایج نشان‌دهنده بیان ژن‌های (*PLZF, Oct4, GFRa-1, VASA, ITGA6, ITGB1*) در تمام گروه‌ها بود. تاکنون هیچ نشانگر اختصاصی برای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هیچ گونه‌ای شناخته نشده است ولی ترکیبی از چند نشانگر مختلف اطلاعات مهمی را درباره انواع سلول‌های اسپرماتوگونی در مورد جوندگان و سایر گونه‌ها فراهم می‌کند [۳۸]. *GFRa-1* [۲۷ و ۲۸] و *PLZF* [۲۹ و ۳۰] خاص سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز اسپرماتوگونی در انواع گونه‌ها از جمله انسان است [۳۹]. *Oct 4* از ژن‌های مهم عمومی در همه سلول‌های بنیادی است که نشان‌دهنده پرتوانی در سلول‌های بنیادی است. *Oct-4* به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در خودنوزایی سلول‌هایی SSC نیز هست [۳۲ و ۳۳] که در سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز اسپرماگونی موش [۳۴، ۳۷ و ۴۰-۴۲] و انسان [۴۳-۴۶] بیان می‌شود. *ITGA6, ITGB1* هر دو در سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز اسپرماتوگونی موش بیان می‌شود [۴۷ و ۴۸] و نیز به عنوان نشانگر همه سلول‌های زاینده است [۴۹ و ۵۰]. بنابراین بیان ژن‌های مختلف فوق به‌طور همزمان در سلول‌های حاص از کشت می‌تواند دلیلی

علت استفاده از نانو فایبر این است که نانوفایبر ریز محیطی مشابه ماتریکس خارج سلولی است و مواد تشکیل دهنده آن جزء ترکیبات غشای پایه است. علاوه بر این در مطالعات مختلفی که انجام شده افزودن GDNF میزان زنده ماندن و تکثیر سلول‌ها را در محیط آزمایشگاه افزایش داده است و جزء اصلی افزودنی‌ها به محیط کشت است [۳۳]. GDNF یکی از مهمترین فاکتورهایی است که توسط سلول‌های سرتولی ترشح می‌شود. این فاکتور یک محرک قوی برای تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی است [۳۴]. بنابراین GDNF با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳ هفته و هر ۲ روز یک‌بار به هنگام تعویض محیط کشت سلول‌ها اضافه شد و طی سه هفته تعداد و قطر کلونی‌ها در هر دو گروه با نانوفایبر و بدون نانوفایبر ثبت شد. در پژوهش حاضر تعداد کلونی‌ها در گروه هم‌کشت با نانوفایبر نسبت به گروه کنترل بیشتر بود و در هر دو گروه تعداد کلونی‌ها طی سه هفته افزایش یافت. همچنین اسپرماتوگونی با ظاهر کروی و ۲ تا ۳ هستک خارج مرکزی ایجاد کلونی‌های گرد و شعاعی نمودند که ریخت‌شناسی کلونی‌ها مشابه نتایج پژوهش ایزدیبار و همکاران بود [۳۵]. بررسی قطر کلونی‌ها طی سه هفته کشت نشان داد که قطر کلونی‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد و در گروه هم‌کشت با نانوفایبر نسبت به گروه کنترل قطر کلونی‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت. کاهش قطر کلونی‌ها ممکن است به دلایلی مانند تعداد دفعات پاساژ طی کشت و به هم خوردن ساختار کلونی در هر بار پاساژ، افزایش ارتفاع کلونی‌ها به جای قطر آن‌ها یا تمایز سلول‌های ژرم و جدا شدن آن‌ها طی کشت از کلونی باشد. در مطالعاتی که انجام شده است انجم روز (Anjamrooz) و همکاران در کلونی‌های به‌دست آمده از هم‌کشتی سلول‌های نوزاد ۲

در هر دو گروه تعداد کلونی‌ها طی سه هفته افزایش یافت. در حالی که در گروه سلول‌های منجمد ذوب شده تعداد کلونی در مقایسه با گروه کنترل بدون نانو کاهش یافت و هم‌کشتی این سلول‌ها با نانوفایبر توانست تکثیر کلونی‌ها را افزایش دهد. کاهش تعداد کلونی احتمالاً به دلیل مرگ سلول‌های سرتولی طی فرایند انجماد به دلیل حجم بالای سیتوپلاسم آن‌ها است. بودن سلول‌های سوماتیک از جمله سرتولی به تعداد کافی در محیط کشت به تشکیل ریز محیطی شبه بیضه و بهبود شرایط کشت کمک می‌کند. در مطالعات اخیر که از هم‌کشتی سلول‌های سرتولی استفاده شده، نقش سلول‌های سرتولی در فرایند کلونی‌زایی به‌خوبی نشان داده است. نتایج این مطالعه با یافته‌های سایر پژوهشگران همخوانی دارد [۱۵، ۳۷ و ۵۶-۵۱].

