

تأثیر داربست سیلک و هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی بر تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

زینب نریمان پور (MSc)^۱، مریم نظم بجنوردی (PhD)^{۲*}، هانف قاسمی (PhD)^۱

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

دریافت: ۹۹/۶/۱۲، اصلاح: ۹۹/۹/۱۰، پذیرش: ۹۹/۱۰/۱۴

خلاصه

سابقه و هدف: تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یکی از گزینه‌های درمانی مردان نابارور است. ایجاد یک ریز محیط مناسب که شبیه به شرایط طبیعی تکثیر این سلول‌ها باشد، منجر به ارتقاء فرآیند کشت و اسپرماتوژنز می‌شود. لذا هدف از مطالعه حاضر استفاده از داربست سه بعدی نانو رشته سیلک و هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی به منظور افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از هضم مکانیکی و آنزیمی دو مرحله‌ای از بیضه ۵۰ موش ۴-۲ روزه (هر بار ۵ عدد) جدا و به مدت دو هفته داده شدند. پس از قرارگیری 2×10^4 سلول در سطح داربست سیلک در شرایط محیط کشت قرار گرفتند. میزان زنده ماندن این سلول‌ها، با استفاده از تست MTT و اتصال آنها توسط میکروسکوپ SEM، بررسی شد. متغیرهای مورد بررسی شامل ژن‌های اختصاصی Stra8، DAZL و Piwill2 توسط Real time PCR و ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند.

یافته‌ها: قدرت زنده ماندن سلول‌های کشت شده در حضور داربست و سرتولی (91 ± 2)، در مقایسه با گروه کنترل (85 ± 2)، (83 ± 8) در سطح بالاتری قرار داشت. نتایج Real time PCR موید افزایش معنی‌دار بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نظیر Stra8، Piwill2 و DAZL در سلول‌های کشت شده روی داربست ($1/47 \pm 6$) ($1/28 \pm 5$) ($1/43 \pm 2$) نسبت به گروه کشت دو بعدی ($1/17 \pm 5$) ($1/05 \pm 3$) ($1/13 \pm 7$) بود ($p < 0.05$).
نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که داربست سیلک در حضور هم‌کشتی با سلول‌های سرتولی می‌تواند سبب افزایش تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شده و تأثیر مثبتی در بقا و تکثیر این سلول‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: داربست، سیلک، سرتولی، تکثیر، اسپرماتوگونی.

مقدمه

کشت سلول دو بعدی معمولی، استفاده از ماتریکس سه بعدی و داربست پتانسیل موثری در روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی زایا دارد که با هدف حداقل دست‌ورزی‌های مکانیکی و شیمیایی و شبیه‌سازی شرایط طبیعی بدن را برای سلول میسر می‌سازد (۱۲-۱۰). امروزه داربست‌های نانو رشته با ایجاد حمایت از تکثیر سلول‌های بنیادی کاربرد‌های بسیاری در مهندسی بافت‌های تولید مثلی دارد (۱۳ و ۱۴). بدین منظور کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حضور عناصر ماتریکس خارج سلولی یا داربست می‌تواند به عنوان یک سیستم کشت مناسب جهت غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی قابل استفاده باشد (۱۷-۱۵). ابعاد ریز محیط سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که شامل قرارگیری آنها روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز است اهمیت زیادی در حفظ نگهداری و تکثیر این سلول‌ها دارد. سلول‌های سرتولی در ترشح فاکتورهای رشدی ضروری در این ریز محیط نقش مهمی دارند که از یکی از این فاکتورها می‌توان به GDNF، جهت تکثیر تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اشاره کرد. بدون این فاکتور عملاً تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی موثر نمی‌باشد (۲۰-۱۸). تاکنون از داربست سه بعدی نانو رشته سیلک و همچنین ترکیب

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های منحصر به فردی هستند که فرآیند اسپرماتوژنز که نقش انتقال اطلاعات ژنتیکی مردانه به نسل بعد را به عهده دارد و در حفظ بقای گونه اهمیت دارد. فرآیند اسپرماتوژنز در لوله‌های منی‌ساز بیضه توسط سلول‌های اسپرماتوگونی انجام شده و از سوی سلول‌های سرتولی حمایت می‌شود (۳-۱). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی در مردان نابارور مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های اسپرماتوگونی قبل از پیوند، درصد موفقیت درمان را در مردان نابارور افزایش دهد. طراحی یک محیط مناسب که منجر به تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود قابلیت کاربردی در درمان‌های کمک باروری در ناباروری مردانه دارد (۴-۳). روش‌های کشت آزمایشگاهی جهت تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارای اهمیت بوده به طوری که طراحی یک سیستم کشت کارآمد گامی اصلی در دستیابی و استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌باشد. تاکنون استفاده از سیستم‌های کشت مختلفی به منظور دستیابی به این هدف استفاده شده است (۹-۷). برخلاف

این مقاله حاصل پایان‌نامه زینب نریمان پور دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۸۱۷ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد.

