مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۴۰۰، دوره ۲۳، صفحه ۲۱۴-۲۰۸

تاثیر داربست سیلک و هم‌کشتی با سلول های سرتولی بر تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونی

زینب نریمان پور (MSc)[۱]، مریم نظم بجنوردی (PhD)[۱*]، هاتف 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 سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا یکی از گزینه های درمانی مردان نابارور است. ایجاد یک ریز محیط مناسب که شبیه به شرایط طبیعی تکثیر این سلول ها باشد، منجر به ارتقاء فرآیند کشت و اسپرماتوژنز می شود. لذا هدف از مطالعه حاضر استفاده از داربست سه بعدی نانو رشته سیلک و هم‌کشتی با سلول های سرتولی به منظور افزایش تکثیر سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا با استفاده از هضم مکانیکی و آنزیمی دو مرحله ای از بیضه ۵۰ موش ۴-۲ روزه (هر بار ۵ عدد) جدا و به مدت دو هفته داده شدند. پس از قرارگیری ۲×۱۰^{۴} سلول در سطح داربست سیلک در شرایط محیط کشت قرار گرفتند. میزان زنده ماندن این سلول ها، با استفاده از تست MTT و اتصال آنها توسط میکروسکوپ SEM بررسی شد. متغیرهای مورد بررسی شامل ژن های اختصاصی Stra8، DAZL و Piwill2 توسط Real time PCR و ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند.

یافته‌ها: قدرت زنده مانی سلول های کشت شده در حضور داربست و سرتولی (۶±۹۱)، (۲±۹۰) در مقایسه با گروه کنترل (۲±۸۵)، (۸±۸۳) در سطح بالاتری قرار داشت. نتایج Real time PCR موید افزایش معنی دار بیان مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی نظیر Stra8، Piwill2 و DAZL در سلول های کشت شده روی داربست (۶±۱/۴۷) (۵±۱/۲۸) (۲±۱/۴۳) نسبت به گروه کشت دو بعدی (۵±۱/۱۷) (۳±۱/۰۵) (۷±۱/۱۳) بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که داربست سیلک در حضور همکشتی با سلول های سرتولی می تواند سبب افزایش تکثیر آزمایشگاهی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی شده و تاثیر مثبتی در بقا و تکثیر این سلول ها دارد.

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

مقدمه

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول های منحصر به فردی هستند که فرآیند اسپرماتوژنز که نقش انتقال اطلاعات ژنتیکی مردانه به نسل بعد را به عهده دارد و درحفظ بقای گونه اهمیت دارد. فرآیند اسپرماتوژنز در لوله های منی ساز بیضه توسط سلول های اسپرماتوگونی انجام شده و از سوی سلول های سرتولی حمایت می شود (۳-۱). نتایج تحقیقات نشان می دهد پیوند سلول های اسپرماتوگونی می تواند به عنوان یک گزینه درمانی در مردان نابارور مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر به نظر می رسد تکثیر آزمایشگاهی سلول های اسپرماتوگونی قبل از پیوند، درصد موفقیت درمان را در مردان نابارور افزایش دهد. طراحی یک محیط مناسب که منجر به تکثیر آزمایشگاهی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی می شود قابلیت کاربردی در درمان های کمک باروری در ناباروری مردانه دارد (۶-۴). روش های کشت آزمایشگاهی جهت تکثیر و غنی سازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی دارای اهمیت بوده به طوریکه طراحی یک سیستم کشت کارآمد گامی اصلی در دستیابی و استفاده از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی می باشد. تاکنون استفاده از سیستم های کشت مختلفی به منظور دستیابی به این هدف استفاده شده است (۹-۷). برخلاف کشت سلول دو بعدی معمولی، استفاده از ماتریکس سه بعدی و داربست پتانسیل موثری در روند تکثیر و تمایز سلول های بنیادی زایا دارد که با هدف حداقل دست ورزی های مکانیکی و شیمیایی و شبیه سازی شرایط طبیعی بدن را برای سلول میسر می سازد (۱۲-۱۰). امروزه داربست های نانو رشته با ایجاد حمایت از تکثیر سلول های بنیادی کاربرد های بسیاری در مهندسی بافت های تولید مثلی دارد (۱۴و۱۳). بدین منظور کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در حضور عناصر ماتریکس خارج سلولی یا داربست می تواند به عنوان یک سیستم کشت مناسب جهت غنی سازی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی قابل استفاده باشد (۱۷-۱۵). ابعاد ریز محیط سلول های بنیادی اسپرماتوگونی که شامل قرارگیری آنها روی غشای پایه لوله های منی ساز است اهمیت زیادی در حفظ نگهداری و تکثیر این سلول ها دارد. سلول های سرتولی در ترشح فاکتور های رشدی ضروری در این ریز محیط نقش مهمی دارند که از یکی از این فاکتورها می توان به GDNF، جهت تکثیر تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی اشاره کرد. بدون این فاکتور عملاً تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی موثر نمی باشد (۲۰-۱۸). تاکنون از داربست سه بعدی نانو رشته سیلک و همچنین ترکیب

