مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۲۹۷-۲۸۵)

ارتقاء عملکرد و افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با ماتریکس نانوفیبر پلی‌آمیدی

ملک شاکری[۱]، حمید کهرام[۲]، عبدالحسین شاهوردی[۳]، احمد زارع شحنه[۴] و حسین بهاروند[۵]*
۱، ۲، ۴، دانشجوی دکتری، استادیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳، ۵، استادیار و استاد گروه سلول‌های بنیادی، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۱۴)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر ماتریکس برون‌سلولی نانو رشته‌ای پلی‌آمید بر تکثیر و عملکرد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) بچه موش ۶ رو در محیط *In Vitro* بوده است. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، از بیضه موش ۶ روزه جدا شده و در خانه‌های یک ظرف کشت ۶ خانه‌ای (۳ خانه آن توسط ورقه نانوفیبر پوشانده بوده) به طور جداگانه در حضور فاکتورهای رشد GDNF bFGF و EGF با سه بار تکرار کشت داده شدند. تعداد کلنی‌های SSCs، مساحت کلنی‌ها و تعداد سلول به ازای هر کلنی در روزهای هفتم و دهم در هر گروه اندازه‌گیری شد. از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت جهت بررسی کیفی بیان نشانگرهای پروتئینی α6-Integrin, Thy-1, ß1-Integrin, oct-4, PLZF و C-kit در روز دهم در هر دو گروه استفاده شد. بیان ژن‌های مربوط به سلول‌های زاینده با استفاده از تست RT-PCR در روز دهم پس از کشت در دو گروه مقایسه شد. جهت بررسی عملکرد سلول‌ها در هر دو گروه سلول‌های کلنی‌های حاصله به موش بالغ نابارور شده پیوند زده شد. .برای آنالیز داده‌ها کمی از نرم‌افزار SAS و از مدل خطی عمومی استفاده شد و میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.در آزمایش فاکتوریل انجام شده تعداد کلنی‌های کشت شده بر روی ورقه نانوفیبر به طور معنی‌داری (۰/۰۵) نسبت به کلنی‌های کشت شده در ظرف بدون نانوفیبر بیشتر بود. همچنین تعداد سلول‌ها در هر کلنی و مساحت کلنی‌ها در گروه بدون نانوفیبر کاهش معنی‌داری (۰/۰۵) نسبت به گروه با نانو فیبرداشت. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت نشان داد که کلنی‌ها متشکل از SSCs بودند. زیرا رنگ‌آمیزی برای نشانگرهای α6-Integrin, ß1-Integrin, Thy-1, oct-4, PLZF مثبت و برای نشانگر C-kit به طور نسبی منفی بودند. بر اساس نتایج RT-PCR میزان بیان ژن‌های GFRα-1, Stra8, Vasa, α6, β1, thy-1, Oct-4 در گروه کشت با استفاده از نانوفیبر نسبت به گروه کشت بدون نانوفیبر بیشتر و ژن C-kit در گروه کشت بدون نانو به طور نسبی بیشتر بوده است. در عین حال ژن Nanog به عنوان یک ژن پرتوانی در هر دو گروه بیان نشده است. نتایج نشان داد که استفاده از ماتریکس برون‌سلولی نانو رشته‌ای در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بچه موش ۶ روزه در خالص‌سازی و بهبود کمی و کیفی وهمچنین بر عملکرد سلول‌های SSCs اثر فزاینده دارد.

واژه‌های کلیدی: **سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، ماتریکس نانورشته‌ای، پیوند سلول‌های زاینده.**

* نویسنده مسئول: حسین بهاروند تلفن: ۶۰-۲۲۳۰۷۹-۰۲۱ E-mail: baharvand@royaninstitute.org

مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۲۹۷-۲۸۵)

مقدمه

تحولات علمی در سال‌های اخیر، نگاه جدیدی در تولید مثل حیوانات مزرعه‌ای و استفاده از حیوانات تراریخته[1] را بوجودآورده است. استفاده از علم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی[2] (SSCs) و موفقیت در پیوند سلول‌های زاینده[3] در جوندگان فرصت مناسبی را ایجاد کرده است تا کاربرد آن در علوم دامی مورد توجه قرار گیرد (Herrid et al., 2007; Aponte & de Rooij, 2008) . به طور مثال می‌توان مواردی از قبیل ایجاد امکان باروری برای دام های نابارور، تولید حیوانات تراریخته، تکامل و بهبود تکنیک‌های جدید در کنار تکنیک انتقال اسپرم در سطح تجاری و یا تولید پروتئین‌هایی که جنبه دارویی دارند در شیر بزهای تراریخته با ارزش اقتصادی را نام برد (Honaramooz et al., 2003; Herrid et al., 2007; Aponte & de Rooij, 2008). علیرغم پیشرفت بسیار زیاد استفاده از تکنولوژی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حیوانات آزمایشی، پیشرفت این علم در حیوانات مزرعه‌ای حرکت کندی داشته است. ولی در جوندگان نسبت به سایر گونه‌ها با توجه به شرایط فیزیولوژیکی آنها انجام تحقیقات مؤثرتر و با بازده زمانی بیشتر می‌باشد (Aponte & de Rooij, 2008). در همین رابطه به دلیل این که جمعیت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بیضه در میان سایر سلول‌های زاینده بسیار کم بوده (۰/۰۳٪) و هنوز نشانگرهای اختصاصی در آنها کاملاً شناخته نشده است، بهبود و تکامل تکنیک جداسازی و تکثیر جهت دسترسی به جمعیت زیادتری از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی خالص بسیار مهم می‌باشد (Ehmcke et al., 2006; Aponte et al., 2008). در همین راستا استفاده از ماتریکس برون‌سلولی (ECM)[4] به عنوان یکی از راه‌های مناسب می‌باشد (Schindler et al., 2005) از آن جایی که سلول در محیط *in vivo*، توسط محیط خارج سلولی (ECM) سه بعدی متشکل از فیبرهای در مقیاس نانو احاطه شده و لیگا ندهای شیمیایی گوناگون که در کنش و واکنش با گیرنده‌های سطح سلولی هستند، موجب حمایت آن می‌شوند (Toh et al., 2006)، تقابل و ارتباط بین SSCs و محیط احاطه‌کننده آن‌ها نیز در لوله‌های اسپرم‌ساز[5] موجب تنظیم فعالیت بیولوژیکی سلول‌های مذکور می‌شود (McLean 2005). عواملی که باعث تنظیم این فعالیت می‌گردد توسط مدل‌سازی و کشت این سلول‌ها در محیط کشت مناسب قابل شناسایی است (Hofmann et al., 2005; McLean, 2005).

