Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 17, No. 1, Spring 2017, Pages 7-21

The Effects of Sertoli Cells Condition Medium and Retinoic Acid on the Number of Colonies of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Salem M[1], Mirzapour T*[1], Bayrami A[1], Sagha M[2], Asadi A[1]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
Corresponding author. Tel: +9845333781425, Fax: +984533514701, E-mail: Dr.tooba72@gmail.com

Received: Aug 25, 2016 Accepted: Feb 12, 2017

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

ABSTRACT

Background & objectives: According to importance of bone marrow mesenchymal stem cells in production of different cell lines, transplantation of these cells are used for treatment of many different diseases during cell therapy. Viability and proliferation of these cells after transplantation are very important. Since infertility is as public health problem in men and women, the scientists attempt to produce germ cells from differentiation of stem cells. It is supposed to use these cells for treatment of different illnesses especially for men with lack of germ cells in testes in future. However, in using stem cells for cell therapy the culture medium should be designed to increase the number of cells and efficiency of transplantation and to guarantee the health of the cells in terms of DNA damage. This study designed a suitable culture medium in order to increase the number of colonies and decrease the cell injuries.

Methods: In this study mesenchymal stem cells isolated from bone marrow of mice and exposed to retinoic acid (RA) with concentration of 10^{-6} M and Sertoli cells condition medium. Since mesenchymal stem cells (MSCs) produce fibroblastic colonies so the number of colonies was counted every 3 days after culture (days of 2, 5, 8, 11, and 15) under inverted microscope. The staining of ethidium bromide-acridine orange was also done for determination of apoptotic nucleus in days of 10 and 15 after culture.

Results: The results showed that the effects of retinoic acid on grow and viability of MSCs is related to the time. It seems that RA increased the proliferation of the cells and the number of colonies increased in low time but the apoptotic cells elevated with increasing the time of culture. Condition medium of Sertoli cells also increased the proliferation of bone marrow stem cells.

Conclusion: According to proliferative properties of condition medium, it seems that using condition medium together with RA is better than RA alone for differentiation of MSCs to germ cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells; Sertoli Cells; Apoptosis.

اثرات محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی بیضه و رتینوئیک اسید بر تعداد کلونی‌های حاصل از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان

مریم سالم [۱]، طوبی میرزاپور [۱]، ابوالفضل بایرامی [۱]، محسن سقا [۲]، اسداله اسدی [۱]*

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی , دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۳۷۸۱۴۲۵ فکس: ۰۴۵۳۳۵۱۴۷۰۱ پست الکترونیک: Dr.tooba72@gmail.com

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در تولید رده‌های مختلف سلولی امروزه تلاش بر این است که از پیوند این سلول‌ها در طی سلول درمانی جهت درمان بیماری‌های مختلف استفاده شود. تکثیر سلولی و حیات سلول‌های بنیادی پس از پیوند اهمیت بسزایی دارد. از آنجایی که ناباروری در مردان و زنان از مشکلات عمده سلامت اجتماع محسوب می‌شود، تلاش بر این است که از تمایز سلول‌های بنیادی، رده های مختلف سلولی مخصوصاً سلول‌های جنسی تولید شود. با پیشرفت تحقیقات در آینده امید آن می‌رود این سلول‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف مخصوصاً درمان مردانی که بافت بیضه آنها فاقد سلول‌های نطفه ای است استفاده شوند. اما در استفاده از سلول‌های بنیادی جهت سلول درمانی توجه به این نکات لازم است که اولاً محیط کشت هایی طراحی شود که تعداد این سلول‌ها را افزایش داده و کارایی پیوند را بالا ببرد و ثانیاً سلامت این سلول‌ها از لحاظ آسیب‌های DNA را تضمین نماید.

روش کار: در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت مغز استخوان موش جداسازی شده و سپس در معرض محیط شرایطی شده حاصل از سلول های سرتولی و غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید قرار گرفتند. از آنجایی‌که سلولهای بنیادی مزانشیمی به شکل کلونی های فیبروبلاستیک ظاهر می شوند لذا هر سه روز یکبار پس از کشت (روزهای ۲,۵, ۸, ۱۱ و ۱۵) با استفاده از میکروسکوپ اینورت تعداد کلونی ها شمارش شدند. رنگ آمیزی اتیدیم بروماید- اکریدین ارنج نیز جهت تعیین تعداد هسته های آپوپتیک در سلول‌های حاصل از کشت به ترتیب در روزهای ۱۰ و ۱۵ کشت انجام شد تا محیط کشت مناسبی که تعداد کلونی های بیشتری تولید کرده و آسیب سلولی کمتری به همراه داشته باشد انتخاب شود.

یافته ها: نتایج نشان داد اثرات رتینوئیک اسید روی رشد و بقای سلول‌های بنیادی مغز استخوان وابسته به زمان است، به نظر می‌رسد که در زمان کم باعث افزایش تکثیر سلول‌ها شده در نتیجه تعدادکلونی ها افزایش می یابد در حالی که با افزایش زمان همین غلظت اندک ۱میکرو مولار رتینوئیک اسید باعث آپوپتوز سلول ها می‌گردد. همچنین محیط شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان می شود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که در تمایز سلول‌های مزانشیمی به سمت سلول‌های زایا استفاده از محیط شرایطی شده در کنار رتینوئیک اسید به دلیل خاصیت تکثیری آن بهتر از رتینوئیک اسید به تنهایی باشد.