بررسی حاضر نشان داد که نانوفایبر PLLA باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد-ذوب شده در محیط کشت می‌شود ولی بر میزان نسبی بیان ژن‌های اسپرماتوگونی اثری ندارد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده که در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی انجام شده است. نویسندگان سپاسگزاری خود را از مسئولین و همکاران این مرکز تحقیقات، به ویژه سرکار خانم بخشایش و جناب آقای دکتر کرباسیان به خاطر همکاری‌های صمیمانه‌شان ابراز می‌دارند.

References

1. Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.

بر وجود SSC در کشت سلولی بررسی حاضر باشد. در بررسی نیمه کمی میزان بیان ژن‌های اسپرماتوگونی، تنها تفاوت معنی‌داری در میزان نسبی بیان ژن‌های *ITGA6*، *Oct4* میان گروه‌ها آزمایش و کنترل مشاهده شد که نشان می‌دهد نانوفایبر تغییری در بیان اکثر ژن‌ها نداده است که این نتیجه می‌تواند به دلیل شرایط آزمایش از جمله مناسب نبودن آزمون نیمه کمی یا تکرار کم آزمایش‌ها مربوط به RT-PCR باشد.

در این مطالعه آثار هم‌کشتی با نانوفایبر PLLA بر کلونی‌زایی سلول‌های منجمد-ذوب شده اسپرماتوگونی موش نابالغ در محیط آزمایشگاه بررسی شد. سلول‌های منجمد-ذوب شده اسپرماتوگونی در دو گروه با و بدون نانوفایبر در حضور فاکتور رشد GDNF کشت شدند. سلول‌های ژرم حاصل از جداسازی نهایی پس از فرآیند انجماد-ذوب به میزان بالایی زنده ماندند ($63 \pm 3/56$) و در محیط آزمایشگاه نیز کلونی‌زایی نمودند. این یافته با نتایج بررسی ایزدیبار و همکاران مطابقت دارد که نشان دادند بعد از انجماد-ذوب، ۶۸ درصد سلول‌ها زنده ماندند و در محیط کشت تکثیر پیدا نمودند، همچنین این سلول‌ها عملکرد خود را حفظ نموده و توانستند بعد از پیوند در بیضه موش گیرنده کلونی ایجاد نمایند [۵]. در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری با این مطالعه مشاهده نشد.

در بررسی اثر نانوفایبر بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تازه مشاهده شد که تعداد کلونی‌ها در گروه هم‌کشت با نانوفایبر نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و

Edited by Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Clearwater, FL, Cache River Press, 1990, pp 1-40.

2. **Brinster RL.** Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296: 2174-6.
3. **Tegelenbosch RA, de Rooij DG.** A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993; 290: 193-200.
4. **Radford J, Shalet S, Lieberman B.** Fertility after treatment for cancer. Questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. *BMJ* 1999; 319: 935-6.
5. **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: 537-45.
6. **Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL.** Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 61(5): 1331-9.
7. **Naughton G, Naughton B.** inventors; Three-dimensional cell and tissue culture system. US1990.
8. **Dutta RC, Dutta AK.** Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv* 2009 ;27(4):334-9.
9. **Pabbruwe MB, Esfandiari E, Kafienah W, Tarlton JF, Hollander AP.** Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* 2009; 30: 4277-86.
10. **Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM.** Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 209-14.
11. **Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ.** Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78: 781-91.
12. **Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, et al.** Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials* 2006; 27: 1095-103.
13. **Yuan Z, Hou R, Wu J.** Generation of mice by transplantation of an adult spermatogonial cell line after cryopreservation. *Cell Prolif* 2009; 42: 123-31.
14. **Tavakolifar F, Shahverdi A, Pirouz M, Shakeri M, Koruji M, Baharvand H.** The Effect of Laminin and Gelatin Extracellular Matrix on Short-term Cultivation of Neonate Mouse Spermatogonial Stem Cells. *J Ir Anat Sci* 2010; 8: 37-48. (Persian)
15. **Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al.** Propagation of Human Spermatogonial Stem Cells In Vitro. *JAMA* 2009; 302: 2127-34.
16. **Al-Salihi KA, Samsudin AR.** Bone marrow mesenchymal stem cells differentiation and proliferation on the surface of coral implant. *Med J Malaysia* 2004; 59: 45-6.
17. **Jager M, Feser T, Denck H, Krauspe R.** Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. *Ann Biomed Eng* 2005; 33: 1319-32.
18. **Borden M, Attawia M, Laurencin CT.** The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: in vitro osteoconductivity studies. *J Biomed Mater Res* 2002; 61: 421-9.
19. **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: 354-62.
20. **Saito E, Liao EE, Hu WW, Krebsbach PH, Hollister SJ.** Effects of designed PLLA and 50:50