*مسئول مقاله: دکتر مریم نظم بجنوردی

۴، ۷، ۱۴ شمارش شدند. قطر کلونی ها با نرم افزار Image J اندازه گیری شد (۳۰). متغیرهای مورد بررسی شامل تعداد و سایز کلونی های اسپرماتوگونی بود.

کاشت سلول در داربست: جهت کاشت سلول در داربست تعداد 2×10^4 سلول در سطح داربست قرار و سپس محیط حاوی DMEM (Gibco-Life) Fetal Bovine (FBS), DMEM/F12 (technologies, Canada) Serum ۱۵٪، اضافه شد (۳۱).

بررسی سمیت داربست و چسبندگی سلولی های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی نانو رشته سیلک: محلول MTT در محیط کشت DMEM جایگزین محیط کشت سلول شده و سپس سلول ها تحت تاثیر DMSO قرار گرفته و میزان جذب نوری آن با استفاده از دستگاه الیزا ریدر خوانده شدند. میزان زنده ماندن سلولی برای هر سلول با گروه کنترل مقایسه شدند (۳۱).

ارزیابی میکروسکوپ الکترونی SEM برای قدرت اتصال و چسبندگی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی: از سلول های کشت داده شده بر روی داربست نانو رشته به منظور بررسی چسبندگی سلول بر روی این داربست عکس SEM گرفته شد. به این منظور، نمونه ها با گلو تار آلدهید فیکس شده و با استفاده از درجات صعودی الکل آب گیری شد. غشای سلول با استفاده از اوسمیوم تتروکساید فیکس شده و با استفاده از میکروسکوپ SEM در دانشگاه امیرکبیر مورد مشاهده قرار گرفت (۳۲).

بررسی بیان ژن های اختصاصی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی: سلول های بنیادی اسپرماتوگونی کشت داده شده پس از دو هفته جمع آوری شدند. متغیرهای مورد بررسی شامل میزان بیان ژن های Stra8، DAZL و Piwill2 بود که توسط روش Real-time PCR انجام شد. RNA کل با استفاده از کیت RNA Plus (محصول شرکت سینا ژن) استخراج شده و پس از تبدیل mRNA مورد نظر به cDNA عمل PCR با استفاده از ۵۰ نانوگرم cDNA در ۳۵ سیکل شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه (۴۵ ثانیه) مرحله آنالینگ در دمای ۵۸ درجه (۴۵ ثانیه) و مرحله امتداد رشته در دمای ۷۲ درجه (۳۰ ثانیه) و در دستگاه Rotor-Gene 3000 (Corbett) انجام شد. پس از کامل شدن هر Run از PCR صحت هر منحنی تکثیر توسط منحنی Melting و با استفاده از دمای اختصاصی Melt of Product که برای محصول هر ژن اختصاصی است تایید گردید (۳۳ و ۳۴). میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $R = 2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (جدول ۱).

آنالیز آماری داده ها: روش محاسبه، تجزیه و تحلیل داده ها بر مبنای مقایسه میانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروهها از آزمون T-Test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه Chi-Square و آزمون Tukey استفاده شد. تمام مقادیر بر حسب Mean \pm SEM ارایه شده است. تمامی آزمایش ها و اندازه گیری ها در ۳ تکرار انجام شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

این داربست با هم کشتی سلول های سرتولی به منظور تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده نشده است. در این تحقیق پیش بینی می شود که ساختار نانو رشته سیلک محیطی سه بعدی برای تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی فراهم کند. تخلخل موجود در داربست این نانو رشته امکان تغذیه و دفع مواد زاید سلولی را تسهیل می نماید. از سوی دیگر نتایج گزارشات قبلی نشان دهنده نقش حمایتی سلول های بنیادی پس از هم کشتی با سلول های سرتولی می باشد (۲۱-۲۳).

