Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2022; Vol. 46; No. 2

Effect of 3D substrate obtained from decellularized tissue of rat testis on the differentiation of mouse spermatogonial cells

Sanaz Ashouri Movassagh[1], Sepideh Ashouri Movassagh[2,3]*

1- Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.
2- Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center, ACECR, Tehran, Iran.
3- Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: September 13, 2021; Accepted: December 25, 2021

Abstract

Background and Aim: In males, spermatogonial stem cells (SSCs) are the cause of germ cell production and therefore fertility. Reducing and damaging SSCs is one of the causes of infertility. Culture, proliferation, and differentiation of SSCs in vitro can be a solution to treat some cases of infertility. In the present study, performed in 2019 at the Iranian Biological Resource Center, we examined the growth and differentiation of SSCs on decellularized testicular matrix (DTM) in rats.

Methods: In the current experimental study**,** after extraction of SSCs by enzymatic method from testicular tissue of newborn mice, these cells were propagated in a specific culture medium for three weeks. After confirming the identity of the colonies resulting from the growth of these cells, they were cultured in two groups, one on a layer of DTM and the other in two-dimensional conditions of conventional culture dishes with differential culture medium. In the fourth week, since the initiation of the differentiation culture, the expression of pre meiotic (OCT4 & PLZF) and meiotic (SCP3 & Protamine-2) genes were measured in both groups. To ensure the results, all steps were performed with three biological replications and the results were evaluated using one way ANOVA.

Results: : Examination of pre-meiotic and meiotic gene expression after 4 weeks of differential culture of SSCs on two-dimensional substrate and DTM using real-time PCR showed that the expression of meiotic genes was significantly higher on DTM substrate ($P \leq 0.01$).).

Conclusion: In DTM three-dimensional culture, due to the better communication of cells with each other and the presence of a natural extracellular matrix, more ideal conditions are created for the preservation, proliferation and differentiation of SSCs than in two-dimensional culture.

Keywords: Spermatogonial Stem Cells; Decellularization; Extracellular matrix; Differentiation.

Please cite this article as: Ashouri Movassagh S, Ashouri Movassagh S. Effect of 3D substrate obtained from decellularized tissue of rat testis on the differentiation of mouse spermatogonial cells. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(2):19-29.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

*Corresponding Author: Sepideh Ashouri Movassagh; **Email:** ashouri@acecr.ir

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ٤٦، شماره ٢، سال ١٤٠١ شمسی، صفحات ١٩ تا ٢٩

اثر بستر سه‌بعدی حاصل از بافت سلول‌زدایی‌شده بیضه رت بر روی تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی موش

ساناز آشوری موثق[1]، سپیده آشوری موثق[2و3*]

۱- جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، مؤسسه تحقیقات ابن‌سینا، تهران، ایران.
۲- جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران.
۳- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۴

خلاصه

سابقه و هدف: در جنس مذکر، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial stem cells-SSCs) عامل تولید سلول‌های جنسی و باروری هستند و کاهش و آسیب به آن‌ها از عوامل ناباروری است. کشت، تکثیر و تمایز SSCs در محیط آزمایشگاهی می‌تواند راهکاری برای درمان برخی از موارد ناباروی باشد. ما در این مطالعه که در سال ۱۳۹۹ در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام دادیم، رشد و تمایز SSCs روی بافت بیضه سلول‌زدایی شده (Decellularized testicular matrix-DTM) موش صحرایی را بررسی کردیم.

روش کار: در این مطالعه تجربی، پس از استخراج SSCs با روش آنزیمی از بافت بیضه موش تازه متولدشده این سلول‌ها به مدت سه هفته در محیط کشت اختصاصی تکثیر شدند. سلول‌ها پس از تأیید هویت، برای تمایز در دو گروه یکی بر روی یک لایه از DTM و دیگری در ظروف کشت معمول کشت داده شدند. پس از گذشت چهار هفته کشت تمایزی بیان ژن‌های پیش از میوز (شامل: PLZF و OCT4) و ژن‌های میوزی (شامل: SCP3 و Protamine-2) در هر دو گروه با روش Real-time PCR سنجیده شد. برای اطمینان از نتایج حاصل تمام مراحل کار با سه بار تکرار زیستی انجام شد و نتایج حاصل با روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) ارزیابی شد.

یافته‌ها: بررسی میزان بیان ژن‌های پیش‌میوزی و میوزی پس از چهار هفته کشت تمایزی SSCs روی بستر دو بعدی و DTM با استفاده از Real-time PCR نشان داد که میزان بیان ژن‌های میوزی روی بستر DTM به میزان معناداری افزایش یافته است ($P \leq 0.01$).

نتیجه‌گیری: در شرایط کشت سه بعدی حاصل از DTM به دلیل ارتباط بهتر سلول‌ها و وجود ماتریکس خارج سلولی طبیعی، شرایط مناسب‌تری برای حفظ، تکثیر و تمایز SSCs نسبت به کشت دو بعدی ایجاد شده است.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی؛ ماتریکس خارج سلولی؛ سلول‌زدایی؛ تمایز.

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:
Ashouri Movassagh S, Ashouri Movassagh S. Effect of 3D substrate obtained from decellularized tissue of rat testis on the differentiation of mouse spermatogonial cells. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(2):19-29.