- PLGA scaffold architectures on bone formation in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 2011. (In press)
21. **Smith LA, Liu X, Hu J, Wang P, Ma PX.** Enhancing osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells by nanofibers. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 1855-64.
 22. **Ogawa T.** Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications. *J Mol Med (Berlin, Germany)* 2001; 79: 368-74.
 23. **Keros V, Hultenby K, Borgstrom B, Fridstrom M, Jahnukainen K, Hovatta O.** Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod* 2007; 22: 1384-95.
 24. **Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM, Jr.** Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol* 1999; 158: 504-28.
 25. **Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, et al.** Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 1995; 130: 137-48.
 26. **Viglietto G, Dolci S, Bruni P, Baldassarre G, Chiariotti L, Melillo RM, et al.** Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret-expressing spermatogonia. *Int J Oncol* 2000; 16: 689-94.
 27. **Dettin L, Ravindranath N, Hofmann MC, Dym M.** Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biol Reprod* 2003; 69: 1565-71.
 28. **Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, et al.** Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest* 2005; 115: 1855-61.
 29. **Johnston DS, Russell LD, Griswold MD.** Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Rev Reprod* 2000; 5: 183-8.
 30. **Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P.** Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 40225-33.
 31. **Dym M, Jia MC, Dirami G, Price JM, Rabin SJ, Mocchetti I, et al.** Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia. *Biol Reprod* 1995; 52: 8-19.
 32. **Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, et al.** Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297: 392-5.
 33. **Nagano M, Brinster RL.** Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS* 1998; 106: 47-55.
 34. **Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M.** Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* 2005; 279:114-24.
 35. **Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG.** Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124: 85-94.
 36. **Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ.** In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mouse spermatogonial cell colony formation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 709-20.
 37. **Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ.** Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol*

- Anim 2009; 45: 281-9.
38. **Hermann B, Sukhwani M, Hansel M, Orwig K.** Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences to those in rodents? *Reproduction* 2010; 139:479-93.
 39. **Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM.** Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* 2005; 113: 727-42.
 40. **Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, et al.** Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev Biol* 2003; 258: 209-25.
 41. **Ohmura M, Yoshida S, Ide Y, Nagamatsu G, Suda T, Ohbo K.** Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 285-96.
 42. **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: 16489-94.
 43. **Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Unni SK, Pethe P, Dhabalia JV, Patwardhan S, et al.** Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker. *J Histochem Cytochem* 2010; 58: 1093-106.
 44. **Lim JJ, Sung SY, Kim HJ, Song SH, Hong JY, Yoon TK, et al.** Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. *Cell Prolif* 2010; 43: 405-17.
 45. **Izadyar F, Wong J, Maki C, Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, et al.** Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Hum Reprod* 2011; 26:1296-306.
 46. **Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W.** Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 141.
 47. **Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL.** beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5504-9.
 48. **Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL.** Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6487-92.
 49. **Kokkinaki M, Lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann MC, et al.** Age affects gene expression in mouse spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction* 2010; 139: 1011-20.
 50. **Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T.** Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* 2000; 93: 139-49.
 51. **van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC.** Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *J Androl* 2001; 22: 696-704.
 52. **Huang YH, Chin CC, Ho HN, Chou CK, Shen CN, Kuo HC, et al.** Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1-dependent pathway. *FASEB J* 2009; 23: 2076-87.
 53. **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: 225-30.
 54. **Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG.** Basic features of bovine spermatogonial

culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology* 2006; 65: 1828-47.

55. **Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG.** Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol*

Reprod 2003; 68: 272-81.

56. **Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, et al.** Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia* 2011.