سرتولی به عنوان پشتیبان اسپرماتوگونی نقش مهمی در تغذیه و حمایت فیزیکی آنها داشته و از طریق ترشح فاکتورهای رشد تکثیر و تمایز را در آنها القا می کند (۲۴-۲۶). لذا هدف از پژوهش حاضر افزایش تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از داربست سه بعدی نانو رشته سیلک و هم کشتی سلول های سرتولی می باشد. در این تحقیق پیش بینی می شود که ساختار نانو رشته سیلک محیطی سه بعدی برای تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی فراهم کند. پتانسیل بومی این داربست در حیطه علم مهندسی بافت و بیولوژی تولید مثل، این پژوهش همراه با نوآوری های زیادی بوده و به عنوان بستری مناسب جهت تحقیقات بعدی کاربرد دارد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1397.1817 مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

تهیه و جداسازی سلول های اسپرماتوگونی: در این تحقیق از سلول های بیضه ۵۰ موش ۴-۲ روزه استفاده شد. در هر مرتبه جداسازی سلول، از ۵ سر موش نوزاد استفاده شد. بعد از کشتن حیوان توسط استنشاق کلروفورم و باز کردن قسمت پایین شکم، بیضه ها خارج و به محیط کشت حاوی آنزیم های لازم نظیر کلاژناز و تریپسین جهت هضم آنزیمی و مکانیکی منتقل شد. رسوب حاوی سلول های سرتولی و اسپرماتوگونی کشت داده شد و در مراحل بعدی از یکدیگر با روش حذف تمایزی از هم جدا شدند (۲۷ و ۲۸).

کشت سلول های اسپرماتوگونی: سلول های اسپرماتوگونی پس از جداسازی در شرایط استریل زیر هود به فلاسک کشت سلول منتقل شدند، سپس محیط حاوی DMEM (Gibco-Life technologies, Canada) DMEM Fetal Bovine Serum (FBS) ۱۵٪، ۱٪ اسید های آمینه غیر ضروری و ۱٪ بنی سیلین / استریپتومایسین به اندازه ۵ ml اضافه شد و سلول ها در انکوباتور انکوبه شدند (۲۹).

بررسی کلونی های اسپرماتوگونی: مورفولوژی سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین ارزیابی شده و تعداد کلونی ها در روزهای

جدول ۱. توالی پرایمر ژن های اختصاصی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی

ژن	توالی پرایمر (forward/reverse)	Product size	Significance
Stra8	5- ACGACGCGTCGCTATTCCCTCTCACATCTTC-3 5- AGCGAGCTCGATGCACCTTCGACACTTG-3	۴۴۱	Spermatogonial marker
Piwill2	5-GCACAGTCCACGTGGTGGAAA -3 5-TCCATAGTCAGGACCGGAGGG -3	۶۸۱	Spermatogonial marker
DAZL	5-GGAGCTATGTTGTACCTCC-3 5-CCATGTAAGTAAAGCCAG-3	۳۱۳	Spermatogonial marker
b actin	5- CTTCTTGGGTATGGAATCCTG -3 5- GTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC-3	۱۳۱	Internal Control

یافته‌ها

تعیین ماهیت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی

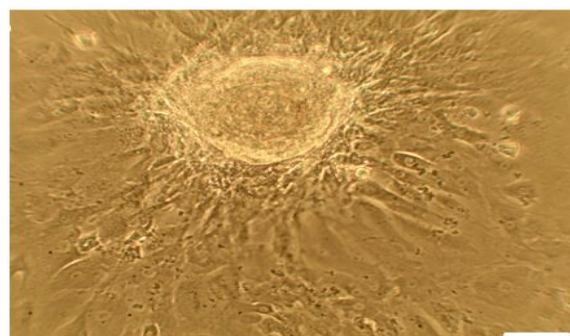
ارزیابی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی کشت داده شده توسط میکروسکوپ نوری فازکنتراست: سلول های بنیادی اسپرماتوگونی پس از ۲ روز کشت کف دیش و سلول های سرتولی به صورت تک لایه در کف دیش متصل شدند. کولونی های ریز متعددی مشتکل از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی لایه سرتولی ظاهر شده و به تدریج طی دو هفته کشت افزایش یافت (شکل ۱). تعداد کولونی ها و سائز آنها در گروه هم کشتی با سرتولی ($9/6 \pm 42$)، ($18/27 \pm 80$) در طی دوره کشت افزایش یافت ($8/06 \pm 13$) ($18/27 \pm 80$).