لذا با توجه به نکات مذکور دانشمندان موفق شدند تا با استفاده از علم نانوتکنولوژی داربست‌های بافتی را بسازند تا به این طریق بتوان از آن در علوم مختلف چون پزشکی، فیزیولوژی و بیولوژی استفاده نمود (Davis et al., 2006; Lodhi et al., 2006). خصوصیات فضایی سه بعدی این گونه از داربست‌ها برای کشت سلول بسیار مناسب بوده و می‌تواند امکان ترمیم بافت‌های آسیب دیده را ایجاد نماید (Ma & Zhang, 1999; Barrilleaux et al., 2006; Sell et al., 2007). داربست‌های سنتزی یا به صورت ژل سه بعدی هستند و یا به صورت سطح سه بعدی که در این نوع دسترسی به سلول و عکسبرداری با میکروسکوپ چشمی راحت‌تر است. در نوع اخیر نیازی نیست که سلول‌ها درون نانوفیبرها فرو روند و به جای آن روی سطح نانوفیبر[6] کشت می‌شوند و این باعث شده کار با نانوفیبر راحت‌تر از کار با ژل باشد (Schindler et al., 2006). سطوح سنتزی اولترا-وب[7]، داربستی سنتزی است که رشته‌های نانوفیبری بر روی آن به صورت نامنظم الکتروسپین[8] شده است و میانگین قطر رشته‌های آن ۲۸۰ نانومتر (مشابه کلاژن) است. این داربست از نظر ساختار مشابه غشای پایه است و می‌توان انتظار داشت مرفولوژی و در نتیجه عملکرد سلول‌های کشت شده بر آن بیشتر به سلول‌های طبیعی نزدیک باشد.

1. Transgene
2. Spermatogonial stem cells
3. Germ cells
4. Extracellular matrix
5. Seminiferous tubules
6. Nanofiber
7. Ultra-web
8. Electrospin

* نویسنده مسئول: حسین بهاروند تلفن: ۶۰-۲۲۳۰۷۹-۰۲۱ E-mail: baharvand@royaninstitute.org

با توجه به مشکلات و محدودیت‌هایی که برای ارزیابی مداخلات صورت گرفته در مطالعه و عملکرد SSCs نسبت به آنها در محیط *in vitro* وجود دارد، یکی از بهترین روش‌های ارزیابی عملکرد SSCs در طی مطالعات و آزمایشات پیوند زدن سلول‌های مذکور به گونه نر نابارور و بررسی عملکرد SSCs از طریق ایجاد کلنی و انجام اسپرماتوژنسیس پس از پیوند است (Brinster & Nagano, 1998; Honaramooz et al., 2005; Goossens et al., 2006). به علاوه استفاده از تکنیک پیوند توانایی محققان را در دستکاری ژنتیکی گونه‌های نر، به خصوص گونه‌های نر حیوانات اهلی افزایش می‌دهد (Dobrinski, 2005; Honaramooz et al., 2005). در این مطالعه اثر نانوفیبر پلی‌پپتیدی به عنوان ECM بر تکثیر و عملکرد SSCs گرفته شده از موش نوزاد و پیوند آن به موش نابارور بالغ مورد بررسی قرار گرفت، تا بتوان با ایجاد راهکارهای عملی جدید گام‌های مؤثری در جهت بهبود کیفیت اسپرماتوژنسیس به خصوص در دام و برطرف کردن نارسایی‌های مربوطه و همچنین حفظ و تولید بیشتر اسپرم‌های با ارزش بالای ژنتیکی و افزایش بازده اقتصادی آن‌ها و به علاوه ایجاد دام‌های تراریخت برداشت.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌ها از بیضه موش نوزاد

سلول‌های لوله‌های اسپرم‌ساز از بیضه بچه موش ۶ روزه نژاد NMRI خریداری شده از مؤسسه پاستور طی دو مرحله هضم آنزیمی جدا شدند. روش جداسازی در این مطالعه با استفاده از روش تعدیل یافته[1] (Ogawa et al., 1997) انجام شد که به طور خلاصه به شرح زیراست:

موش‌ها با استفاده از کلروفرم کشته شدند و بیضه آنها با استفاده از پنس و قیچی استریل در کنار شعله و در اسرع وقت جدا شده و در پلیت حاوی بافر فسفات (PBS)[2] قرارداده شدند پس از آن کپسول بیضه‌ها با استفاده از قیچی جدا شده و کلاف لوله‌های اسپرم‌ساز به پتری دیش حاوی محیط DMEM[3] منتقل شدند و لوله‌ها با کمک پنس و قیچی و همچنین پیپتاژ از هم جدا شده و برای دومرحله هضم آنزیمی آماده شدند. مرحله اول هضم آنزیمی: سوسپانسیون حاوی لوله‌های اسپرم‌ساز یک بار با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شدند سپس محلول روئی با محلول آنزیمی شامل کلاژناز و دیسپاز و هیالورونیداز (Gibco, UK) هر کدام به ترتیب با غلظت ۲mg/ml، ۱mg/ml، ۲mg/ml جایگزین شد. محلول را پس از پیپتاژ (در کنار شعله به مدت ۱۰ دقیقه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده وبعد از آن مجددا پیپتاژ کرده تا سلول‌های بین لوله‌ای از لوله‌ها جدا شود. در مرحله دوم هضم آنزیمی، سوسپانسیون حاصل از مرحله اول با دور ۱۲۰۰RPM به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی که حاوی سلول‌های بین لوله‌ای است با آنزیم تازه جایگزین شد. در این مرحله برای جداسازی بهتر سلول‌ها آنزیم دیناز با غلظت ۰/۸ mg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA) به محلول اضافه گردید. پیپتاژ و انکوباسیون مانند مرحله قبل تا حد محو شدن لوله‌ها و آزاد شدن سلول‌های منفرد ادامه می‌یابد. سپس سوسپانسیون سلولی را برای حذف قطعات لوله‌ای باقیمانده از فیلتر نایلونی ۴۰ µm عبور داده وپس از سانتریفیوژ سوسپانسیون حاصل، (با دور ۱۵۰۰rpm) به مدت ۵ دقیقه، سلول‌های حاصل برای کشت آماده می‌شود.

کشت کوتاه مدت سلول‌های اسپرماتوگونی

سلول‌های منفرد استخراج شده از بیضه موش‌های ۶ روزه به ترتیبی که ذکر شد به کمک لام نئوبار شمارش شده و سپس سلول‌ها به تعداد 1×10^{6} به طور مساوی در خانه‌های یک ظرف کشت ۶ خانه‌ای[4] توزیع شدند. قابل ذکراست که ظرف‌های کشت مربوطه را قبلا به دو گروه تقسیم کرده و کف ظروف مربوط به یک گروه را ابتدا با ژل آگارز ۱٪ (Invitrogen) پوشانده و سپس ورقه نانوفیبر را بر آن می‌گذاریم تا به این ترتیب سلول‌ها فقط به ورقه نانوفیبر متصل شوند (نانوفایبری که در این

1. Modifiy
2. Phosphate Buffered Saline
3. Dulbecco's Modified Eagle medium
4. 6 Well plate

تحقیق استفاده شد، ultra-web synthetic ECM نام دارد که با واحدهای پلی‌آمینی پوشیده شده است و دارای توپوگرافی رشته‌ای شبیه به محیط *in vivo* است که می‌تواند منجر به نتایج دقیق بیولوژیکی شود (Schindler et al., 2005). سپس ظروف کشت در هر دو گروه پیش از کشت با محلول ژلاتین (۱/ ۰٪ در PBS) (Gibco, UK) پوشانده شده و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند (Guan et al., 2009). پس آن محلول ژلاتین از سطح ظرف کشت جمع‌آوری شده و برای کار آماده گردید. محیط کشت به کار رفته برای سلول‌ها شامل DMEM حاوی ۱٪ سرم FBS[1] (Gibco, UK) بوده که با فاکتورهای رشد زیر غنی‌سازی گردید.