▣ این مقاله حاصل پایان نامه زینب نریمان پور دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۸۱۷ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر مریم نظم بجنوردی
آدرس: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی. تلفن: ۳۳۵۴۲۴۲۹-۰۱۱
E-mail: bojnordi@modares.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]

این داربست با هم‌کشتی 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 می‌نماید. از سوی دیگر نتایج گزارشات قبلی نشان دهنده نقش حمایتی سلول های بنیادی پس از هم‌کشتی با سلول های سرتولی می باشد (۲۳-۲۱).

سـرتولی به عنوان پشتیبان اسـپرماتوگونی نقش مهمی در تغذیه و حمایت فیزیکی آنها داشته و از طریق ترشح فاکتورهای رشـد تکثیر و تمایز را در آنها القا می کند (۲۶-۲۴). لذا هدف از پژوهش حاضر افزایش تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از داربست سه بعدی نانو رشته سیلک و هم‌کشتی 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 هـای بیضه ۵۰ موش ۴-۲ روزه استفاده شد. در هر مرتبه جداسازی سلول، از ۵ سر موش نوزاد استفاده شد. بعـد از کـشتن حیـوان توسط استنشاق کلروفرم و بـاز کـردن قـسمت پایین شکم، بیضه ها خـارج و به محـیط کـشت حاوی آنزیم های لازم نظیر کلاژناز و ترپیسین جهت هضم آنزیمی و مکانیکی منتقــل 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 (۲۸و۲۷).

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/F12 Fetal Bovine Serum (FBS) ۱۵٪، ۱٪ اسید های آمینه غیر ضروری و ۱٪ به پنی سیلین/ استرپتومایسین به اندازه ml ۵ اضافه شد و سلول ها در انکوباتور انکوبه شدند (۲۹).

بررسی کلونی های اسپرماتوگونی: مورفولوژی سـلول ها بـا استفاده از میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین ارزیابی شده و تعـداد کلونی ها در روزهــای ۴، ۷، ۱۴ شــمارش شــدند. قطر کلونی ها با نرم افزار Image J اندازه گیری شد (۳۰). متغیرهای مورد بررسی شامل تعـداد و سایز کلونی های اسپرماتوگونی بود.

کاشت سلول در داربست: جهت کاشت سلول در داربست تعداد^{4}۱۰×۲ سلول در سطح داربست قرار و سپس محیط حاوی DMEM (Gibco-Life technologies,Canada)، DMEM/F12 Fetal Bovine (FBS) Serum ۱۵٪ اضافه شد (۳۱).

بررسی سمیت داربست و چسبندگی سلولی سلول 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 گلوتار 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 اسپرماتوگونیا: سلول‌های 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 (۳۴و۳۳). میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $R=۲^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (جدول ۱).