مقایسه تعداد و سائز کولونی های سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه هم کشتی با سرتولی با کشت بدون سلول های سرتولی: نتایج حاصل از شمارش تعداد کولونی ها در روز های ۳، ۷ و ۱۴ و اندازه گیری قطر کولونی ها و مساحت آنها افزایش قابل توجهی در تعداد و سائز کولونی ها در هم کشتی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی ($18/27 \pm 80$) و ($28/34 \pm 5$) و نسبت به کشت کنترل ($8/6 \pm 77$) ($19/04 \pm 5$) نشان داد ($p < 0/05$) (نمودار ۱).

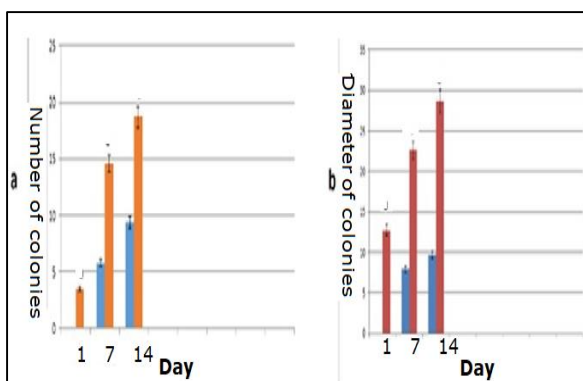
ویژگی مورفولوژیکی سلول های اسپرماتوگونی روی داربست سیلک: ارزیابی میکروسکوپ الکترونی SEM از داربست نانوفیبری سیلک برای اتصال سلول های بنیادی اسپرماتوگونی به داربست صورت گرفت. در SEM پس از کاشت سلول در داربست نانوفیبروس سیلک سلول ها در روزهای اتصال ظاهر مناسب داشته و پهن تر شدند (شکل ۲).

تست MTT: نتایج تست MTT نشان داد در روز اول کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی زنده مانی در گروه کنترل (96 ± 3) تفاوت معنی داری با گروه کشت روی داربست سیلک (97 ± 8) نداشت. اما در روزهای ۷ و ۱۴ تفاوت معنی داری ($p < 0/05$) در زنده مانی سلول ها (85 ± 2)، (83 ± 8) مشاهده شد. سلول های کشت شده روی داربست سیلک (91 ± 6)، (90 ± 2) افزایش زنده مانی قابل توجهی ($p < 0/05$) داشتند (نمودار ۲).

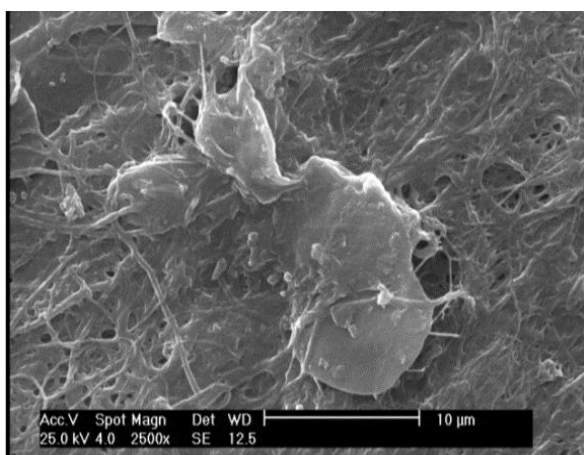
تاثیر داربست نانو فیبر سیلک بر بیان ژن های اختصاصی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت: بیان ژن های Stra8, DAZL, Piwill2 در سلول های اسپرماتوگونی کشت یافته در اسکافولد سیلک ($1/47 \pm 6$) ($1/28 \pm 5$) ($1/43 \pm 2$) نسبت به گروه کنترل ($1/17 \pm 5$) ($1/05 \pm 3$) ($1/13 \pm 7$) در سطح بالاتری بیان شد ($p < 0/05$). بیان ژن های فوق در گروه داربست (آزمایشی) در طی دو هفته کشت افزایش داشت در حالیکه در گروه کنترل طی دوره کشت دچار کاهش شد (نمودار ۳).