*نویسنده مسئول مکاتبات: سپیده آشوری‌موثق؛ آدرس پست الکترونیکی: ashouri@acecr.ir

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

مقدمه

بهبود روش‌های کشت SSCs با ایجاد یک مدل آزمایشگاهی سبب تسهیل مطالعه در روند اسپرماتوژنز، درمان ناباروری با علل مردانه و امکان اصلاح ژنتیکی از طریق سلول جنسی مردانه می‌شود (۱-۴). امروزه حدود ۷ درصد از جمعیت مردان دچار ناباروری هستند و از این تعداد، ۱۰ درصد آزواسپرم هستند که با گرفتن اسپرم از نمونه بیوپسی بافت بیضه و تزریق داخل سیتوپلاسمی، امکان باروری برای این افراد فراهم می‌شود. با این وجود تمایز سلول‌های جنسی دیپلوئید به سلول بالغ هاپلوئید در شرایط آزمایشگاهی می‌تواندراهی برای کمک به مردان آزواسپرم به ویژه افرادی که دچار توقف در روند اسپرماتوژنز هستند، باشد (۵, ۶).

با پیشرفت روش‌های درمانی و افزایش بهبود سرطان در کودکان و عوارض ناشی از شیمی درمانی و رادیوتراپی که به سلول‌های مختلف به خصوص سلول‌های در حال تکثیر مانند SSCs موجود در بافت بیضه آسیب می‌رساند، یکی از چالش‌های اصلی در این بیماران، ناباروری پس از بلوغ است (۷).

از آنجا که اسپرماتوژنز در دوران کودکی آغاز نمی‌شود و انجماد اسپرم بالغ در کودکان امکان‌پذیر نیست، بنابراین یکی از روش‌های بازگرداندن باروری در این افراد، انجماد و پیوند SSCs به آن‌ها است (۸-۱۰). افزایش تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در سیستم‌های مختلف منجر به افزایش کارایی و موفقیت پیوند می‌شود، اما ممکن است خطر عود سرطان را به دلیل حضور سلول‌های سرطانی در بافت بیضه افزایش دهد (۱۱-۱۳). بر این اساس، تولید اسپرم از سلول‌های اسپرماتوگونی در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند گزینه درمانی مناسبی برای این بیماران باشد.

کشت SSCs و انجام اسپرماتوژنز در شرایط آزمایشگاهی برای دستیابی به اسپرماتوزوآی بالغ به عنوان یک چالش در تحقیق‌های مختلف مطرح است. تاکنون نتایج امیدبخشی از انجام اسپرماتوژنز و تولید اسپرماتید بالغ در شرایط آزمایشگاهی حاصل شده است که با وجود توان باروری پایین قادر به تولید بلاستوسیست‌های نرمال بوده‌اند (۷).

یکی از مشکلات کشتSSCs در آزمایشگاه، تقسیم‌های میوزی این سلول‌هاست. برای حفظ، تکثیر و تمایز SSCs نیاز به بستری است که بتواند تا حد امکان شرایطی مشابه بدن را فراهم آورد، ساختاری که در بسترهای دو بعدی کشت‌های معمول در دسترس نیست. در حال حاضر، بیشتر مطالعه‌ها به دنبال کشت سلول‌ها در بسترهای سه‌بعدی هستند (۲, ۳, ۱۴, ۱۵). کشت سه بعدی با فراهم کردن شرایط مشابه لوله‌های اسپرم‌ساز، راهکاری برای انجام اسپرماتوژنز در محیط آزمایشگاهی محسوب می‌شود. بدیهی است که انتخاب نوع بستر سه بعدی می‌تواند کمک مؤثری برای دستیابی به هدف مورد نظر باشد. در بدن، سلول‌ها با ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix-ECM) اطراف خود ارتباط دارند (۱۶, ۱۷). ECM شامل انواع ترکیب‌های مختلف کلاژن، پروتئوگلیکان، گلیکوپروتئین و گلیکوزآمینوگلیکان است. این ملکول‌ها با ساختارهای پیچیده‌ای کنار یکدیگر قرار دارند. اجزای پروتئینی ECM در بافت‌ها و اندام‌های مختلف متفاوت است و ترکیب آن بر اساس شرایط رشد، نمو و پاتولوژیک مشخص می‌شود (۱۸, ۱۹). ECM شرایط مناسبی برای ارتباط بین سلول‌ها را فرآهم می‌آورد و سبب تحریک مکانیکی متفاوت سلول‌ها می‌شود؛ ضمن اینکه می‌تواند فاکتورهای مؤثر روی سلول‌ها را کنترل کند (۲۰). به دست آوردن یک مدل ECM در آزمایشگاه که بتواند ترکیب‌های مشابه بدن را داشته باشد، مشکل است و این مشکل با سلول‌زدایی بافت‌ها و استفاده از ماتریکس آن‌ها در کشت سلول حل شده است. برای اینکه بتوانیم در آزمایشگاه حداکثر شباهت را با محیط بدن داشته باشیم، بهتر است از بافت سلول‌زدایی شده‌ای که سلول مدنظر در بدن در تماس با آن است، استفاده کنیم. در این مطالعه که در سال ۱۳۹۹ در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام دادیم، سعی شد که با کشت SSCs روی یک لایه سلول‌زدایی‌شده بافت بیضه موش صحرایی شرایطی مشابه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

ساختار طبیعی بدن برای اتصال سلول‌ها و تمایز آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی فراهم شود.