واژه های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های سرتولی، آپوپتوز

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰٤ **پذیرش:** ۱۳۹۵/۱۱/۲٤

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که منشا تمام سلول‌های بدن بوده و دارای دو ویژگی مهم خود نوزایی و تمایز هستند. در واقع این سلول‌ها با توان خود نوزایی، سلول‌های مشابه خود را تولید کرده که قادر به حفظ جمعیت خود هستند و توانایی ایجاد

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

انـواع سـلول‌هـای تمـایز یافتـه را دارنـد [۱] ایـن سلول‌های بر اساس توان تمایزی به انواع همه تـوان، پرتوان و چند توان تقسیم می‌گردند [۲] و بر اسـاس تعریف انجمن بین المللـی سـلول‌درمـانی دارای سـه ویژگی می‌باشند: اول، در شرایط کشـت معمـولی در ظروف کشت پلاستیکی به کف ظرف می‌چسبند. دوم، شاخص‌های سطحیCD90, CD73, CD105 را بیـان می‌کنند و نسبت به بیان شـاخص‌هـای هماتوپویتیـک مثـل CD45, CD19, CD79 CD11b, CD14, CD34 منفـی مـی‌باشـند. سـوم، توانـایی تمـایز بـه سلول‌های چربی، غضروف و اسـتخوان را در شـرایط آزمایشگاهی دارا هستند [۳].

سـلول‌هـای بنیـادی دراکثـر بافـت‌هـای بـدن مثـل بافت‌های چربی، بافت‌هـای جفـت و بنـد نـاف، خـون محیطی، بافت‌های پیوندی، ماهیچه اسکلتی و سیسـتم عصبی وجود دارند، اما مهـم‌تـرین منبـع سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی در سـال‌هـای اخیـر مغـز اسـتخوان بوده است [٤]. از آن‌جایی که سلول‌های بنیـادی مغـز استخوان در تماس مستقیم با خون محیطی هسـتند و همچنـین پتانسـیل تمـایز و تـوان تکثیـر بـرای مـدت طولانی را دارا می‌باشند، باعث شده است که این نوع سلول‌ها یک انتخاب مناسب برای بررسی اثرات مـواد مختلـف بـر روی آن‌هـا باشـند. از طرفـی پیونـد اتوگرافت این سلول‌ها، اثـرات کمتـری در رد پیونـد نسبت به بافت‌های جنینی دارند. از این رو در صورت تکثیر و تمایز موفق آنها می‌توان از ایـن سـلول‌هـا در موارد پیوند به بافت‌های مختلف بـدن نیـز اسـتفاده کرد [۵].

در سال‌های اخیر تولیـد سـلول‌هـای زایـای بـدوی از انواع مختلف سلول‌های بنیادی مخصوصاً سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی مغـز اسـتخوان در حیوانـات مـورد چالش قرار گرفته اسـت. نیرنیـا و همکـاران در سـال ۲۰۰۶ سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان ترانسـفکت شـده بـا Stra8 –EGF را اسـتخراج کـرده و بـه تمایزآن‌ها تحت تاثیر رتینوئیک اسید پرداختند. نتـایج مطالعـه آنهـا نشـان داد ایـن سـلول‌هـا در شـرایط آزمایشگاهی فقط مارکرهای پیش میوزی و میوزی را بیان می‌کنند و قادر به بیان مارکرهـای پـس میـوزی نمـی‌باشـند [۶] . لـو[1] و همکـاران در سـال ۲۰۰۷ سلول‌های مغز استخوان که با GFP ترانسفکت شـده بودنـد و شـامل سـلول‌هـای بنیـادی هماتوپویتیـک، سـلول‌هـای بنیـادی انـدوتلیال و سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی بودند را استخراج کرده و به بیضه مـوش عقیم شده (با بوسولفان) پیوند زدند. نتایج نشـان داد این سلول‌ها به سلول‌های سـرتولی، اسـپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه تمایز می‌یابند اما قادر به تمایز به اسپرماتید نمی‌باشند [۷] همچنین لاساله[2] و همکـاران در سال ۲۰۰۸ با پیونـد سـلول‌هـای مزانشـیمی مغـز استخوان به بیضه رت و بررسی‌های انجام شده پـس از۳، ۶ و۹ مـاه از زمـان پیونـد، نشـان دادنـد کـه سلول‌های‌هاپلوئیدی و روند اسـپرماتوژنز در بافـت بیضه مشاهده نمی شود [۸]. زومـی[3] و همکـاران در سال ۲۰۱۳ سلول‌های بنیادی جنینی را تحت تاثیر دوز 10^{-5}M رتینوئیک اسید بـه مـدت ۱،۳،۵،۷ روز قـرار دادند و مشاهده کردند که این سلول‌هـا مارکرهـای میوزی و پیش میـوزی را بیـان مـی‌کننـد [۹]. زی[4] و همکاران در سال ۲۰۱۵ با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با سلول‌هـای سـرتولی بـه مـدت ۷،۱٤،۲۸ روز نشان دادند که این سلول‌ها مارکرهـای vasa، Dazl، Stella (مارکرهای پـیش میـوزی) را در هر سه دوره زمانی بیان می‌کنند [۱۰،۱۱].