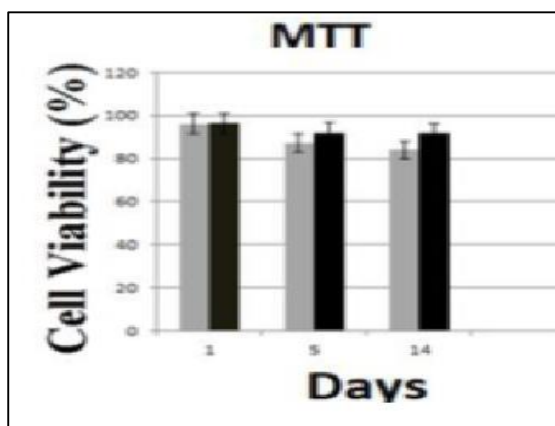
شکل ۱. مورفولوژی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه هم کشتی با سرتولی پنج روز بعد از کشت با بزرگنمایی $\times 10$



نمودار ۱. مقایسه تعداد کولونی (a) و سائز کولونی (b) در کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در حالت هم کشت با سلول های سرتولی (نمودار رنگ قرمز و نارنجی) با کشت در حالت بدن سلول های سرتولی (نمودار آبی)



شکل ۲. میکروگرافی SEM از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی که روی داربست های سیلک کاشته شده اند. اتصال سلول های بنیادی اسپرماتوگونی کشت شده بر روی داربست.



نمودار ۲. آزمایش MTT که زنده مانی سلول در داربست های ابریشم را نشان می دهد. رنگ تیره مربوط به کشت روی اسکافولد می باشد که طی دو هفته کشت افزایش معنی دار در زنده مانی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را در مقایسه با کشت منولایر (رنگ روشن) نشان می دهد.

پلی لاکتیک گلیکولیک بر سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا را نتیجه گرفتند (۱۲). محققین دیگر سلول های بنیادی جنینی را در اسکافولد نانو فیبرل کشت داده و تکثیر و افزایش و زنده مانی آنها را تایید کردند. در طی کشت سلول ها تعداد کلاسترها در گروه های منجمد ذوب شده و همچنین نمونه های منجمد بیضه در مقایسه با گروه کنترل پایین تر بود (۳۹).

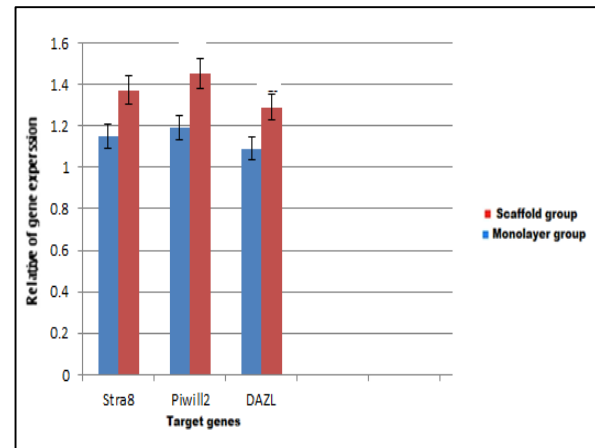
در تحقیق حاضر ارتباط بین سلول های سوماتیکی سرتولی و سلول های بنیادی اسپرماتوگونی توسط داربست نانوفیبریلار الکترواسپون سیلک فراهم شده است. به نظر می رسد این سیستم کشت طراحی شده در بازسازی ساختار های سه بعدی لوله ای منی ساز بیضه موثر باشد (۸-۶). به طور مشابهی برخی محققین گزارش کرده اند که استفاده از سلول های سرتولی به همراه ماتریکس در بازسازی لوله های منی ساز موثر است. سلول های سرتولی سلول های سوماتیکی هستند که ارتباط مستقیمی با سلول های ژرم در حال تمایز دارند. آرایش سلولی فضایی بین سرتولی و سلول های ژرم در حال تمایز یکی از پیچیده ترین نمونه های تبادل بین سلولی است (۴۱ و ۴۰).

بررسی های مولکولی نشان داد که بیان ژن های اختصاصی اسپرماتوگونیا نظیر *Stra8*, *piwill2*, *DAZL* در گروه کشت یافته بر اسکافولد در مقایسه با کشت دو بعدی بیشتر بود. این نتایج مشابه با نتایج گروه های دیگری می باشد که تغییرات افزایش بیان این ژن ها را طی کشت سلول های اسپرماتوگونیا بررسی و گزارش کردند (۵). ماهیت سلول های اسپرماتوگونیا در این پژوهش با استفاده از معیارهای مختلف شناسایی، ارزیابی و مورد تایید قرار گرفت. در واقع بیان درصد بالای مارکرهای اختصاصی اسپرماتوگونیا نظیر *Stra8*, *piwill2*, *DAZL* موید ماهیت بنیادی بودن این سلول ها بود. استفاده از این نشانگرها برای تایید ماهیت بنیادی سلول ها در محیط کشت بسیار رایج است (۴).