روش کار

حیوانات مورد آزمایش در این پروژه در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می‌شدند. محل نگهداری، به صورت روزانه تمیز شده و سیستم تهویه مناسب با استانداردهای موجود بود. تغذیه حیوانات بر اساس نیاز آنها انجام می‌شد.

نمونه‌گیری: در این مطالعه تجربی بافت بیضه از موش‌های سوری تازه متولدشده گرفته شد. در این سن، لوله‌های سمنی‌فروس شامل سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی است. لازم به ذکر است که نمونه‌گیری بر اساس قوانین اخلاقی کار با حیوان‌ها انجام گرفت. برای اطمینان از نتایج کار، تمام مراحل مطالعه با سه بار تکرار زیستی انجام شد. موقع کار با حیوان، اصول مقیدسازی بر اساس استانداردهای موجود انجام شد و قبل از کالبدگشایی حیوانات با روش نخاعی‌کردن سریع و صحیح، موش‌ها کشته شده و پس از اطمینان از مرگ آنها، کالبدگشایی انجام می‌شد. در این مطالعه، چون هدف، تهیه بافت از حیوان بود، لذا حیوانات تحت درمان یا دریافت دارو قبل از کالبدکشایی قرار نگرفتند.

جداسازی سلول‌های بافت بیضه: پس از کالبدشکافی و جداسازی بافت بیضه از حیوان، نمونه‌ها درون ظرف حاوی محیط کشت و آنتی‌بیوتیک به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه پس از شست‌وشوی نمونه با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline-PBS) و برداشتن کپسول بیضه، بافت با استفاده از روش مکانیکی به قطعه‌های کوچک‌تر تقسیم شد. سپس بر اساس پروتکل‌های موجود و با اندکی تغییر، سلول‌های بافت بیضه با روش آنزیمی جدا شدند (۲۱, ۲۲). بافت بیضه در دو مرحله در حضور آنزیم‌های کلاژناز تیپ یک (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، هیالورونیداز (۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و تریپسین (یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در بن‌ماری شیکردار (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۵ دقیقه هضم شد. سلول‌های حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از محلول تریپان بلوی ۰/۴ درصد شمارش‌شده و میزان زنده مانی آن‌ها بررسی شد.

کشت سلول‌های جداشده و تکثیر SSCs

- سلول‌های حاصل از هضم آنزیمی بافت بیضه در محیط کشت DMEM:F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco, USA)) همراه با ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA) کشت داده شدند. با توجه به اینکه تعداد SSCs نسبت به سلول‌های سرتولی کمتر است و دیرتر به کف ظرف کشت متصل می‌شوند و برای جداسازی بیشتر این سلول‌ها، پس از یک شبانه‌روز از کشت اولیه، محیط رویی سلول‌ها برداشته شد و برای جداسازی سلول‌هایی که هنوز به بستر متصل نشدند سانتریفیوژ انجام شد. پس از سانتریفیوز و برای رشد اختصاصی SSCs، سلول‌ها در ظروف کشت پوشش داده‌شده با ژلاتین ۰/۲ درصد و محیط کشت DMEM:F12 همراه با ۵ درصد KSR (KnockOut Serum Replacement, Gibco, USA) و فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor- EGF, Sigma, USA) به مقدار ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast growth factors- FGF, Sigma, USA) به مقدار ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، فاکتور رشد مشتق از گلیا (Glial cell-derived neurotrophic factor-GDNF, Sigma, USA) به مقدار ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و فاکتور مهارکننده لوسمی (Leukemia inhibitory factor- LIF, Sigma, USA) به مقدار ۱۰۳ واحد در میلی‌لیتر کشت داده شده و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند (۲۳).

- تهیه داربست سلول‌زدایی‌شده (DTM) از بیضه موش صحرایی: پس از کالبدشکافی، بیضه موش صحرایی در ظرف حاوی PBS و در ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. بافت پس از چند بار شست‌وشو در بافر PBS به مدت ۲۴ ساعت

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

در فریزر قرار گرفت و بعد از انجماد، برش‌هایی با قطر ۱۰۰ میکرومتر از آن تهیه شد. برای سلول‌زدایی، لایه‌های بافتی به مدت ۲۴ ساعت در محلول یک درصد سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate -SDS) قرار گرفتند. سپس به مدت دو ساعت به ظرف حاوی PBS منتقل شدند تا شوینده از آن‌ها خارج شود. بافت سلول‌زدایی شده به مدت یک ساعت در اتانول ۷۰ درصد استریل شد و پس از شست‌وشو دوباره به مدت دو ساعت در PBS استریل قرار گرفت. بعد از سلول‌زدایی بافت بیضه برای اطمینان از نبود سلول در بافت، DNA آن با استفاده از کیت(QIAamp DNA (mini kit -Qiagen, Germany و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. بررسی DNA استخراج‌شده نشان داد که کل DNA از بافت حذف شده است.