مطالعات گذشته نشان می‌دهد جهت تکثیر سلول‌های بنیـادی، انتخـاب محـیط کشـت مناسـب کـه بتوانـد سلول‌ها را تکثیر کرده و میزان آسیب‌های سـلولی را به حداقل برسـاند از اهمیـت بـه سـزایی برخـوردار است. از طرفی در فراهم کـردن شـرایط لازم بـرای تمـایز سـلول‌هـا بهتـر اسـت سـلول‌هـای بنیـادی بـا

[1] Lue
[2] Lassalle
[3] Xuemei
[4] Xie

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

سلول‌های حمایت کننده بافت مورد نظر به شکل هم کشتی در شرایط آزمایشگاه کشت شوند تا سلول‌ها در یک ریز محیط مناسب که تقلیدی از ریز محیط داخل بدن است و در آن بسیاری از فاکتورهای لازم جهت رشد و تمایز سلول‌ها توسط سلول‌های حمایتی تولید می‌شود قرار گیرند. برای این منظور در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر فاکتورهای مترشحه از سلول‌های سرتولی بیضه موشهای تازه متولد شده (محیط کشت شرایطی شده یا کاندیشن مدیوم) که به عنوان سلول‌های حمایت کننده سیستم تولید مثلی مطرح هستند قرار گرفتند [۱۲]. سلول‌های سرتولی در غشای پایه لوله‌های منی‌ساز قرار داشته و حجمی حدود ۲۰ -۱۷ ٪ از لوله‌های منی‌ساز را شامل می‌شوند. هر سلول سرتولی ۵۰- ۳۰ سلول اسپرماتوگونی را حمایت می‌کند. در واقع عملکرد سلول‌های سرتولی حمایت ساختاری و غذایی سلول‌های زایا، فاگوسیته کردن سلول‌های زایای آسیب دیده و تنظیم فرایند اسپرماتوژنز از طریق تولید پروتئین‌ها و فاکتورهای رشد لازم می‌باشد [۱۳]. این سلول‌ها قادر به تولید انواع مختلف سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مثل: فاکتور رشد شبه انسولینی[1], فاکتور رشد فیبروبلاستی[2], فاکتور رشد تغییر شکل دهنده [3] و فاکتور نروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال[4] هستند که با عث حمایت و تکثیر سلول‌های بنیادی می‌شوند [۱٤].

در مطالعه حاضر جهت شروع تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به سمت سلول‌های جنسی رتینوئیک اسید[5] که یک مولکول لیپوفیلیکی کوچک مشتق شده از ویتامین A (رتینول) است به عنوان یک تمایز دهنده به محیط کشت اضافه شد. بر اساس مطالعات گذشته رتینوئیک اسید باعث القای تمایز و آپوپتوز در سلول‌های نرمال و سرطانی می‌شوند. در واقع دوزهای بالای رتینوییک‌اسید در مرگ سلولی و دوزهای پایین آن در تمایز و تکثیر سلولی استفاده می‌شوند [۱۵]. RA وارد هسته شده و از طریق رسپتورهای هسته‌ای به طور مستقیم در بیان ژن‌ها تاثیر می‌گذارد [۱۶].

تلاش در جهت تولید سلول‌های زایای بدوی از سلول‌های بنیادی تحت تاثیر محیط‌های القایی حاوی مورفوژن‌های مختلف و دیگر ترکیبات به این دلیل است که در آینده قرار است این سلول‌ها جهت درمان ناباروری در مردانی که بافت بیضه آنها فاقد سلول‌های نطفه ای است استفاده شوند بنابراین لازم است سلامت این سلول‌ها از لحاظ آسیب‌های DNA مورد بررسی قرار گیرند [۱۷]. تحقیقات جدید نشان می‌دهد سنجش پارامترهایی مانند غلظت، مورفولوژی و تحرک به تنهایی نمی‌تواند گویای سلامت سلول‌های جنسی و مخصوصا سلامت DNA باشد. از اینرو بررسی سلول‌های محیط کشت با تکنیک‌های مختلف و تعیین درصد هسته‌های آپوپتیک پس از کشت ضروری به نظر می‌رسد. هدف این مطالعه فراهم کردن محیط کشت مناسب جهت تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و شروع تمایز آنها به سمت سلول‌های جنسی است. از این رو پس از استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت مغز استخوان موش این سلول‌ها در معرض محیط شرایطی شده‌ی حاصل از سلول‌های سرتولی و رتینوئیک اسید قرار گرفتند. از آنجاییکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به شکل کلونی‌های فیبروبلاستیک ظاهر می‌شوند لذا هر سه روز یکبار پس از کشت (روزهای ۲,۵, ۸, ۱۱ و ۱۵) با استفاده از میکروسکوپ اینورت تعداد کلونی‌ها شمارش شد. رنگ‌آمیزی آکریدین- اورنج جهت تعیین تعداد هسته‌های آپویتیک در سلول‌های حاصل از کشت به ترتیب در روزهای ۱۰ و ۱۵ کشت انجام شد. تا محیط کشت