نتایج تحقیقات قبلی نشان می دهد که بیان ژن در سلول های بنیادی اسپرماتوگونی به عنوان یک مارکر سطحی به طور غالبی مشخص است. همچنین بیان ژن به حضور داربست و سرتولی بستگی دارد. نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که داربست در مهندسی بافت تولید مثلی قابلیت کاربرد داشته و می تواند پروسه تکثیر سلولی را حمایت کند. قابلیت زنده مانی و تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در سیستم کشتی طرح شده افزایش یافت و این سیستم را در تکثیر و تمایز این سلول ها جهت کاربردهای کلینیکی، استفاده های مهندسی بافت، سل تراپی و بازسازی بافت منحصر به فرد می سازد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ایمونوتنتیک دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر و قدردانی می گردد.



نمودار ۳. افزایش معنی دار بیان ژن نسبت مارکرهای اختصاصی *Stra8* و *Pivill2* و *DAZL* در سلول های بنیادی اسپرماتوگونیای کشت شده روی داربست سیلک نسبت به گروه تک لایه در مدت زمان دو هفته کشت. (حرف a بیانگر افزایش معنی دار بیان ژن نسبت به گروه کنترل می باشد).

بحث و نتیجه گیری

به کارگیری اسکافولد سیلک در تحقیق حاضر منجر به بهبود بقای سلولی در مقایسه با کشت دو بعدی شد. در واقع با تامین نیازهای سلولی در شرایط کشت سه بعدی در حضور داربست سیلک موثر است این داربست حاضر منجر به جهت گیری فضایی سلول های اسپرماتوگونی کشت شده و ایجاد تغییرات مورفولوژی طی دوران کشت می شود. ساختمان سه بعدی نانوفیت و ساین رشته های ماتریکس خارج سلولی توسط رشته های نانو فیبر طراحی می شود. این اسکافولدها یک ساختمان سه بعدی جهت القای سیگنال های ضروری برای سلول های کاشته شده و فنوتیپ سلولی آنها تاثیرات بیشتری را درمقایسه با کشت دو بعدی دارند (۳۸-۳۵).

اسکافولد محیط مناسب فیزیکی را برای جهت گیری سلول های تکثیر آنها و فضای لازم برای برای ریمودلینگ بافت ها فراهم می کند. جدیداً اسکافولدهای نانو فیبریلار الکترواسپون برای کشت سلولی استفاده می شود. مطالعات قبلی موید نقش محافظتی استفاده از داربست در تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی می باشد به طوریکه *Koruji* و همکاران اعلام کردند داربست رشته های پلی لاکتیک اسید (PLLA) منجر به افزایش تکثیر و کولونی زایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد ذوب شده می شود و کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی روی این داربست منجر به تولید توده های سلولی و کولونی در سلول های سلول های بنیادی اسپرماتوگونی منجمد ذوب شده می شود (۱۱). *Lee* و همکاران نیز تاثیرات مثبت داربست زیست تخریب پذیر

The Effect of Silk Nanofibrous Scaffold and Co-Culture with Sertoli Cells on Spermatogonial Stem Cell Proliferation

Z. Narimanpour (MSc)¹, M. Nazm Bojnordi (PhD)^{*1}, H. Ghasemi (PhD)¹

1.Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 23; 2021; PP: 208-214

Received: Sep 2nd 2020, Revised: Nov 30th 2020, Accepted: Jan 3rd 2021.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In vitro proliferation and maintenance of spermatogonial stem cells is one of the treatment options for infertile men. Creating a suitable microenvironment similar to the natural conditions of reproduction of these cells leads to the improvement of culture and spermatogenesis. Therefore, the aim of the present study was to use a 3D silk nanofibrous electrospun scaffold and co-culture with Sertoli cells in order to increase the proliferation of spermatogonial stem cells.

METHODS: In this experimental study, spermatogonial stem cells were isolated from the testes of 50 2-4-day-old mice (5 samples each time) using two-step mechanical and enzymatic digestion within two weeks. After placing 2×10^4 cells on the surface of the silk scaffold, they were exposed to culture medium. The viability of these cells was assessed using MTT assay and their binding was evaluated by SEM microscopy. The studied variables, including Stra8, DAZL and Piwill2 specific genes were analyzed by real time PCR and immunocytochemistry.