- **بررسی بافت با میکروسکوپ الکترونی:** برای بررسی ساختار سه بعدی بافت، پس از سلول‌زدایی و بعد از کشت دوباره سلول، نمونه‌ها در این دو مرحله با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند. برای آماده‌سازی قبل از تصویربرداری، ابتدا بافت‌ها در گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد فیکس شده و بعد از شست‌وشو در PBS به مدت دو ساعت در تتراکسید اسمیوم یک درصد قرار گرفتند. پس از آبگیری با درجه‌های صعودی اتانول، نمونه با پوششی از طلا- پالادیوم پوشانده شد و ساختار بافت بعد از سلول‌زدایی و پس از کشت سلول روی آن با میکروسکوپ بررسی شد.

- **کشت و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی روی بستر سلول‌زدایی‌شده:** پس از گذشت سه هفته از کشت و تکثیر SSCs، برای بررسی اثر DTM در کشت و تمایز این سلول‌ها، ابتدا یک لایه از DTM کف پلیت ۲۴ حفره قرار گرفت. سپس تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$سلول به هر حفره اضافه شد. برای بررسی تأثیر داربست روی تمایز SSCs هم‌زمان در شرایط مشابه، سلول‌ها در پلیت ۲۴ حفره بدون حضور DTM قرار گرفتند.

سلول‌ها در هر دو گروه به مدت دو هفته در محیط کشت تمایزی با پایه DMEM:F12 به همراه ۵ درصد KSR، ۵ درصد FBS، ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انسولین (Gibco, USA)، $۱۰^{-۷} \times ۳/۳$ مولار رتینوئیک اسید (Sigma, USA)، $۱۰^{-۴}$ مولار ویتامین C (Sigma, USA)، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین E (Sigma, USA)، ۱ مولار پیرووات (Sigma, USA)، $۲/۵ \times ۱۰^{-۵}$ واحد FSH (Merk, USA) و $۱۰^{-۷}$ مولار تستوسترون (Sigma, USA) کشت داه شدند. در طول دوره کشت محیط تمایزی هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض شد.

- **تأیید هویت SSCs با روش ایمونوسیتوشیمی (ICC):** برای تأیید هویت کولونی‌های حاصل از رشد SSCs، قبل از شروع تمایز این سلول‌ها با آنتی‌بادی GFRα1 (Thermo Scientific, UK) و PLZF (Santa cruz, USA) و با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند. برای این منظور پس از فیکس سلول‌ها در پارافرم آلدهید ۴ درصد، برای نفوذپذیری غشا، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول تریتون ۰/۳ درصد (Sigma, USA) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از شست‌وشو با PBS، ۱۰ درصد سرم بز (Sigma, USA) به سلول‌ها اضافه شد. پس از آن سلول‌ها به مدت یک شب در حضور آنتی‌بادی اولیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها بعد از این مدت شسته شده و در حضور آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفتند. سپس سلول‌ها شسته شده و DAPI اضافه شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلوئوروسنت (Olympus, Japan) و با عدسی ۴۰۰ برای تأیید مارکرها بررسی شدند.

روش Real-time PCR: پس از چهار هفته کشت تمایزی، RNA سلول‌های کشت‌داده‌شده روی DTM و بستر دوبعدی با استفاده از محلول ترایزول (Qiagen, Germany) استخراج شد. از RNA استخراج‌شده با استفاده از کیت سنتز (Takara, Japan) cDNA و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از دستگاه Real-time PCR (Applied Bio systems, USA) و کیت (Tli RNaseH Plus, Japan) SYBR Premix Ex Taq Kit، سطح بیان ژن‌های پیش‌میوزی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

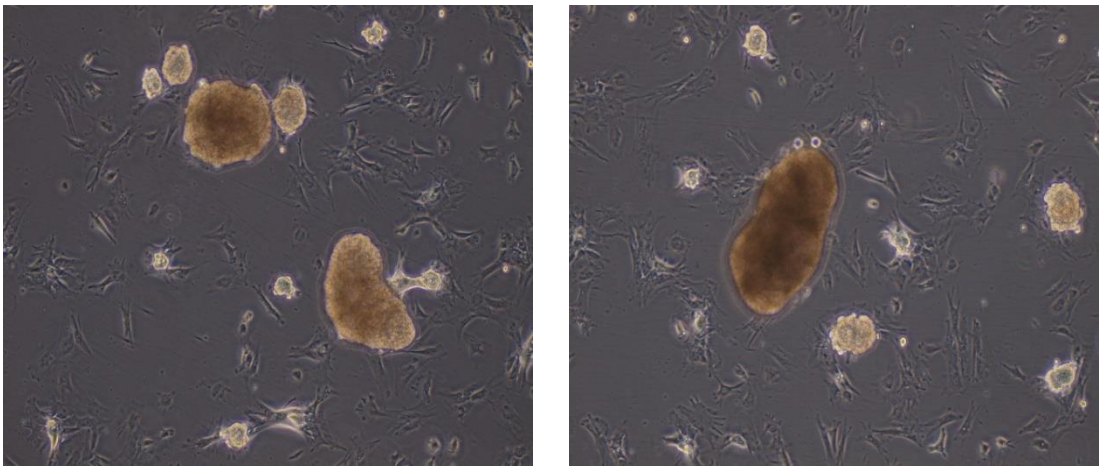
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

(شامل: PLZF و OCT4) و ژن‌های میوزی (شامل: SCP3 و Protamine-2) بررسی شد.