[1] Insulin Like Growth Factor
[2] Fibroblast Growth Factor
[3] Transforming Growth Factor
[4] Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
[5] Retinoic Acid

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

مناسبی که تعداد کلونی‌های بیشتری تولید کرده و آسیب سلولی کمتری به همراه داشته باشد انتخاب شود

روش کار

حیوانات مورد بررسی

در این مطالعه برای استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان از موشهای صحرایی نژاد ویستار استفاده شد. سلول‌های سرتولی نیز از موش‌های سوری۷-۵ روزه استخراج شدند. . در کار با حیوانات موازین اخلاقی رعایت گردید و موش‌ها در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. اتاق نگهداری دارای شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود.

استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان

موش‌های صحرایی نژاد ویستار به کمک کلروفرم بیهوش شدند. با احتیاط پوست پاها کاملاً جدا گردید و بافت و ماهیچه‌های اطراف ران و درشت نی حذف شدند، به طوری که استخوان‌ها نمایان گردیدند. سپس استخوان‌های فمور و تیبیا جدا شدند و بعد با PBS شستشو شدند. در زیر هود یک سر استخوان ران و ساق پا با قیچی استریل قطع شدند و با سرنگ حاوی محیط کشت DMEM (Biowest) که حاوی ۲۰ ٪ سرم جنین گاوی FBS (Biowest) و ۱٪ پنی سیلین- استرپتومایسین (Biowest) بود، سلول‌ها از داخل استخوان به آرامی بیرون کشیده شدند. سپس محتویات سرنگ داخل فالکون ریخته شده و سانتریفوژ شد. به رسوب سلولی ٤ میلی لیتر محیط کشت اضافه شده و در نهایت به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتر تخلیه شدند. بعد از ٤٨ ساعت از کشت، تعویض محیط صورت گرفت. محیط رویی فلاسک خارج شده و سلول‌های چسبیده به کف ظرف باPBS استریل شستشو داده شدند و سپس محیط کشت جدید به سلول‌ها اضافه گردید. زمانی که سلول‌ها تقریباً ۸۰ درصد فلاسک را پر کردند به داخل فلاسک‌های جدید پاساژ داده شدند. برای این کار محیط کشت فلاسک به طور کامل خارج شده و با PBS شستشو داده شد. به هر فلاسک ۲۵ سانتی متری ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین ۲۵/. درصد1X اضافه شده و به مدت ۳ دقیقه در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس سلول‌ها با پیپت پاستور به آرامی از فلاسک خارج شده و به یک لوله فالکون استریل منتقل شدند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی خارج شده و رسوب سلولی به چند میلی لیتر محیط کشت (بسته به تعداد سلول‌ها) اضافه شد تا مخلوط به صورت سوسپانسیون تک سلولی در آید. سپس سوسپاسیون سلولی به دو یا چند فلاسک منتقل گردید. برای اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، از ژن‌های CD105 و CD90 به عنوان ژن‌های بیان شونده و CD34 به عنوان ژن غیر بیانی و از اکتین به عنوان ژن کنترل استفاده گردید (نتایج نشان داده نشده است).

استخراج سلول‌های سرتولی از بیضه موش

برای استخراج سلول‌های سرتولی، از ۱۰عدد موش سوری ۷-۵ روزه استفاده شد. موش‌ها با کلروفوم کاملاً بیهوش شدند. سپس به وسیله پنس و قیچی استریل ناحیه پایین شکم موش برش خورده، بیضه جدا شد و داخل محلول PBS قرار داده شد. با قیچی کپسول بیضه جدا شده و بافت بیضه به قطعات ریز تکه تکه شده و اولین هضم آنزیمی روی آن انجام شد. برای این کار قطعات بیضه در معرض ترکیبی که حاوی۵۰۰ میکرومولار EDTA- تریپسین و ۵۰۰ میکرومولار کلاژناز نوع ٤ بود به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. درطی این مدت نمونه چندین بار پیپتاژ شد تا بافت‌ها از هم جدا گردند. این مرحله برای حذف بافت‌های بینابینی از قطعات لوله‌های منی ساز که حاصل اولین مرحله هضم آنزیمی بودند، لازم است. در مرحله دوم هضم آنزیمی قطعات لوله‌های منی ساز به مدت ۲۰ دقیقه مجدداً تحت تاثیر ترکیب

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

آنزیم کلاژناز و تریپسن- EDTA قرار گرفتند. عمل پیپتاژ دوبار تکرار شد تا جداسازی به خوبی صورت گیرد. در هضم آنزیمی مرحله دوم لوله‌های منی‌ساز هضم می‌شوند. محلول به دست آمده در دور ۸۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول زیری دور ریخته شد و محلول رویی در دور ۲۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی ته فالکون ته نشین می‌شوند. سوسپانسیون سلولی به فلاسک منتقل شده و محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و ۲۰٪ سرم گاوی به آن اضافه شد. فلاسک به مدت دو روز داخل انکوباتور قرار داده شد. تا سلول‌های سوماتیک سرتولی، به کف فلاسک بچسبند. سلول‌های نچسبیده بعد از دو روز با تعویض محیط کشت از محلول خارج شدند. بعد از گذشت یک هفته از کشت هر دو روز یک بار محیط رویی برداشت شده و به عنوان مخیط کشت شرایطی شده فیلتر و استفاده شد.