آنالیز آماری داده ها: روش محاسبه، تجزیه و تحلیل داده ها بر مبنای مقایسه میانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروها از آزمون T-Test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه Chi-Square و آزمون Tukey استفاده شد. تمام مقادیر بر حسب Mean±SEM ارایه شده است. تمامی آزمایش ها و اندازه گیری‌ها در ۳ تکرار انجام شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

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-CCATGTAACTAGATAAGCCAG-3	۳۱۳	Spermatogonial marker
b actin	5- CTTCTTGGGTATGGAATCCTG -3 5- GTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC-3	۱۳۱	Internal Control

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]

یافته‌ها

تعیین ماهیت سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا

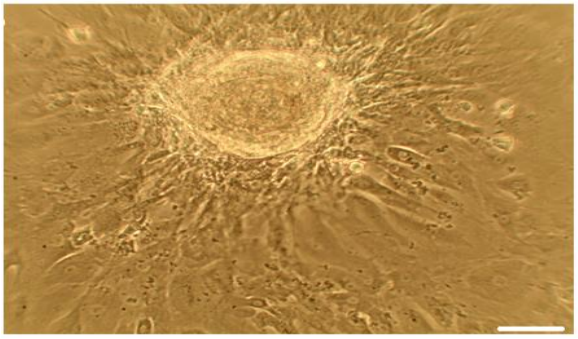
ارزیابی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی کشت داده شده توسط میکروسکوپ نوری فازکنتراست: سلول های بنیادی اسپرماتوگونی پس از ۲ روز کشت کف دیش و سلول های سرتولی به صورت تک لایه در کف دیش متصل شدند. کولونی های ریز متعددی مشتکل از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی لایه سرتولی ظاهر شده و به تدریج طی دو هفته کشت افزایش یافت (شکل ۱). تعداد کولونی ها و سایز آنها در گروه هم‌کشتی با سرتولی (۹/۶±۴۲)، (۱۸/۲۷±۸۰) در طی دوره کشت افزایش یافت (۸/۰۶±۱۳) (۱۸/۲۷±۸۰).

مقایسه تعداد و سایز کولونی های سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در گروه هم‌کشتی 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 سایز کولونی ها در هم‌کشتی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی (۱۸/۲۷±۸۰) و (۲۸/۳۴±۵) و نسبت به کشت کنترل (۸/۶±۷۷) (۱۹/۰۴±۵) نشان داد ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۱).

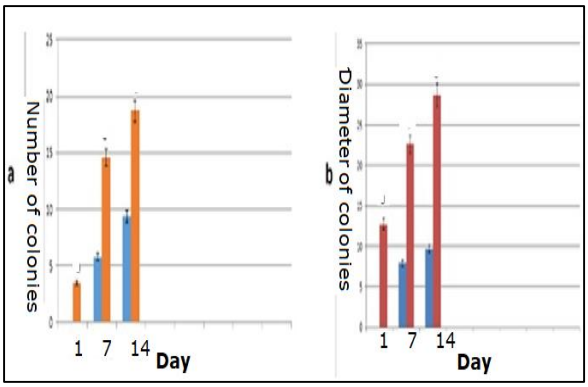
ویژگی مورفولوژیکی سلول های اسپرماتوگونی روی داربست سیلک: ارزیابی میکروسکوپ الکترونی SEM از داربست نانوفیبری سیلک برای اتصال سلول های بنیادی اسپرماتوگونی به داربست صورت گرفت. در SEM پس از کاشت سلول در داربست نانوفیبروس سیلک سلول ها در روزهای اتصال ظاهر مناسب داشته و پهن تر شدند (شکل ۲).

تست MTT: نتایج تست MTT نشان داد در روز اول کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی زنده مانی در گروه کنترل (۹۶±۳) تفاوت معنی داری با گروه کشت روی داربست سیلک (۹۷±۸) نداشت. اما در روزهای ۷ و ۱۴ تفاوت معنی داری ($p<۰/۰۵$) در زنده مانی سلول ها (۸۵±۲)، (۸۳±۸) مشاهده شد. سلول های کشت شده روی داربست سیلک (۹۱±۶)، (۹۰±۲) افزایش زنده مانی قابل توجهی ($p<۰/۰۵$) داشتند (نمودار ۲).