FINDINGS: The viability of cultured cells in the presence of scaffold and Sertoli (91 ± 6), (90 ± 2) was higher than the control group (85 ± 2), (83 ± 8). Real time PCR results confirmed a significant increase in the expression of specific markers of spermatogonial stem cells such as Stra8, Piwill2 and DAZL in cells cultured respectively on scaffold (1.47 ± 6) (1.28 ± 5) (1.43 ± 2) compared to the 2D culture group (1.17 ± 5) (1.05 ± 3) (1.13 ± 7) ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The results showed that silk scaffold in the presence of Sertoli cell co-culture can increase in vitro proliferation of spermatogonial stem cells and can have a positive effect on the viability and proliferation of these cells.

KEY WORDS: Scaffold, Silk, Sertoli, Proliferation, Spermatogonia.

Please cite this article as follows:

Narimanpour Z, Nazm Bojnordi M, Ghasemi H. The Effect of Silk Nanofibrous Scaffold and Co-Culture with Sertoli Cells on Spermatogonial Stem Cell Proliferation. J Babol Univ Med Sci. 2021; 23: 208-14.

*Corresponding Author: M. Nazm Bojnordi (PhD)

Address: Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran

Tel: +98 11 33542429

E-mail: bojnordi@modares.ac.ir

References

- 1.Hou SX, Singh SR. Germline stem cells, 1st ed. In: Walker JM, editor. *Methods in molecular biology*. Totowa (NJ): Humana Press; 2008. p.86-9.
- 2.Nazm Bojnordi M. The applications and recovery outcome of spermatogonia stem cells in regenerative medicine. *Middle East Fertil Soc J*. 2017;22(4):246-50.
- 3.Rendl M. Stem cells in development and disease. In: Affolter M, editor. *Current topics in developmental biology*, 1st ed. United States: Academic Press; 2014.
- 4.Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, McLean DJ. Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*. 2004;70(3):625-31.
- 5.Ghasemi Hamidabadi, H, Nazm Bojnordi M. Co-culture of mouse spermatogonial stem cells with sertoli cell as a feeder layer, stimulates the proliferation and spermatogonial stemness profile. *Middle East Fertil Soc J*. 2018;23(2):107-11.
- 6.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(9):1828-47.
- 7.Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9(1):141.
- 8.Hayrabedian S, Todorova K, Pashova S, Mollova M, Fernández N. Sertoli cell quiescence - new insights. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68(6):451-5.
- 9.Hamidabadi HG, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, Forouzandeh M, Sobhani A. Functional concentrations of BMP4 on differentiation of mouse embryonic stem cells to primordial germ cells. *Int J Fertil Steril*. 2011;5(2):104-9.
- 10.Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(14):1413-33.
- 11.Koruji M, Shahverdi A, Janan A, Piryaei A, Lakpour MR, Gilani Sedighi MA. Proliferation of small number of human spermatogonial stem cells obtained from azoospermic patients. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(9):957-67.
- 12.Lee JH, Oh JH, Lee JH, Kim MR, Min CK. Evaluation of in vitro spermatogenesis using poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(2):130-7.
- 13.Lee J-H, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park D-W, et al. In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril*. 2007;87(4):824-33.
- 14.Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*. 2006;27(14):2845-53.
- 15.Yu K, Zhang Y, Zhang B-L, Wu H-Y, Jiang W-Q, Wang S-T, et al. In-vitro differentiation of early pig spermatogenic cells to haploid germ cells. *Mol Hum Reprod*. 2019;25(9):507-18.
- 16.Baert Y, Dvorakova-Hortova K, Margaryan H, Goossens E. Mouse in vitro spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds. *Biofabrication*. 2019;11(3):035011.
- 17.Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AM. In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA*. 2011;305(23):2416-8.
- 18.Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T. Genetic Changes during Differentiation of Spermatogonial Stem Cells into Oligoprogenitor Cells. *J Babol Univ Med Sci*. 2017;19(10):35-41. [In Persian]
- 19.Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol Reprod*. 2011;84(1):97-105.
- 20.Tian R, Yao C, Yang C, Zhu Z, Li C, Zhi E, et al. Fibroblast growth factor-5 promotes spermatogonial stem cell proliferation via ERK and AKT activation. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):40.
- 21.Wang M, Zhang C, Huang C, Cheng S, He N, Wang Y, et al. Regulation of fibroblast growth factor 8 (FGF8) in chicken embryonic stem cells differentiation into spermatogonial stem cells. *J Cell Biochem*. 2018;119(2):2396-2407.
- 22.Wei C, Lin H, Cui S. The Forkhead Transcription Factor FOXC2 Is Required for Maintaining Murine Spermatogonial Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2018;27(9):624-36.