۱. GDNF با غلظت ۴۰ ng/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)
۲. EGF با غلظت ۲۰ ng/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)
۳. bFGF با غلظت ۱۰ng/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)

سلول‌ها در دمای ۳۲ºC (Kanatsu-Shinohara et al., 2003) و فشار ۵٪ CO_2 انکوبه شده و هر ۷۲ ساعت محیط آنها تعویض می‌گردید. از ۵-۳ روز بعد کلنی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی ظاهر شد. در طول مدت کشت (۱۰ روز) تست های مربوط به تعیین هویت و تست‌های کمی و کیفی در دو روز (۷ و ۱۰) انجام گرفت.

ارزیابی کلنی‌زایی در سلول‌های اسپرماتوگونی

کلنی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۷ و ۱۰ پس از کشت از نظر تعداد و مساحت کلنی‌ها و تعداد سلول به ازای هر کلنی مورد ارزیابی قرار گرفت. شمارش سلول‌ها با استفاده از ورقه شفاف شطرنجی شده که به زیر ظرف کشت ۶ خانه‌ای متصل شده بود صورت گرفت. اندازه‌گیری مساحت کلنی‌ها با کمک میکروسکوپ معکوس[2] (Ziess, Germany) مجهز به دوربین و نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری تعداد سلول به ازای هر کلنی ابتدا به طور تصادفی تعداد مشخصی از کلنی‌ها به طور مکانیکی توسط پیپت پاستور از کف ظرف کشت جدا شد و سپس بوسیله آنزیم تریپسین (۰/۲۵٪) سلول‌ها از هم جدا و منفرد شده و توسط لام نئوبار شمارش گردید.

تعیین هویت سلول‌های اسپرماتوگونی

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

جهت شناسایی سلول‌ها در روز دهم رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنت برای نشانگرهای پروتئینی سطح سلولی شامل α6-Integrin, Thy-1, ß1-Integrin, Oct4, PLZF و C-kit انجام شد. به این ترتیب که ابتدا کلنی‌های کشت شده دو بار به مدت ۵ دقیقه در بافرفسفات شستشو شدند. جهت ثبوت به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدئید ۴ درصد قرارگرفتند. بدنبال آن شستشو در بافرفسفات به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تسهیل نفوذ آنتی‌بادی به داخل سلول از تریتون ۱۰۰X (۱ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. سپس نمونه‌ها در بافر فسفات به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. مهارسازی پروتئین‌های غیراختصاصی بوسیله استفاده از سرم بز ۱۰ درصد (Sigma, USA) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ºC انجام شد. سپس به کلنی ها، آنتی بادی اولیه[3] با رقت ۱/۱۰۰ برای Oct-4، Plzf، Thy-1 integrin-β1/α_6, و ۱/۲۰۰ برای c-kit اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ºC نگهداری شدند. بعد از این مرحله و سه بار شستشو با بافر فسفات هر بار به مدت ۵ دقیقه، روی نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه[4] (Sigma, USA) با غلظت ۱/۲۰۰ در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد. پس از سه بار شستشو با بافر فسفات (هر بار به مدت ۵ دقیقه) نمونه‌ها با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. در کنار نمونه‌های مورد آزمایش، یک نمونه شاهد نیز رنگ‌آمیزی شد با این تفاوت که مرحله آنتی‌بادی اولیه از فرایند رنگ‌آمیزی حذف شد. برای رنگ‌آمیزی هسته از رنگ Hoechst استفاده شد. از نمونه‌های رنگ شده و گروه شاهد به کمک میکروسکوپ فلوروسنت و فیلتر مناسب عکس‌برداری شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

برای ارزیابی بیان رونوشت‌های[5] ژن‌های مورد نظر در سلول‌های زاینده در مقایسه با ژن‌های سلول‌های پرتوان

1. Fetal Bovine Serum
2. Invert-phase microscope
3. Primary antibody
4. Goat FITC-conjugated anti mouse IgG (secondry antibody
5. Transcripts

که در ذیل نام آنها آمده است از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) استفاده شد.

جدول ۱- نام و مشخصات پرایمر ژن‌های خاص سلول‌های زاینده و ژن‌های پرتوانی* سلول‌های بنیادی شامل (OCT-4،NANOG) و ژن housekeeping (GAPDH)

Genes	Primer sequences (5´-3´)	Annealing Temperature (°C)	Size (bp)
Stra8	F: 5' ACT CCA TTA AAC CAG GAA CCA 3' R: 5' CCC ATT TAA TCT CCT CCT TCT C 3'	59-61	118
Mvh(VASA)	F: 5' GAT AAT CAT TTA GCA CAG CCT C 3' R:5' GTC AAC AGA TGC AAA CAC AG 3'	59-60	149
α_6	F:5' CTC AGA ATA TCA AGC TCC CT 3' R: 5' AAA CAC TAA TAG AGC CAG CA 3'	60	148
GFRα-1	F:5' AAT TGT CTG CGT ATC TAC TGG 3' R: 5' ACA TCT GAT ATG AAC GGG AC 3'	60	130
Thy-1	F:5' CYC TCC TGC TCT CAG TCT TG 3' R:5' AGT TAT CCT TGG TGT TAT TCT CAT 3'	60	119
B1	F:5' GAC ATT ACT CAG ATC CAA CCA 3' R: 5' AGG TAG TAG AGA TCA ATA GGG T 3'	60	115
C-kit	F: 5' CTA AAG ATG AAC CCT CAG CCT 3' R: 5' GCA TAA CAC ATG AAC ACT CCA 3	60	142
Oct-4	F: 5' GAA CTA GCA TTG AGA ACC GT 3' R: 5' CAT ACT CGA ACC ACA TCC TTC 3'	60-61	129
Nanog	F: 5' CCT ATT AAG GTG CTT GCT TGT C 3' R : 5' TCG GTT CAT CAT GGT ACA GTC 3'	60	138
GAPDH	F: 5' CAA CTC CCA CTC TTC CAC TT3' R: 5' GCA GCG AAC TTT ATT GAT GGT A 3'	60	125

*. Pluripotent stem cells

برای انجام RT-PCR، کلنی‌های سلول‌های اسپرماتوگونی در روز دهم پس از کشت توسط پیپتاژ از کف ظرف کشت جدا و بعد بوسیله آنزیم تریپسین (۰/۲۵٪) سلول‌ها از هم جدا و منفرد گردیدند. سپس سلول‌ها دو بار با PBS شستشو داده شد و با استفاده از RNX (Cinnagen, IRAN)، جداسازی RNA (Total RNA) صورت گرفت. با استفاده از نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) رشته‌ی DNA از روی الگوی RNA ساخته شد. در این فرایند برای سنتز cDNA از پرایمرهای هگزامر تصادفی (Frementaz, USA) برای شروع فرایند نسخه‌برداری معکوس استفاده گردید. با استفاده از آنزیم SmartTag (Cinnagen, IRAN) همراه با پرایمرهای antisense, sense (جدول۱) نسخه‌برداری معکوس انجام شد. توالی پرایمرهای طراحی شده Reverse و Forward جهت انجام PCR در جدول مذکور آمده است. جهت آشکار کردن بیان ژن‌ها برروی ژل آگارز، از ژل با غلظت ۲٪ (Agarose, molecular grade از شرکت Cinnagen) در بافر TAE ۱ X استفاده شد. سپس به هر نمونه محصول PCR رنگ مناسب اضافه شده و ۱۰µl از هر نمونه در هر چاهک ژل قرار گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با رنگ اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) انجام شد. سپس با دستگاه ترانس لومینوتور UV (Uvidoc, UK) مورد ارزیابی قرار گرفت.

پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

همانگونه که ذکر شد برای بررسی عملکرد سلول‌های SSC، سلول‌های مذکور به موش نابارور پیوند زده شدند. برای انجام پیوندی مناسب و موفق، لازم است که الگوی درستی برای آماده سازی حیوان نابارور گیرنده فراهم نمود. در این مطالعه با استفاده از روش بکار گرفته توسط Brinster (1994) و Ogawa et al. (1997) از

ماده بوسولفان به عنوان عامل آلکالین‌کننده (به مقدار ۴۰ mg/kg وزن موش نر بالغ) استفاده شد. به طوری که لوله‌های اسپرم‌ساز موش گیرنده تقریباً از سلول خالی گردید و برای پذیرش سلول‌های دهنده آماده شد. تکنیک پیوند نیز منطبق بر تکنیک استفاده شده توسط Ogawa et al. (1997) بود. سلول‌هایی که جهت تزریق (پیوند) استفاده شد از ۴۸ ساعت قبل به وسیله ماده ۵-برمو-۲- داکسی یوریدین (Brdu) نشان‌دار شده تا امکان ره‌گیری آنها پس از پیوند از طریق ایمنوهیستوشیمی فراهم گردد (مقدار استفاده شده از Brdu برابر با ۱۰mg/ml در محیط کشت بود). برای هر بار تزریق سلولی (پیوند) تعداد ۱۰۰/۰۰۰ سلول در ۱۰µlit محیط DMEM که حاوی ۳۰٪ رنگ تریپان بلو بود در نظر گرفته شد. لوله‌های حاوی سلول تا زمان پیوند روی یخ نگهداری شده و به محل رته تستیس[1] ۳ موش گیرنده از هر گروه تزریق شدند در هر مورد بیضه راست به عنوان شاهد داخلی در نظر گرفته شد و سلولی دریافت نکرد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS-۲۰۰۹[2] با مدل خطی عمومی GLM[3] تجزیه گردیدند. به این منظور ابتدا کلیه داده‌های مربوط به صفات مورد بررسی که قبلاً در نرم‌افزار Excel آماده شده بودند، به طور مجزا در نرم‌افزار SAS فراخوان شده و آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از روش کلمروگروف - اسمیروف[4] انجام شد. همچنین قبل از تجزیه واریانس، و همگنی واریانس داده‌ها بوسیله آزمون لیون[5] تست گردید.

در این پژوهش، برای تجزیه آماری صفات مورد نظر از آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور نانوفیبر (دارای دو سطح حضور وعدم حضور نانو فیبر) و فاکتور زمان (دارای دو سطح روز ۷ و روز ۱۰) و سه تکرار انجام شد. میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن[6] مقایسه مقایسه شدند. معنی‌داری آنها در سطح P≤۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر می‌باشد.

نتایج

ارزیابی کلنی: ارزیابی کلنی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۷ و ۱۰ پس از کشت از نظر تعداد و مساحت کلنی‌ها و تعداد سلول به ازای هر کلنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مربوط به شمارش میانگین تعداد کلنی‌های حاصل از کشت SSCs (جدول ۲ نشان داد که مدل به کار رفته در آزمایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد و بیانگرآن است که تعداد کلنی‌ها در گروه کشت با استفاده از نانوفیبر نسبت به گروه کشت بدون نانوفیبر بیشتر بوده است. همچنین اختلاف تعداد کلنی در فاکتور زمان (در دو سطح روز ۷ و روز ۱۰) دارای اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) است. به علاوه نتایج حاصل از بررسی میانگین مساحت کلنی‌ها و میانگین تعداد سلول به ازای کلنی (جدول ۲) نیز آشکار نمود که آزمایش استفاده شده معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

اختلاف مساحت کلنی و تعداد سلول به ازای کلنی در فاکتور زمان (در دو سطح روز ۷ و روز ۱۰) دارای اختلاف معنی داری (P<۰/۰۵) می‌باشد. همچنین بین حداقل مربعات مربوط به تعداد کلنی‌ها، مساحت کلنی‌ها و تعداد سلول به ازای کلنی در فاکتور زمان (دوسطح روزهای ۷ و ۱۰) و فاکتور نانو فیبر (دو سطح وجود و عدم وجود نانو فیبر) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. با توجه به جدول ۲ میانگین تعداد کلنی و مساحت و میانگین تعداد به ازای کلنی در فاکتور نانو (وجود و عدم وجود نانو) وفاکتور زمان (روز ۷ و روز ۱۰) با مقایسه میانگین دانکن دارای اختلاف معنی‌داری هستند (P<۰/۰۵).

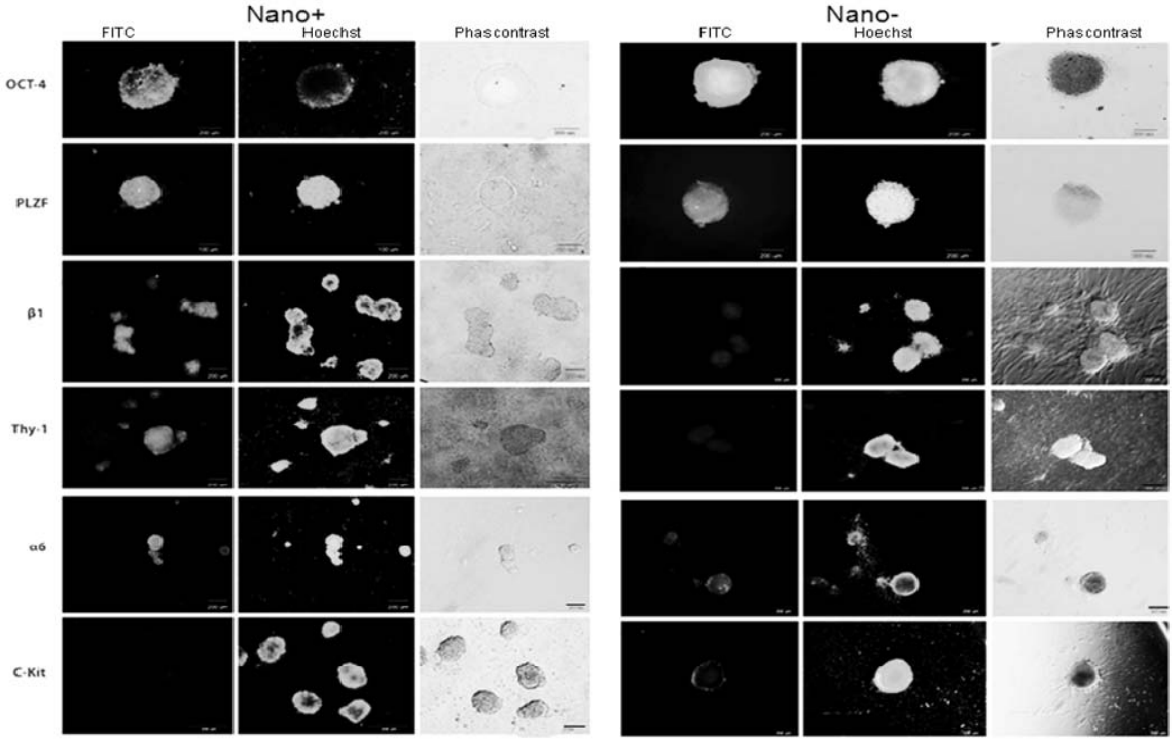
بررسی کیفی توسط ایمنوفلورسنت: به منظور تثبیت ماهیت سلول‌های کلنی به دست آمده و بررسی کیفی بیان نشانگرهای پروتئینی اختصاصی SSCsها در دو گروه و در روز ۱۰ کشت سلول‌های بیضه موش نوزاد، تست ایمونوسیتوشیمی برای نشانگرهای α6-Integrin, Thy-1, ß1-Integrin, Oct-4, C-kit و PLZF انجام شد. تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی (شکل۱)