پروتکل ایمنوسیتوشیمی

حضور سلول‌های سرتولی به کمک روش‌های ایمنوسیتوشیمی مورد اثبات قرار گرفت. در واقع بیان ویمنتین که یک فیلامنت حدواسط بوده و در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی در اطراف هسته مشاهده می‌شود بررسی شد. برای این منظور سلول‌ها با پارافرمالدئید به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شدند. سپس با PBS شستشو داده شده و ۵۰۰ میکرومولار ۱HCL نرمال به مدت نیم ساعت در دمای اتاق به آن اضافه گردید. پس از آن سلول‌ها به مدت ۲-۱ دقیقه با ۵۰۰ میکرومولار بافر بورات شستشو شدند. تریتون۳٪ همراه با سرم بز و PBS به سلول‌ها افزوده شد و آنها به مدت ۱ساعت در معرض این ترکیب بودند. تریتون دترجنت است. چربی‌های غشاء را در خود حل کرده تا غشاء نفوذ-پذیر شود و آنتی‌بادی بتواند به داخل سیتوپلاسم رفته و با ویمنتین که یک فیلامان حدواسط مربوط به سلول‌های سرتولی است پیوند پیدا کند. سپس ۱ میکرومولار آنتی‌بادی اولیه در ۱۰۰ میکرو لیتر PBS حل شده و روی لام‌ها ریخته شد. روی لامها با پارافیلم پوشانده شد و لامها یک شب در این وضعیت باقی ماندند. سپس شستشو با PBS سه بار هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. بعد از آن سلول‌ها در معرض آنتی‌بادی ثانویه (۱۰ میکرو مولار آنتی بادی + ۵۰ میکرو لیتر PBS) به مدت ۲ ساعت، قرار گرفتند. در تمام مواردی که آنتی‌بادی اولیه و ثانویه اضافه می‌شد لامها داخل پلیتی که کف و در آن با کاغذ فویل پوشیده شده و شرایط تاریکی را برای سلول‌ها فراهم می‌کرد قرار گرفتند. پس از تمام این مراحل لامها با PBS شستشو شدند و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه‌بندی گروه‌های تیمار و کنترل

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که در مرحله پاساژ سوم بودند استفاده شد. پس از آنکه تراکم آن‌ها در محیط کشت به طور تقریبی به ۸۰ درصد رسید پلیت حاوی سلول‌ها با استفاده از تریپسین- EDTA تریپسینه شد. با استقاده از لام هموسیتومتر شمارش سلولی انجام شد. برای کنترل سلامت و زنده بودن سلول‌ها، از تریپان بلو به نسبت ۱:۱ برای شمارش استفاده شد . بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در یخچال قرار گرفت .یک قطره از سوسپانسیون بر روی صفحه مشبک لام هموسایتومتر قرار داده شد. لام هموسایتومتر دارای٤ مربع با ابعاد ۱ ×۱×۰/۱ میلی متر است .به عبارت دیگر، حجم هر مربع ۰/۱ میلی متر مکعب می باشد. برای به دست آوردن تعداد سلول‌ها در 1 میلی لیتر، میانگین شمارش سلول‌ها در4 مربع در ۲×۱۰^{٤} ضرب گردید. عدد 2 در این رابطه ضریب رقت سلول‌ها با رنگ تریپان بلو می‌باشد .پس از شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

سلول‌ها به طور یکنواخت با غلظت ۷×۱۰^{٤} در خانه‌های یک پلیت شش خانه توزیع شدند و در حضور DMEM و ۱۵ درصد سرم جنین گاوی کشت شدند. دو روز پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، محیط کشت خارج شد و بر اساس گروه بندی ذکر شده در پایین محیط کشت‌های جدید اضافه شد.

۱) کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت DMEM به همراه ۹٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک (گروه کنترل).

۲)کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت شرایطی شده (حاوی ٤٥٪ محیط DMEM، ٤٥٪ محیط کشت شرایطی شده فیلتر شده)، ۹٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱٪ آنتی بیوتیک بود.

۳) کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت DMEM به همراه ۹٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک و دوز $۱۰^{-۶}$ مولار رتینوئیک اسید.