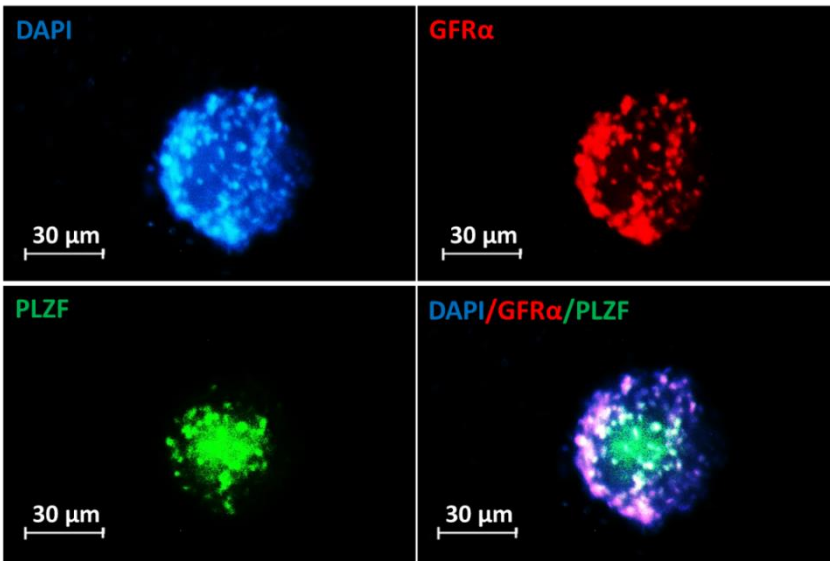
آنالیز داده‌ها: محاسبه‌های آماری برای تعیین وجود اختلاف معنادار در نتایج حاصل از Real-time PCR توسط نرم‌افزار Graph Pad Prism 6 با روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) انجام شد. در این محاسبه‌ها، اختلاف با $P<0.05$ معنادار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأیید هویت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs): حدود یک هفته پس از کشت، کولونی‌های حاصل از تکثیر SSCs مشاهده شد (شکل۱). پس از سه هفته کشت و تکثیر، برای تأیید هویت، کولونی‌ها با آنتی‌بادی‌های PLZF و GFRα1 و با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند. نتایج نشان دادند که اکثر کولونی‌ها این دو مارکر را بیان می‌کنند (شکل۲).



شکل ۱- تصویر تهیه‌شده با میکروسکوپ نوری از کولونی‌های حاصل از تکثیر SSCs که به مدت سه هفته کشت داده شدند.



شکل ۲- تصویر تهیه‌شده با میکروسکوپ فلوئوروسنت از کولونی‌های حاصل از تکثیر SSCs. تأیید هویت این سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضدمارکرهای PLZF و GFRα1 و با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. مشاهده می‌شود که اکثر سلول‌های واقع در کولونی هر دو مارکر را بیان می‌کنند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

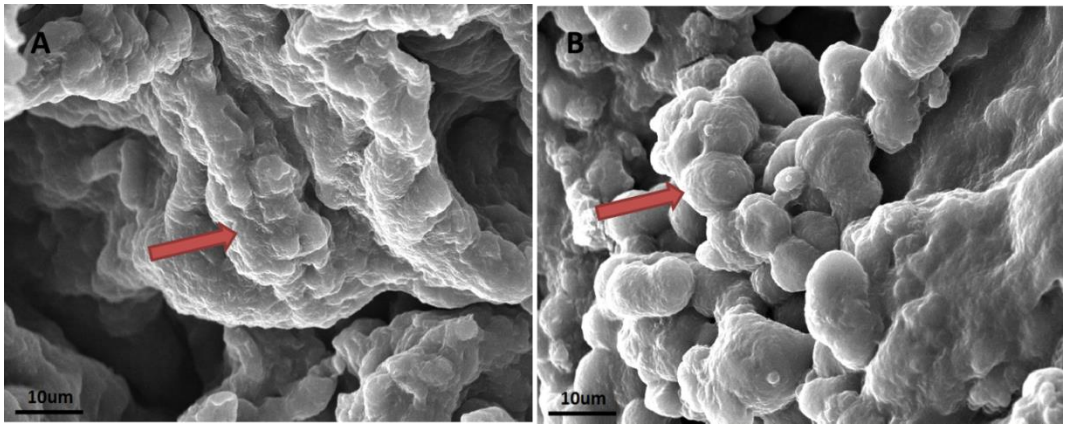
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

ارزیابی ساختار سه‌بعدی DTM با میکروسکوپ الکترونی

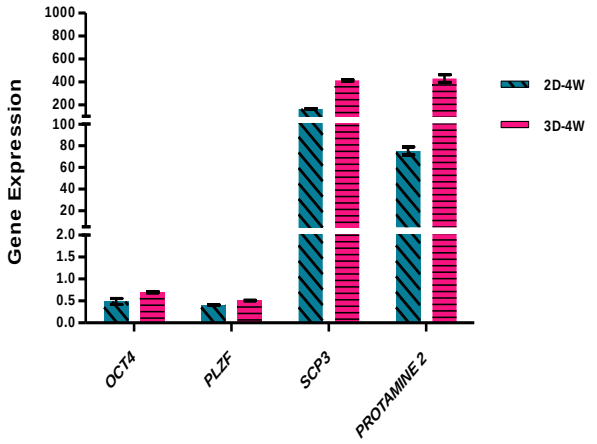
بررسی ساختار سه بعدی DTM با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که ضمن حفظ ساختار، تمام نقاط بافت از جمله لوله‌های سمنی‌فروس به‌طور کامل عاری از سلول شده‌اند. همچنین بررسی میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلول‌ها پس از کشت به خوبی روی DTM نشسته‌اند (شکل ۳).