1. Rete testis
2. Statistical Analysis System
3. General Linear Model
4. Kolmogrov- Smironav
5. Leven
6. Duncan multiple range Test

نشان داد که سلول‌های تشکیل‌دهنده کلنی‌ها نشانگر پروتئینی c-kit را بر سطح سلولی خود بیان نکردند. البته در گروه کشت بدون نانو فیبر نشانگر c-kit بر سطح سلولی به طور نسبی در سلول‌های حاشیه‌ای کلنی بیان داشته است که به نظر می‌رسد این سلول‌ها وارد فاز تمایزی شده‌اند. در مقابل نشانگرهای Oct-4 و PLZF را در هسته خود و α6-Integrin, Thy-1 و ß1-Integrin را در سطح سلولی بیان کردند. به نظر می‌آید که درگروه کشت با استفاده از نانوفیبر، کلنی‌های حاصله نشانگرهای سطحی Thy-1, α6-Integrin, ß1-intergrin را بیشتر بیان نموده‌اند.

بررسی بیان ژن‌های خاص سلول‌های زاینده در سطح mRNA از طریق RT-PCR

با استفاده از تکنیک RT-PCR بیان ژن‌های شاخص سلول‌های زاینده در سطح mRNA بررسی گردید که نتایج حاکی از بیان ژن‌های Stra8, Vasa, ß1-integrin, α6-Integrin, GFRα-1, Thy-1, در هر دو گروه بود (شکل ۲). البته به نظر می‌آید که بیان ژن‌های مذکوردر گروه کشت با استفاده از نانوفیبر، نسبت به گروه کشت



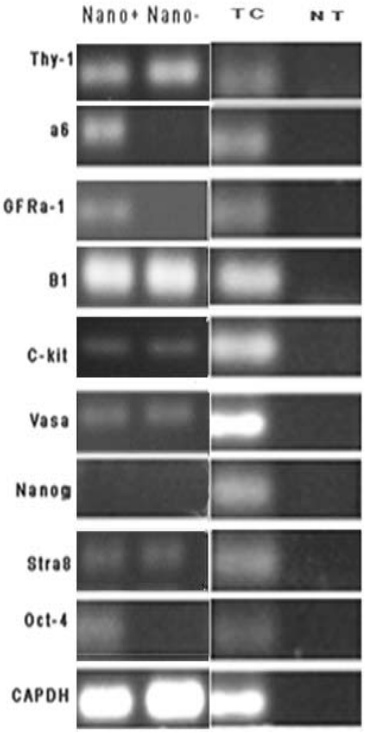
شکل ۱- نتایج حاصل از تست ایمونوسیتوشیمی برای نشانگرهای α6-Integrin، Thy-1، ß1-Integrin، oct4،C-kit،PLZF. در این تست با استفاده از روش غیرمستقیم و استفاده از آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های سطح و هسته سلول نشانگرهای فوق‌الذکر شناسایی گردید. آنتی‌بادی ثانویه متصل به رنگ فلوئورسنت (FITC) بوده و برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها از رنگ Hoechst استفاده شد. مقیاس اندازه‌گیری= ۲۰۰μm.

جدول ۲- میا نگین تعداد و مساحت کلنی و میانگین تعداد سلول به ازای هر کلنی به روش دانکن در کشت SSCs در سطوح آزمایشی

فاکتور		میانگین تعداد کلنی± معیار خطا (SE)	میانگین مساحت کلنی (μm^2) ± معیار خطا (SE)	میانگین تعداد سلول به ازای هر کلنی± معیار خطا (SE)
نانو	حضور	۵۷۶/۳۳±۲۹۹[a]	۲۰۰۸۱/۳±۳۰۵۹/۰[a]	۴۷۸/۳۳±۲۴۸/۹[a]
	عدم	۴۵۱/۱۷±۲۰۳/۵[b]	۱۷۴۸۵/۳±۱۳۰۱/۳[b]	۳۷۸/۳۳±۲۱۹/۹[b]
زمان	روز ۷	۷۲۹/۰۰±۱۴۳/۸[a]	۲۱۲۹۳/۰±۳۲۷۹/۵[a]	۶۴۰/۰۰±۸۰[a]
	روز ۱۰	۲۹۸/۵۰±۹۱/۳[b]	۱۸۲۳۶۳/۰±۱۵۲۱/۷[b]	۲۱۶/۶۷±۴۹/۲[b]

حروف غیرمشابه در هر ستون مربوط به هر کدام از فاکتورها، به مفهوم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بدون استفاده از نانوفیبر بیشتر بوده است. در مقابل ژن C-kit در گروه کشت بدون استفاده از نانوفیبر نسبتاً بیشتر بوده است نتایج همچنین آشکار کرده است که ژن Nanog به عنوان ژن (خاص سلول‌های پرتوان) در سلول‌ها بیان نداشته ولی ژن Oct-4 (دیگر ژن خاص پرتوانی سلول‌های بنیادی) در گروه کشت با استفاده از نانوفیبر بیان نسبی بیشتری را داشته است.



شکل ۲- ژن‌های مورد بررسی توسط روش RT -PCR، (TC= testicular cell) به عنوان کنترل مثبت و (NTC= non template control) در نظر گرفته شد.

نتایج پیوند: پس از بررسی نتایج حاصل از تست‌های کمی و کیفی فوق، پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی حاصل از کشت در دو گروه به منظور بررسی عملکرد SSCsها، و اثبات سلول‌های مذکور به مدل نابارور (شکل۳) انجام شد. حدود ۵-۴ هفته بعد ازانتقال سلول‌ها، بیضه‌های پیوندی و کنترل از طریق کشتن موش‌ها جدا شده و پس از ثابت نمودن بافت، از طریق تست ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص سلول‌های Brdu مثبت با رنگ فلوئورسنت رنگ‌آمیزی شدند. تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلوئورسنت به وضوح سلول‌های Brdu مثبت را در مجاورت غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز هر دو گروه نشان می‌دهد (شکل ۳). در حالی که در مقایسه، لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه شاهد هر گروه خالی مانده‌اند.