٤) کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت شرایطی شده و دوز $۱۰^{-۶}$ مولار رتینوئیک اسید

هر سه روز یکبار محیط کشت سلول‌ها با محیط جدید تعویض شده و کلونی‌های ظاهر شده در محیط شمارش گردید. بنابراین پس از گذشت ۲، ۵، ۸، ۱۱و نهایتاً ۱۵روز از کشت تعداد کلونی‌های سلولی ظاهر شده در گروههای مختلف با استفاده از میکروسکوپ اینورت، شمارش و یادداشت شدند و اثر محیط کشت شرایطی شده و رتینوئیک اسید بر روی تعداد کلونی‌ها در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. برای هر گروه ۵ تکرار انجام گرفت. میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو بر روی لام نئوبار محاسبه شد. در پایان روزهای ۱۰ و ۱۵ کشت با انجام رنگ آمیزی اتیدیم بروماید- اکریدین ارنج مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم جهت تعیین آسیب DNA بررسی شد.

بررسی مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم با استفاده ازرنگ آمیزی اتیدیم بروماید و اکریدین ارنج[1]

اکریدین ارنج، یک رنگ حیاتی است که توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود. این رنگ وارد سلول زنده شده و در زیر میکروسکوپ، نمای سبز رنگ به کروماتین سلول زنده می‌دهد. در عوض اتیدیوم بروماید فقط سلول‌های مرده را رنگ می‌کند. در واقع اتیدیوم بروماید وارد سلول مرده شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس، رنگ نارنجی به کروماتین سلول مرده می‌دهد. بنابراین پس از رنگ آمیزی اتیدیوم برماید و آکریدین اورنج هسته‌های سبزرنگ اشاره به سلول‌های زنده دارند در حالی که هسته‌های سبز فراگمنته شده (تکه تکه شده) اشاره به آپوپتوز اولیه دارند. در مقابل هسته‌های قرمز فراگمنته شده نشان‌دهنده آپوپتوز ثانویه است و هسته‌های قرمز یکنواخت نشان دهنده ی نکروز سلولی می‌باشند. جهت رنگ آمیزی ابتدا محیط کشت از ظروف کشت ۶ خانه حاوی سلول‌ها خارج شد و سلول‌ها با PBS شستشو شدند. سپس مخلوط رنگی EB/AO در محیط تاریک به هر خانه اضافه شد و سلول‌ها به مدت ٤ دقیقه در معرض این ماده رنگی قرار گرفتند. پس از گذشت ٤ دقیقه مخلوط رنگی برداشته شده و سلول‌ها مجددا باPBS شستشو شدند. در ادامه با استفاده از میکروسکوپ اینورت سلول‌ها با سیتوپلاسم حباب دار شده مورد شمارش قرار گرفتند. برای این منظور از سلول‌های هر چاهک در ۱۵ میدان دید با بزرگنمایی ۲۰X عکس گرفته شد. به منظور بررسی وضعیت هسته، میانگین تعداد هسته‌های سالم و آپوپتیک تمام میدان‌های دید نیز شمارش شد و میزان هسته‌های آپوپتیک به صورت درصدی از تعدادکل هسته‌های رنگ گرفته گزارش گردید.

[1] EB/AO

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

روش‌های تحلیل آماری

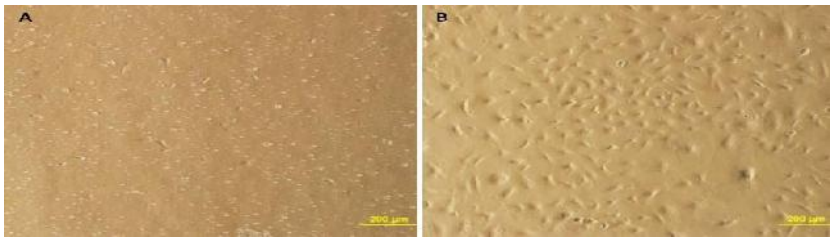
تمامی اطلاعات کمی در این پژوهش به شکل میانگین± انحراف معیار ارائه شد و به کمک تست آماریANOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری در مقایسه بین گروه‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد .

یافته‌ها

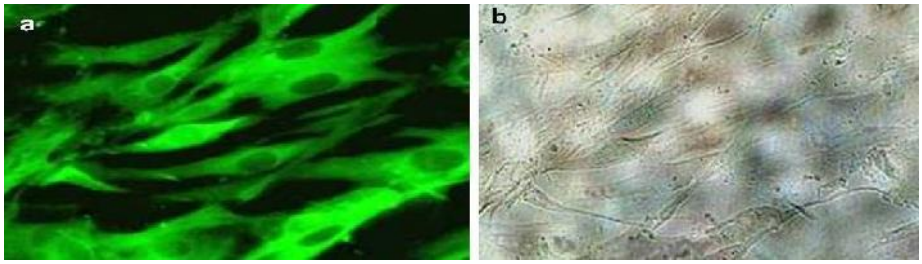
کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های سرتولی

برای استفاده از محیط کشت شرایطی شده در کشت سلول‌های بنیادی استخراج شده از مغز استخوان، سلول‌های سرتولی با روشهای هضم آنزیمی از بیضه موش‌های نوزاد جداسازی شدند و در محیط کشت DMEM کشت شدند. در ابتدای کشت این سلول‌ها حالت کروی داشتند اما پس از گذشت دو روز از کشت از حالت کروی خارج شده دوکی شدند و به کف ظرف چسبیدند (شکل ۱). سلول‌های آزاد و نچسبیده با تعویض پی در پی محیط کشت خارج شدند. یک هفته پس از کشت که جمعیت خالص تری از سلول‌های سرتولی شکل گرفت هر دو روز یک بار محیط کشت سلول‌ها خارج شده, فیلتر شد و به عنوان محیط کشت شرایطی شده استفاده گردید.