بررسی بیان ژن با استفاده از Real time PCR

چهار هفته پس از کشت تمایزی با استخراج RNA از سلول‌های کشت یافته روی DTM و بستر دوبعدی بیان ژن‌های پیش‌میوزی (شامل: OCT4، PLZF) و ژن‌های میوزی (شامل: SCP3 و Protamine-2) با روش qPCR بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های میوزی به میزان معناداری روی بستر DTM بیشتر است (نمودار ۱).



شکل ۳- تصویر تهیه‌شده با میکروسکوپ الکترونی از DTM نشان می‌دهد که ضمن حفظ ساختار بافت، سلول‌ها به طورکامل از آن خارج شدند (A). عکس تهیه‌شده از DTM پس از کشت سلول‌ها روی آن نشان می‌دهد که سلول‌ها به خوبی روی این بستر نشسته‌اند (B).



نمودار ۱- بررسی میزان بیان ژن‌های پیش‌میوزی و میوزی پس از چهار هفته کشت تمایزی SSCs روی بستر دو بعدی و DTM با استفاده از Real-time PCR. نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان ژن‌های میوزی به میزان معناداری روی بستر DTM بیشتر است (P≤0.01).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که SSC در شرایط کشت سه‌بعدی حاصل از DTM توانسته است به میزان قابل قبولی به سلول‌های جنسی بالغ تمایز یابد.

در بدن، سلول‌های SSCs در لوله‌های اسپرم‌ساز قرار گرفته‌اند. ارتباطی که در این لوله‌ها بین سلول‌های اسپرماتوگونی با ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های سرتولی ایجاد می‌شود، در تکثیر و تمایز این سلول‌ها نقش بسزایی دارد (۲۴, ۲۵). از آنجاکه کشت سلول روی بستر دو بعدی نمی‌تواند شرایطی مشابه بدن برای رشد و تمایز سلول‌های بنیادی ایجاد کند(۱)، استفاده از بسترهای سه بعدی مورد توجه قرار گرفته است. داربست‌های سنتتیک و طبیعی از انواع داربست‌های استفاده شده در تحقیقات هستند. امروزه استفاده از داربست‌های طبیعی

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

مشتق از بافت‌های سلول‌زدایی شده مورد توجه خاص محققان قرار گرفته است، زیرا در این داربست‌ها، با فرآیند سلول‌زدایی، آنتی‌ژن‌های سلولی حذف می‌شوند، اما بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و عملکردی ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌شوند(۲۶). مطالعه‌ها بسیاری گزارش کرده‌اند که ماتریکس خارج سلولی نقش مهی در القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مختلف دارد (۲۷, ۲۸). برقراری ارتباط گیرنده‌های سطح سلول نظیر اینتگرین با ماتریکس خارج سلولی سبب تغییر مسیرهای سیگنالینگ درون سلول از جمله بیان ژن‌ها، سازماندهی اسکلت درون سلولی، رشد سلول، مهاجرت سلولی و تمایز سلولی می‌شود (۲۹-۳۱). همچنین، محققان گزارش کرده‌اند که مسیر سیگنالینگ وابسته به اینتگرین در سلول‌های جنسی، نقش مهمی در زنده‌مانی و تمایز سلول‌های جنسی در بافت بیضه دارد (۳۲).

بافت‌های مختلف بر حسب نوع و عملکردشان دارای ترکیب‌های ماتریکس خارج سلولی اختصاصی هستند، در این مطالعه از بستر سلول‌زدایی‌شده بافت بیضه برای تمایز SSCs استفاده شد. نتایج نشان داد که SSCs در شرایط کشت سه بعدی حاصل از DTM به میزان معناداری نسبت به شرایط کشت دو بعدی به سلول‌های جنسی بالغ تمایز پیدا کرده است. کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی سبب از بین‌رفتن ویژگی‌های منحصر به فرد این سلول‌ها می‌شود، بنابراین دستیابی به سیستم کشتی که بتواند تا حد ممکن شرایط مشابه بدن را برای سلول‌ها فراهم کند می‌تواند در حفظ، تکثیر و تمایز این سلول‌ها مؤثر باشد. مطالعه‌های گسترده‌ای روی کشت و تمایز SSCs در انواع بسترهای سه‌بعدی شده است (۱۴, ۲۳, ۳۳-۳۸). Lee و همکارانش در سال ۲۰۰۶ سلول‌های حاصل از بافت بیضه رت‌های ۱۸ روزه را روی بستر سه‌بعدی حاصل از کلاژن و کلاژن همراه با ماتریژل به مدت ۲۲ روز کشت دادند و پس از این دوره، بیان مارکرهای TP2 و Protamine2 را بررسی کردند و مشاهده کردند بیان این مارکرها در بستر های سه بعدی به میزان معناداری بیشتر از بستر دو بعدی است(۳۷).