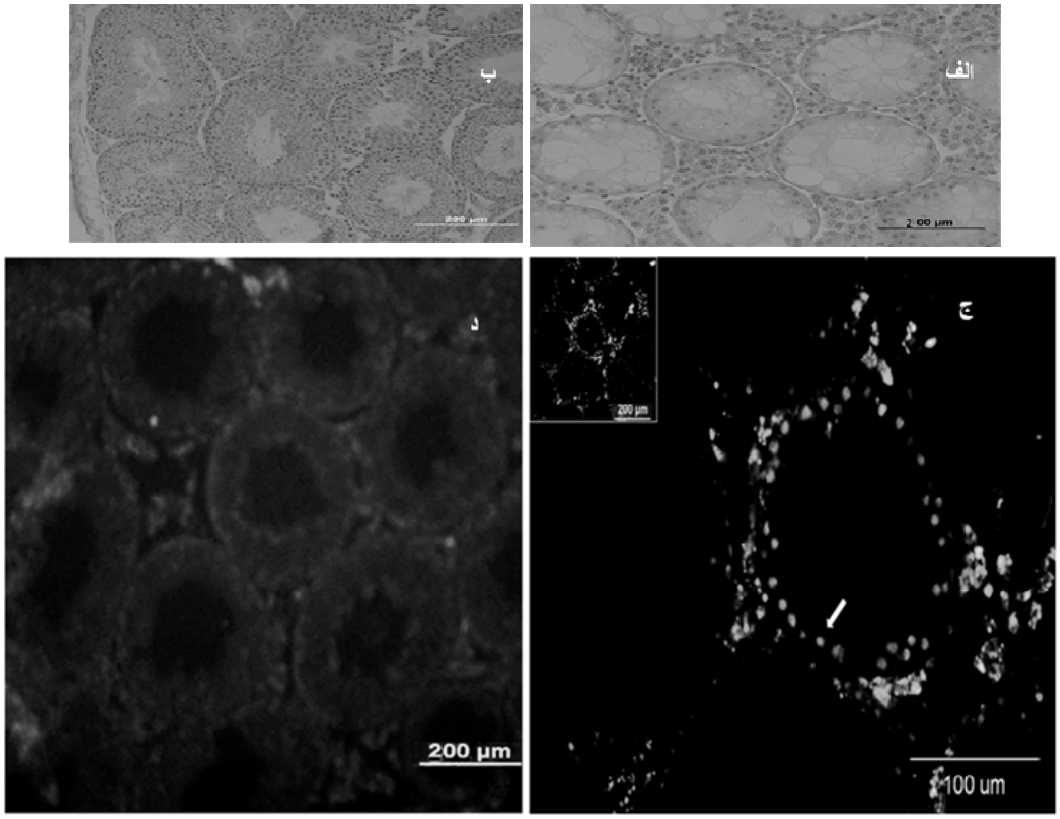
بحث

با وجودی که سلول‌های SSCs به صورت سلول‌های منفرد در قاعده لوله‌های اسپرم‌ساز وجود دارد، مطالعه آن‌ها آسان نبوده و به طور مستقیم امکان‌پذیر نمی‌باشد زیرا اولا تعداد سلول‌های SSC در حالت طبیعی در بیضه بسیار اندک است (٪۰/۰۳) (de Rooij & Russell, 2000). ثانیاً مشخصات مورفولوژیکی سلول‌های SSC بسیار مشابه با اسپرماتوگونی‌های اولیه که در مسیرتمایز به سمت اسپرم قرار دارند می‌باشد (de Rooij & Russell, 2000; McLean et al., 2003). بعلاوه خصوصیات پرتوانی و خود نوزایی سلول‌های SSCs به طور پیچیده‌ای به کنام[1] خود وابسته است. لذا با توجه به این‌که توان تکثیر و زنده ماندن سلول‌های زاینده در طول کشت اولیه کاهش پیدا می‌کند (Creemers et al., 2002)، ایجاد راه مناسبی برای تکثیر و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط *in vitro* می‌تواند به عنوان یک استراتژی مهم درفراهم شدن امکان مطالعه دقیق‌تر و به دنبال آن بالا رفتن شانس موفقیت پیوند سلول‌های بنیادی در محیط *in vivo* باشد (Johnston et al., 2000; Fujita et al., 2005).

در بچه موش، پس از تولد گنوسیت‌ها به سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A تبدیل می‌شوند، به طوری که در روز (۶-۵) بعد از تولد بیشترین درصد سلول‌های اسپرماتوگونی در لوله‌های اسپرم‌ساز وجود دارد (Johnston et al., 2000; Fujita et al., 2005). لذا انتخاب بچه موش ۶ روزه بهترین سن برای جداسازی

1. Niche

سلول‌های نوع A و همچنین سلول سرتولی است زیرا اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز در موش ۶ روزه تنها دارای این دو نوع سلول می‌باشد به طوری که ۱۶٪ سلول‌های اپیتلیوم را اسپرماتوگونی نوع A و ۸۴٪ دیگر را سلول‌های سرتولی تشکیل می‌دهند. لذا درجه خلوص سلول‌های بنیادی در اپیتلیوم اسپرم‌ساز بچه موش در



شکل ۳- برش عرضی از بافت بیضه موش بالغ که جهت پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی با دریافت ۴۰mg/kg داروی بوسولفان لوله‌های اسپرم‌ساز کاملاً از سلول‌های درونزاد خالی شده‌اند. مدل عقیم- (الف) در مقایسه با گروه شاهد که دارو دریافت نکرده‌اند (ب). حضور سلول‌های Brdu مثبت (محل فلش) در مجاورت غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز (ج)، در مقایسه با گروه شاهد که لوله‌ها خالی مانده‌اند (د)، آنتی‌بادی ثانویه متصل به رنگ فلوئورسنت است.

بالاترین سطح است (Johnston et al., 2000; Fujita et al., 2005).

انتخاب محیط و فاکتورهای رشد درمطالعه حاضربا توجه به اهمیت آن در تحقیقات مربوط به کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بوده است. به طوری که محیط DMEM به عنوان محیط پایه در کشت سلول‌های اسپرماتوگونی مورد استفاده می‌باشد. Mclean (2003) در مطالعه‌ای مبنی بر مقایسه سیستم‌های کشت مختلف گزارش کرد که بهترین سیستم کشت مؤثر با حضور همزمان فاکتورهای رشد GDNF، EGF و bFGF در محیط کشت با درصد کم سرم می‌باشد(McLean 2005). Oatley (2008)، گزارش Mclean (2003) را تائید نمود و عنوان کرد وجود EGF و bFGF موجب افزایش اثر GDNF در خود نوزایی SSCs می‌شود (Oatley & Brinster, 2008). مطالعات مختلف سلولی و مولکولی نیز حاکی از آن است که حضور فاکتورهای رشد از جمله GDNF, EGF, bFGF نقش بسیار مهمی در بیان ژن‌های پرتوانی سلول‌های SSCs کشت داده شده در آزمایشگاه دارد (McLean, 2005).