جهت اثبات حضور سلول‌های سرتولی از تکنیک ایمنوهیستوشیمی و بررسی بیان فیلامنت حد واسط ویمنتین در این سلول‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد سلول‌های سرتولی از نظر بیان ویمنتین مثبت بودند (شکل ۲).



شکل ۱. کشت سلول‌های سرتولی. A : روز دومB : روز ششم

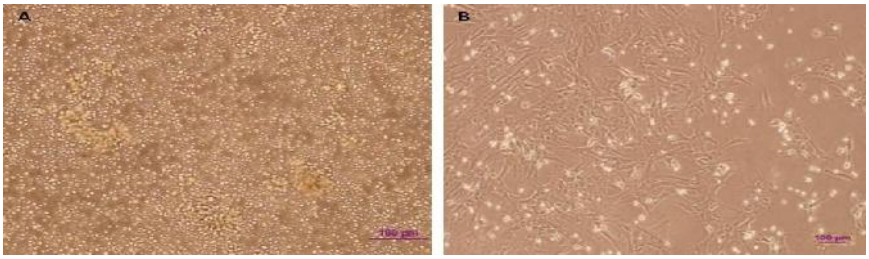


شکل ۲. a) واکنش مثبت ایمنوسیتوشیمی برای فیلامنت حدواسط ویمنتین در سلول‌های سرتولی b) تصویر فازکنتراست از همان اسلاید

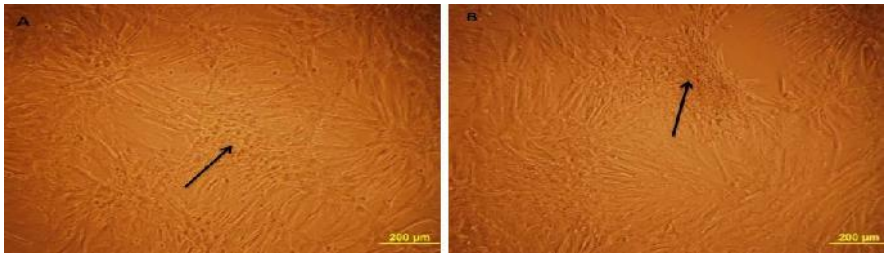
سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان نیز در کشت اولیه به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن به همراه لخته‌های خونی مشاهده شدند (شکلA۳). طی تعویض محیط کشت و در پاساژهای بعدی، سلول‌ها تقریباً کنفورماسیون یکنواختی پیدا کرده و به شکل دوکی و کشیده ظاهر شدند (شکلB۳). در واقع تعویض پی در پی محیط کشت مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به کف فلاسک کشت می‌شود. سلول‌های که به کف فلاسک چسبیدند به تدریج کلونی‌هایی با اندازه‌های مختلف در محیط کشت ظاهر کردند.

کلونی‌ها به تدریج از نظر اندازه درشت تر شدند به طوری‌که در روز ۱۵ کشت بزرگترین کلونی‌ها مشاهده شدند (شکل ٤).

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

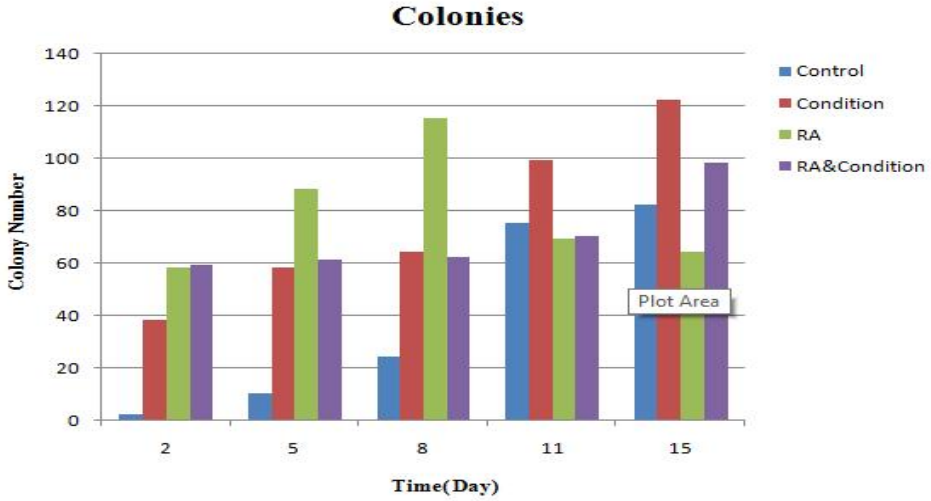


شکل۳. کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان A: روز اول B: روز هفتم



شکل٤. کلونی‌های سلولی حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان (کلونی‌ها با پیکان مشخص شده است) پس از گذشت ۱۵ روز از کشت

پس از گذشت یک هفته از کشت تعداد کلونی‌ها در گروههای کنترل , محیط کشت شرایطی شده و ترکیب محیط کشت شرایطی شده ورتینوئیک اسید رفته رفته افزایش یافت. اما در گروه رتینوئیک اسید به تنهایی ابتدا تعداد کلنی‌ها افزایش یافت اما از روز هشتم به بعد دچار کاهش شد. به طوری که پس از گذشت ۱۵ روز از کشت کمترین تعداد کلنی‌ها در گروه رتینوئیک اسید و بیشترین تعداد کلنی‌ها در گروه محیط کشت شرایطی شده و سپس در گروه ترکیب رتینوئیک اسید و محیط کشت شرایطی شده مشاهده شد (نمودار ۱).