در مطالعه‌ای که Huleihel و همکارانش در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، SSCs میمون رزوس نابالغ را روی محیط کشت SACS و MCS کشت داده و بیان مارکرهای CREM و آکروزین را مشاهده کردند (۲۳). Talebi و همکارانش در سال ۲۰۱۸، SSCs موش‌های سه روزه را بر روی SACS اصلاح شده با نانوفیبر به مدت دو هفته کشت دادند و بیان ژن‌های Plzf, Gfrα1, c-Kit را مشاهده کردند(۳۹). در سال ۲۰۱۸ Gholami و همکارانش، SSCs انسانی را روی بستر سه بعدی حاصل از SACSکشت دادند و پس از چهار هفته کشت تمایزی، با بررسی بیان مارکرهای SCP3, MVH, PLZF و Integrinα مشاهده کردند که بقا و تمایز SSCs در بستر سه بعدی به میزان معناداری بیشتر از بستر دو بعدی است (۳۴).

نتایج تحقیق‌های انجام شده، اهمیت بستر سه بعدی در تمایز سلول‌های بنیادی را نشان می‌دهد. در این مطالعه قبل از کشت سلول روی DTM ساختار سه بعدی آن با میکروسکوپ بررسی شد و مشاهده شد ساختار بافت ضمن سلول‌زدایی به خوبی حفظ شده است. سپ SSCsموش‌های تازه متولدشده که به مدت سه هفته در آزمایشگاه تکثیر شده بودند با روش ایمونوسیتوشیمی و با آنتی بادی‌های GFRα1 و PLZF بررسی شدند و پس از تأیید هویت روی داربست طبیعی حاصل از بافت بیضه کشت داده شدند. با بررسی بیان ژن‌های پیش‌میوزی (OCT4, GFRα1) و میوزی (SCP3 ,Protamine-2) اختلاف معنادار ($P<0.05$) بقا و تمایز این سلول‌ها در بستر سه بعدی نسبت به دوبعدی نشان داده شد که می‌تواند به دلیل شرایط مناسبی که بستر سلول‌زدایی شده در شکل‌گیری و تماس سلول‌ها با یکدیگر و با ماتریکس ایجاد می‌کند باشد تا ضمن حفظ بیشتر سلول‌های اولیه، شرایط مناسبی برای تکثیر و تمایز این سلول‌ها فرآهم شود.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

از طرف دیگر، کشت روتین دو بعدی سلول‌ها در محیط آزمایشگاه، نمی‌تواند آرایش فضایی سلول‌های جنسی در بافت بیضه را شبیه‌سازی کند که این مساله خود به عنوان نقطه ضعف این مدل کشت است (۴۰). همچنین فقدان اتصال گیرنده پشتی سلول با داربست کشت دوبعدی سبب ایجاد استرس در سلول‌ها و کشیدگی بیش از حد آن‌ها در محیط کشت می‌شود (۴۱). بنابراین استفاده از داربست‌های سه بعدی طبیعی غنی از ماتریکس خارج سلولی می‌تواند شرایط بهتری را برای کشت و تمایز سلول‌ها فراهم آورد.

نتیجه‌گیری

نتایج این یافته‌ها نشان داد که کشت SSCs بر روی DTM سبب حفظ، تکثیر، و تمایز بیشتر SSCs می‌شود و می‌تواند به عنوان راهکاری برای مطالعه‌های بیشتر اسپرماتوژنز در آزمایشگاه و امیدی برای درمان ناباروری در مردان باشد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در دانشگاه علوم پزشکی تهران، بررسی، و با کد IR.TUMS.REC1394.1751 ثبت شده است.

تأمین بودجه

بودجه این مطالعه از محل طرح مصوب با کد ۳۵۴۸۱ در دانشگاه علوم پزشکی تهران، تأمین شده است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

References

1. Galdon G, Atala A, Sadri-Ardekani H. In vitro spermatogenesis: how far from clinical application? Current urology reports. 2016;17(7):49.

2. Movassagh SA, Movassagh SA, Dehkordi MB, Pourmand G, Gholami K, Talebi A, et al. Isolation, identification and differentiation of human spermatogonial cells on three-dimensional decellularized sheep testis. Acta Histochemica. 2020;122(8):151623.

3. Gholami K, Pourmand G, Koruji M, Ashouri S, Abbasi M. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system. Stem cell research & therapy. 2018;9(1):1-8.

4. Movassagh SA, Dehkordi MB, Koruji M, Pourmand G, Farzaneh P, Movassagh SA, et al. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of spermatogonial stem cells on decellularized testicular matrix. Galen Medical Journal. 2019;8:e1565.

5. Schlatt S. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. Molecular and cellular endocrinology. 2002;187(1-2):107-11.

6. Ibtisham F, Honaramooz A. Spermatogonial stem cells for in vitro spermatogenesis and in vivo restoration of fertility. Cells. 2020;9(3):745.

7. Jahnukainen K, Stukenborg J-B. Present and future prospects of male fertility preservation for children and adolescents. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2012;97(12):4341-51.

8. Sinha N, Whelan EC, Brinster RL. Isolation, cryopreservation, and transplantation of spermatogonial stem cells. Chimera Research: Springer; 2019. p. 205-20.