فیبرهای موجود در موجود زنده که به عنوان مهمترین و اساسی‌ترین بلوک‌های ساختمانی هستند و دارای ابعادی نانو می‌باشند، به طور پویا و فعال کار انتقال مواد را انجام می‌دهند (Ko, 2004). با توجه به این نکات، استفاده از فیبرهای نانو سنتزی در تحقیقات مختلف پزشکی، بیولوژی و فیزیولوژی بیانگر اثر مثبت آن در زمینه‌های گوناگون بوده است. به طوری که

رساندن فاکتور رشد IGF-1 توسط نانوفیبر پپتیدی biotinylated در ترمیم عضله قلب موش صحرایی بدنبال سکته موجب بهبود عملکرد پمپی قلب به دلیل تغییرات مهندسی ریز محیط[1] سلول‌های ناحیه آسیب دیده عضلات قلب شده است (Davis et al., 2006). از آنجایی که سطح سنتزی نانوفیبری اولترا-وب که در مطالعه حاضر نیز از آن استفاده شده از نظر ساختار مشابه غشای پایه است، می‌توان انتظار داشت رشد سلول بیشتر حمایت شده و مواد مغذی و شیمیائی به مقدار فراوانتر در اختیار سلول قرار گیرد (Liao et al., 2006; Toh et al., 2006; Sell et al., 2007). به علاوه پوشش آمینی که بر روی فیبرهای پلی‌آمیدی وجود دارد باعث می‌شود تا سلول‌ها بر روی این داربست به خوبی بچسبند در حالی که بدون آن به راحتی شسته می‌شوند. علت آن می‌تواند به دلیل بر هم کنش بار مثبت آمین با بار منفی گیرنده CD34 بر سطح سلول باشد. همچنین بار مثبت آمین باعث متوقف کردن جابجایی سیتوکین‌ها از فاز محلول شده و لذا با تغییر محیط شیمیایی در نزدیکی داربست بر تمایز سلول اثر می‌گذارد. نتایج به دست آمده از روز هفتم و دهم کشت نشان می‌دهد که کلنی‌های حاصل از کشت کوتاه مدت سلول‌ها بر روی ماتریکس نانوفیبر مورد استفاده در این طرح از نظر تعداد بسیارمتفاوت از تعداد کلنی در کشت بدون نانوفیبر بوده است. که این یافته مؤید نتایج حاصل از مطالعات قبلی می‌باشد.

البته مقایسه زمانی تعداد کلنی بیانگر کاهش معنی‌داری با افزایش زمان کشت بوده است. با در نظر داشتن مطالب فوق، تأثیر متقابل اثر تیمار و زمان نشان می‌دهد که ماتریکس نانوفیبر موجب کلنی‌زایی بیشتر شده و هرچند که با گذشت زمان از تعداد کلنی‌ها کاسته شده ولی نسبت به گروه کشت بدون نانو دارای مقدار کاهش کمتری است که ممکن است نتیجه به دست آمده به دلیل توانایی بیشتر ماتریکس نانوفیبر در بقاء سلول و جلوگیری از مرگ سلولی باشد. از طرف دیگر مساحت کلنی‌های سلول‌های SSCs بر سطح داربست نانوفیبر سنتزی بزرگتر است که شاید به این علت است که این داربست در مقایسه با سطح بدون نانو باعث افزایش تکثیر و خود نوزایی سلول‌ها می‌شود (Nur et al., 2006). این نکته همچنین توسط مقایسه تعداد سلول به ازای کلنی هم تأیید می‌گردد. مقایسه زمانی و بررسی اثر متقابل زمان و تیمارهای مورد آزمایش در اندازه‌گیری مساحت کلنی‌ها و تعداد سلول به ازای کلنی، هم مؤید آن است که احتمالاً ماتریکس نانوفیبر توانایی بیشتری در تکثیر و خود نوزایی SSCs و جلوگیری از مرگ سلولی دارد.

از آن جایی که محققین از سال ۱۹۶۰ کشف کردند که سطوح دارای مقیاس نانو با خصوصیات (ترکیبات و دانسیته و غیره ...). متفاوت بر رفتار سلول تأثیر می‌گذارد (Sniadeck, 2005). کشت و القای سلول‌های بنیادی نظیر سلول‌های مزانشیم در بسترها و ماتریکس‌های نانویی متفاوت منجر به تمایز متفاوت می‌شود زیرا بنظر می‌آید که فاکتورهای رشد محلول همراه با سختی بستر عمل می‌کنند و باعث افزایش بیان ژن‌های خاص دودمان می‌شوند (Dellatore et al., 2008).

نتایج حاصل از تعیین هویت سلول‌های اسپرماتوگونی توسط رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت نشان می‌دهد که استفاده از ورقه نانوفیبر پلی‌آمیدی به عنوان ماتریکس برون‌سلولی در کشت کوتاه‌مدت سلول‌های SSC با توجه به فاکتورهای رشد بکار رفته موجب می‌شود تا در روز دهم کشت، نشانگرهای پروتئینی سطح سلولی و درون هسته‌ای سلول‌های SSC درون کلنی‌ها (α6-Integrin, Thy-1, ß1-Integrin, Oct-4, PLZF) نسبت به گروه بدون نانوفیبر دارای بیان نسبتاً بیشتر گردد و در مقابل نشانگر پروتئینی (C-kit) که خاص سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز یافته است کمتر باشد. این یافته حاکی از توانایی ماتریکس نانوفیبر در حفظ خود نوزایی سلول‌های SSC و تمایز کمتر آن‌ها است. اهمیت این نتیجه با توجه به حفظ توانایی مذکور برای مدت زمان طولانی‌تر (۱۰ روز)، بیشتر مشخص می‌گردد زیرا در کشت بدون استفاده از نانوفیبر طول مدت کشت معمولاً ۷ روز می‌باشد و پس از آن نیاز به پاساژ دادن است (Guan et al., 2009).

در بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR، عدم بیان ژن پرتوانی (Nanog) و بیان ژن (Oct-4) و هم چنین

1. Microenvironment

بیان بیشتر ژن‌های خاص سلول‌های زاینده در سطح mRNA در گروه کشت با استفاده از نانوفیبر در روز دهم کشت و کمتر بیان شدن ژن تمایزی (C-kit) نسبت به گروه بدون نانوفیبر آشکار می‌کند که اولاً کلنی‌های حاصل از کشت سلول‌های بیضه بچه موش با احتمال زیاد کلنی‌های مربوط به SSCs بوده است. ثانیاً سلول‌های SSC کشت شده بر ورقه نانوفیبر توان خود نوزایی خود را بیشتر حفظ کرده‌اند. نتایج تحقیقات آشکار نموده است دو ژن Nanog و aOct-4 از ژن‌های مهم پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی[1] است. البته ژن Oct-4 به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در خود نوزایی سلول‌های SSC نیز می‌باشد (Chambers et al., 2007; de Rooij & Mizrak, 2008). اما از آنجایی که برای ایجاد پر توانی و خود نوزایی سلول‌های ESC حضور توأم ژن‌های Nanog و Oct-4 به صورت یک کمپلکس ضروری است (Liang et al., 2008). و همچنین زمانی که ژن Nanog در سلول‌های ESC وجود دارد ژن‌های Stra8, Plzf, c-Ret, Dazl که خاص سلول‌های زاینده هستند بیان نمی‌شود. لذا عدم بیان ژن Nanog و بیان ژن Oct-4 و سایر ژن‌های سلول‌های زاینده می‌تواند دال بر وجود سلول‌های SSC باشد (de Rooij & Mizrak, 2008).

قطعی‌ترین راه اثبات سلول‌های حاصل از کشت SSCs به لحاظ عملکردی انتقال و پیوند آنها به موش نر نابارور و ایجاد کلنی در لوله‌های اسپرم‌ساز است (Ogawa 2000; Honaramooz et al., 2002). نتایج حاصل از پیوند در هر دو گروه بیانگر اثبات وجود SSCs می‌باشد. زیرا سلول‌های SSC دهنده از هر دو گروه در غشاء پایه لوله‌های اسپرم‌ساز موش گیرنده جایگزین شده است.