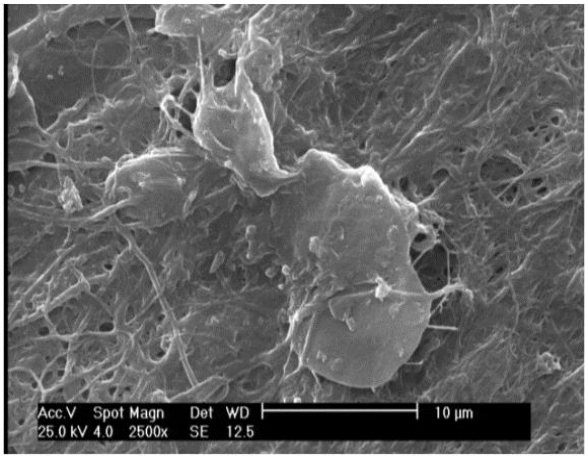
تاثیر داربست نانو فیبر سیلک بر بیان ژن های اختصاصی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت: بیان ژن های Piwill2، DAZL، Stra8 در سلول های اسپرماتوگونی کشت یافته در اسکافولد سیلک (۱/۴۷±۶) (۱/۲۸±۵) (۱/۴۳±۲) نسبت به گروه کنترل (۱/۱۷±۵) (۱/۰۵±۳) (۱/۱۳±۷) در سطح بالاتری بیان شد ($p<۰/۰۵$). بیان ژن های فوق در گروه داربست (آزمایشی) در طی دو هفته کشت افزایش داشت در حالیکه در گروه کنترل طی دوره کشت دچار کاهش شد (نمودار ۳).



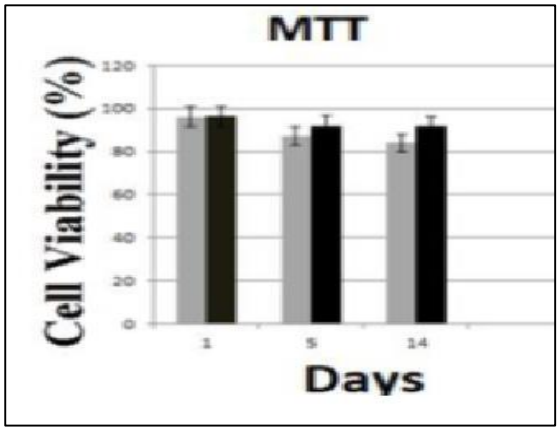
شکل ۱. مورفولوژی سلول بنیادی اسپرماتوگونی در گروه هم‌کشتی با سرتولی پنج روز بعد از کشت با بزرگنمایی۱۰×



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

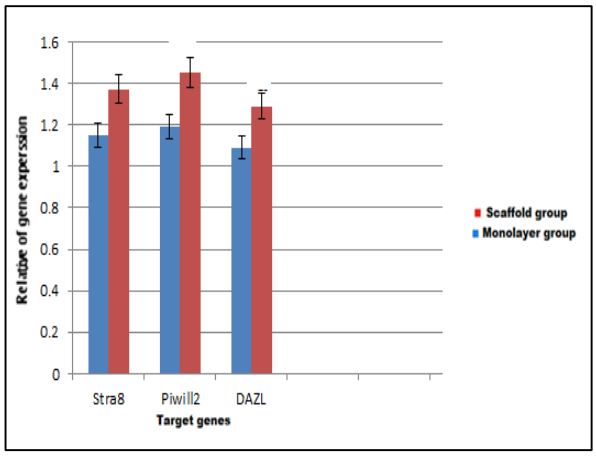


شکل ۲. میکروگرافی SEM از سلول های بنیادی اسپرماتوگونی که روی داربست های سیلک کاشته شده اند. اتصال سلول های بنیادی اسپرماتوگونی کشت شده بر روی داربست.



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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]



نمودار ۳. افزایش معنی دار بیان ژن نسبت مارکرهای اختصاصی Stra8، Piwill2 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 سایز 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 (۳۵-۳۸).

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 الاکتیک اسید Polyl-Lactic Acid (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 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 گروهای 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 (۴۱و۴۰).

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 بستکی 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 ایمونوژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]

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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]

[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]

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.Hayrabedyan 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]

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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.30.9]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.208]