9. Braye A, Tournaye H, Goossens E. Setting up a cryopreservation programme for immature testicular tissue: lessons learned after more than 15 years of experience. Clinical Medicine Insights: Reproductive Health. 2019;13:1179558119886342.

10. Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. Human reproduction update. 2016;22(6):744-61.

11. Sadri-Ardekani H, Atala A. Testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell transplantation to restore fertility: from bench to bedside. Stem cell research & therapy. 2014;5(3):1-10.

12. Aliakbari F, Yazdekhasti H, Abbasi M, Hajian Monfared M, Baazm M. Advances in cryopreservation of spermatogonial stem cells and restoration of male fertility. Microscopy research and technique. 2016;79(2):122-9.

13. Katz DJ, Kolon TF, Feldman DR, Mulhall JP. Fertility preservation strategies for male patients with cancer. Nature reviews Urology. 2013;10(8):463-72.

14. Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, et al. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. Journal of andrology. 2008;29(3):312-29.

15. Jabari A, Gilani MAS, Koruji M, Gholami K, Mohsenzadeh M, Khadivi F, et al. Three-dimensional co-culture of human spermatogonial stem cells with Sertoli cells in soft agar culture system supplemented by growth factors and Laminin. Acta Histochemica. 2020;122(5):151572.

16. Helm RF, Potts M. Extracellular matrix (ECM). Ecology of cyanobacteria II: Springer; 2012. p. 461-80.

17. Pizzo AM, Kokini K, Vaughn LC, Waisner BZ, Voytik-Harbin SL. Extracellular matrix (ECM) microstructural composition regulates local cell-ECM biomechanics and fundamental fibroblast behavior: a multidimensional perspective. Journal of applied physiology. 2005;98(5):1909-21.

18. Navarro-Tableros V, Herrera Sanchez MB, Figliolini F, Romagnoli R, Tetta C, Camussi G. Recellularization of rat liver scaffolds by human liver stem cells. Tissue Engineering Part A. 2015;21(11-12):1929-39.

19. Crapo PM, Tottey S, Slivka PF, Badylak SF. Effects of biologic scaffolds on human stem cells and implications for CNS tissue engineering. Tissue Engineering Part A. 2014;20(1-2):313-23.

20. Hoshiba T, Chen G, Endo C, Maruyama H, Wakui M, Nemoto E, et al. Decellularized extracellular matrix as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. Stem cells international. 2016;2016.

21. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

germline stem cells. Biology of reproduction. 2003;69(2):612-6.

22. 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(19):2127-34.

23. Huleihel M, Nourashrafeddin S, Plant TM. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (Macaca mulatta). Asian journal of andrology. 2015;17(6):972.

24. Dobrinski I. De novo morphogenesis of functional testis tissue after ectopic transplantation of isolated cells. Organogenesis. 2007;3(2):79-82.

25. Oatley JM, Brinster RL. [11]-Spermatogonial Stem Cells. Methods in enzymology. 2006;419:259-82.

26. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. International journal of polymer science. 2011;2011.

27. Campbell A, Wicha MS, Long M. Extracellular matrix promotes the growth and differentiation of murine hematopoietic cells in vitro. The Journal of clinical investigation. 1985;75(6):2085-90.

28. Chen SS, Fitzgerald W, Zimmerberg J, Kleinman HK, Margolis L. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation. Stem Cells. 2007;25(3):553-61.

29. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. Annual review of cell and developmental biology. 1996;12(1):463-519.

30. Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. Nature cell biology. 2002;4(4):E65.

31. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I, editors. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. Seminars in cancer biology; 2005: Elsevier.

32. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiological reviews. 2002;82(4):825-74.

33. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature. 2011;471(7339):504.

34. Gholami K, Pourmand G, Koruji M, Sadighigilani M, Navid S, Izadyar F, et al. Efficiency of colony formation and differentiation of human spermatogenic cells in two different culture systems. Reproductive biology. 2018.

35. Gholami K, Pourmand G, Koruji M, Ashouri S, Abbasi M. Organ culture of seminiferous tubules using a modified soft agar culture system. Stem cell research & therapy. 2018;9(1):249.

36. Khajavi N, Akbari M, Abolhassani F, Dehpour AR, Koruji M, Roudkenar MH. Role of somatic testicular cells during mouse spermatogenesis in three-dimensional collagen gel culture system. Cell Journal (Yakhteh). 2014;16(1):79.

37. 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.

38. Orwig KE, Ryu B-Y, Avarbock MR, Brinster RL. Male germ-line stem cell potential is predicted by morphology of cells in neonatal rat testes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(18):11706-11.

39. Talebi A, Gilani MAS, Koruji M, Ai J, Rezaie MJ, Navid S, et al. Colonization of Mouse Spermatogonial Cells in Modified Soft Agar Culture System Utilizing Nanofibrous Scaffold: A New Approach. Galen Medical Journal. 2019;8:1319.

40. Panula S, Reda A, Stukenborg J-B, Ramathal C, Sukhwani M, Albalushi H, et al. Over Expression of NANOS3 and DAZL in Human Embryonic Stem Cells. PloS one. 2016;11(10):e0165268.

41. Beningo KA, Dembo M, Wang Y-l. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(52):18024-9.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.10.4]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.