1. Embronig Stem Cells (ESCs)

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده این امیدواری وجود دارد که استفاده از علم نانوتکنولوژی و نانوفیبر پلی‌پپتیدی به عنوان ECM امکان مطالعه بهتر و همچنین بهبود و تکامل تکنیک جداسازی و تکثیر و امکان دسترسی به جمعیت بیشتر سلول‌های SSCs را ایجاد می‌کند. به علاوه به لحاظ بیان نشانگرها و ژن‌ها که به نظر می‌آید نانوفیبر پلی‌پپتیدی تأثیر مثبت داشته است می‌توان این انتظار را داشت که عملکرد سلول‌های SSC بهتر باشد. ارزش این نکته به خصوص در پیوند سلول‌های SSC مهم‌تر می‌باشد. البته برای تأیید، نیاز به کمی نمودن خصوصیات مولکولی سلول‌ها قبل و بعد از پیوند است. همچنین بررسی ماندگاری و بقاء سلول‌های SSC در بستر نانوفیبر پلی‌پپتیدی می‌تواند در درک بیشتر رفتار سلول‌های مذکور کمک مؤثری باشد.

سپاسگزاری

از کلیه اساتید و اعضای محترم گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و گروه سلول‌های بنیادی و زیرگروه سلول‌های زاینده درآزمایشگاه تمایز پژوهشکده رویان صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. لازم به ذکر است کلیه هزینه‌های این طرح توسط دانشگاه تهران و پژوهشکده رویان پرداخت شده است.

REFERENCES

1. Aponte, P. M. & de Rooij, D. G. (2008). Biomanipulation of Bovine Spermatogonial Stem Cells. *Anim Reprod*, 5, 16-22.
2. Aponte, P. M., Soda, T., Teerds, K. J., Mizrak, S. C., van de Kant, H. J. & de Rooij, D. G. (2008). Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction*, 136(5), 543-57.
3. Barrilleaux, B., Phinney, D. G., Prockop, D. J. & O'Connor, K. C. (2006). Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng*, 12(11), 3007-19.
4. Brinster, R. L. & Nagano, M. (1998). Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Semin Cell Dev Biol*, 9(4), 401-9.
5. Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L. & Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450(7173), 1230-4.

6. Creemers, L. B., den Ouden, K., van Pelt, A. M. & de Rooij, D. G. (2002). Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction*, 124(6), 791-9.
7. Davis, M. E., Hsieh, P. C., Takahashi, T., Song, Q., Zhang, S., Kamm, R. D., Grodzinsky, A. J., Anversa, P. & Lee, R. T. (2006). Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(21), 8155-60.
8. de Rooij, D. G. & Mizrak, S. C. (2008). Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development*, 135(13), 2207-13.
9. de Rooij, D. G. & Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*, 21(6), 776-98.
10. Dellatore, S. M., Garcia, A. S. & Miller, W. M. (2008). Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. *Curr Opin Biotechnol*, 19(5), 534-40.
11. Dobrinski, I. (2005). Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci*, 89(1-4), 137-45.
12. Ehmcke, J., Hubner, K., Scholer, H. R. & Schlatt, S. (2006). Spermatogonia: origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of the male germ line. *Reprod Fertil Dev*, 18(1-2), 7-12.
13. Fujita, K., Ohta, H., Tsujimura, A., Takao, T., Miyagawa, Y., Takada, S., Matsumiya, K., Wakayama, T. & Okuyama, A. (2005). Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest*, 115(7), 1855-61.
14. Goossens, E., Frederickx, V., de Block, G., van Steirteghem, A. & Tournaye, H. (2006). Evaluation of in vivo conception after testicular stem cell transplantation in a mouse model shows altered post-implantation development. *Hum Reprod*, 21(8), 2057-60.
15. Guan, K., Wolf, F., Becker, A., Engel, W., Nayernia, K. & Hasenfuss, G. (2009). Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc*, 4(2), 143-54.
16. Herrid, M., Davey, R. J. & Hill, J. R. (2007). Characterization of germ cells from pre-pubertal bull calves in preparation for germ cell transplantation. *Cell Tissue Res*, 330(2), 321-9.
17. Hofmann, M. C., Braydich-Stolle, L. & Dym, M. (2005). Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol*, 279(1), 114-24.
18. Honaramooz, A., Behboodi, E., Hausler, C. L., Blash, S., Ayres, S., Azuma, C., Echelard, Y. & Dobrinski, I. (2005). Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl*, 26(6), 698-705.
19. Honaramooz, A., Behboodi, E., Megee, S. O., Overton, S. A., Galantino-Homer, H., Echelard, Y. & Dobrinski, I. (2003). Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod*, 69(4), 1260-4
20. Honaramooz, A., Megee, S. O. & Dobrinski, I. (2002). Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, 66(1), 21-8.
21. Johnston, D. S., Russell, L. D. & Griswold, M. D. (2000). Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Rev Reprod*, 5(3), 183-8.
22. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. & Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, 69(2), 612-6.
23. Ko, F. K. (2004). Nanofiber technology: Bridging the Gap between nano and macro world. *in NATO on nanoengineered nanofibrous material*. S Guceri and Y Gogotsi, Kluwer Academic publishers.
24. Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S. Y., Qin, J., Wong, J., Cooney, A. J., Liu, D. & Songyang, Z. (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 10(6), 731-9.
25. Liao, S., Li, B., Ma, Z., Wei, H., Chan, C. & Ramakrishna, S. (2006). Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed. Mater*.
26. Lodhi, M. A., Opperman, G. W. & Larkin, S. M. (2006). Cell Proliferation and Differentiation on Synthetic Nanofibrillar Surface. *The Nanotechnology Conferece Program Abstract*.
27. Ma, P. X. & Zhang, R. (1999). Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*, 46(1), 60-72.
28. McLean, D. J. (2005). Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Res*, 322(1), 21-31.
29. McLean, D. J., Friel, P. J., Johnston, D. S. & Griswold, M. D. (2003). Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod*, 69(6), 2085-91.
30. Nur, E. K. A., Ahmed, I., Kamal, J., Schindler, M. & Meiners, S. (2006). Three-dimensional nanofibrillar surfaces promote self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 426-33.

31. Oatley, J. M. & Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 263-86.
32. Ogawa, T. (2000). Spermatogonial transplantation technique in spermatogenesis research. *Int J Androl*, 23 Suppl 2, 57-9.
33. Ogawa, T., Arechaga, J. M., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. (1997). Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*, 41(1), 111-22.
34. Schindler, M., Ahmed, I., Kamal, J., Nur, E. K. A., Grafe, T. H., Young Chung, H. & Meiners, S. (2005). A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture. *Biomaterials*, 26(28), 5624-31.
35. Schindler, M., Nur, E. K. A., Ahmed, I., Kamal, J., Liu, H. Y., Amor, N., Ponery, A. S., Crockett, D. P., Grafe, T. H., Chung, H. Y., Weik, T., Jones, E. & Meiners, S. (2006). Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. *Cell Biochem Biophys*, 45(2), 215-27.
36. Sell, S., Barnes, C., Smith, M., McClur, M., Madurantakam, P., Grant, J., McManus, M. & Bowlin, G. (2007). Extracellular matrix regenerated: Tissue engineering via electrospun biommetic nanofibers. *Polymer International*, 56(11), 1349-1360.
37. Sniadeck (2005). Nanothechnology for cell substrate interaction. *Annals of biomadical engineering*.
38. Toh, Y. C., Susanne, N. G., Khong, Y. M., Zhany, X., Zhu, Y., Lin, P. C., Te, C. M., Sun, N. & Yu, H. (2006). Cellular Responses to a Nanofibrous Environmant. *Nanotoday*, 1(3), 34-43.