23. Liu S-S, Maguire EM, Bai Y-S, Huang L, Liu Y, Xu L, et al. A Novel Regulatory Axis, CHD1L-MicroRNA 486-Matrix Metalloproteinase 2, Controls Spermatogonial Stem Cell Properties. *Mol Cell Biol*. 2019;39(4):e00357-18.
24. Murdock MH, David S, Swinehart IT, Reing JE, Tran K, Gassei K, et al. Human Testis Extracellular Matrix Enhances Human Spermatogonial Stem Cell Survival In Vitro. *Tissue Eng Part A*. 2019;25(7-8):663-76.
25. Park MH, Park JE, Kim MS, Lee KY, Hwang JY, Yun JI, et al. Effects of Extracellular Matrix Protein-derived Signaling on the Maintenance of the Undifferentiated State of Spermatogonial Stem Cells from Porcine Neonatal Testis. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016;29(10):1398-406.
26. Ghasemi Hamidabadi H, Malekzadeh Shafaroudi M, Seifi M, Nazm Bojnordi M, Behruzi M, Gholipourmalekabadi M, et al. Repair of Critical-Sized Rat Calvarial Defects With Three-Dimensional Hydroxyapatite-Gelatin Scaffolds and Bone Marrow Stromal Stem Cells. *Med Arch*. 2018;72(2):88-93.
27. Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod*. 2002;17(1):161-72.
28. Mojaverrostami S, Nazm Bojnordi M, Ghasemi-Kasman M, Ebrahimzadeh MA, Ghasemi Hamidabadi H. A review of herbal therapy in multiple sclerosis. *Adv Pharm Bull*. 2018;8(4):575-90.
29. Vardiani M, Gholipourmalekabadi M, Ghaffari Novin M, Koruji M, Ghasemi Hamidabadi H, Salimi M, et al. Three-dimensional electrospun gelatin scaffold coseeded with embryonic stem cells and sertoli cells: A promising substrate for in vitro coculture system. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):12508-118.
30. Khanehzad M, Abolhasani F, Koruji SM, Ragerdi Kashani I, Aliakbari F. The roles of sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells. *Tehran Univ Med J*. 2016;73(12):878-87. [In Persian]
31. Ziloochi Kashani M, Bagher Z, Asgari HR, Najafi M, Koruji M, Mehraein F. Differentiation of neonate mouse spermatogonial stem cells on three-dimensional agar/polyvinyl alcohol nanofiber scaffold. *Syst Biol Reprod Med*. 2020;66(3):202-15.
32. Khadivi F, Koruji M, Akbari M, Jabari A, Talebi A, Ashouri Movassagh S, et al. Application of platelet-rich plasma (PRP) improves self-renewal of human spermatogonial stem cells in two-dimensional and three-dimensional culture systems. *Acta Histochem*. 2020;122(8):151627.
33. Nazmara Z, Shirinbayan P, Reza Asgari H, Ahadi R, Asgari F, Maki CB, et al. The epigenetic alterations of human sperm cells caused by heroin use disorder. *Andrologia*. 2021;53(1):e13799.
34. Majidi Gharenaz N, Movahedin M, Mazaheri Z. Three-dimensional culture of mouse spermatogonial stem cells using a decellularised testicular scaffold. *Cell J*. 2020;21(4):410-8.
35. Plantenga B. Spermatogonia: the Isle of Man, Illustrated edition. Brooklyn, NY: Autonomedia; 2004. p.970-5.
36. Kubota H. Heterogeneity of Spermatogonial Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1169:225-42.
37. Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M. Alteration in genes expression patterns during in vitro differentiation of mouse spermatogonial cells into neuroepithelial-like cells. *Cytotechnology*. 2013;65(1):97-104.
38. Nazm Bojnordi M, Ebrahimi-Barough S, Vojoudi E, Ghasemi Hamidabadi H. Silk nanofibrous electrospun scaffold enhances differentiation of embryonic stem like cells derived from testis in to mature neuron. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(10):2662-9.
39. Mohammadi S, Rahmani F, Hasanian SM, Beheshti F, Akbari Oryani M, Ebrahimzadeh A, et al. Effects of dioxin on testicular histopathology, sperm parameters, and CatSper2 gene and protein expression in Naval Medical Research Institute male mice. *Andrologia*. 2019;51(11):e13411.
40. Faragnezhad HR, Mohammadi S, Seifati SM, Mansouri A, Mahmoodian R. Investigation of the effect of diazinon on CatSper 1 gene expression, sperm motility and germinal epithelium thickness in adult male mice. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci*. 2020;24(6):68-78. [In Persian]
41. Olive V, Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(2):246-50.