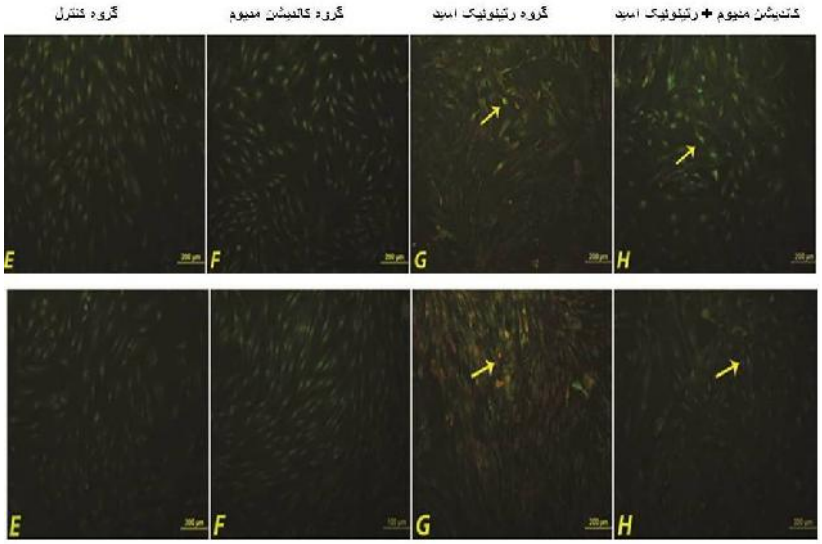
نمودار ۱. میانگین تعداد کلنی‌ها در روزهای مختلف کشت در گروه‌های مورد مطالعه

بررسی مورفولوژی هسته و سیتو پلاسم بااستفاده از رنگ امیزیAO/EB

جهت بررسی آسیب DNA در سلول‌های کشت شده در گروه‌های مختلف، از رنگ آمیزی آکریرین اورنج / اتیدیوم بروماید استفاده شد. نتایج نشان داد تعداد هسته‌های فراگمنته سبز و قرمز در گروه تیمار شده با RA به تنهایی بیشتر از گروه‌های دیگر بود. در گروهی که تحت تاثیر محیط کشت شرایطی

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

شده به تنهایی قرار گرفته بودند تعداد سلول‌های زنده بیشتر از گروه‌های دیگر بود (شکل ۵).



شکل۵. مقایسه مرگ سلولی در پاسخ به رتینوئیک اسید و محیط کشت شرایطی شده. چهار گروه بالایی مربوط به کشت سلول‌ها تا روز دهم کشت است. چهار گروه پایینی مربوط به روز پانزدهم کشت است (سلول‌های آپوپتیک با پیکان مشخص شده است.)

با شمارش هسته‌های آپوپتیک طی رنگ آمیزی‌های آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید در گروه‌های مختلف و نیز انجام آزمون آماری نتایج زیر حاصل شد:

جدول ۱. مقایسه درصد آپوپتوز در گروههای کنترل و تیمار طی رنگ آمیزی اکریدین ارنج - اتیدیم بروماید پس از گذشت ۱۰و ۱۵ روز از کشت

گروهها	روز ۱۰	روز ۱۵
کنترل	٤/۷±۰/۹۰	۶/۱±۱/۳
محیط کشت شرایطی شده	۲/۳±۰/۸٤	۲/۸±۰/۶۳
رتینوئیک اسید	۲۱/۱۵±۱/۷	۲۳/۲۵±۶/۱۵
محیط کشت شرایطی شده + رتینوئیک اسید	۳/۸±۰/۸۳	۶/۲±۱/٤

نتایج نشان داد در روز دهم کمترین درصد سلول‌های آپوپتوزشده در گروه Conditioned Medium (۲/۳± ۰/۸٤درصد) و بیشترین درصد در سلول‌های گروه RA (۲۱/۱۵±۱/۷٪) مشاهده می‌شود. بین گروه رتینوئیک اسید با گروه‌های کنترل و محیط کشت شرایطی شده و ترکیب رتینوئیک اسید و محیط کشت شرایطی شده اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده می‌شود ($p\leq$۰/۰۵). در روز پانزدهم نیز کمترین درصد سلول‌های آپوپتیک در گروه القا شده با محیط کشت شرایطی شده (۰/۶۳± ۲/۸٪) و بیشترین درصد آپوپتوز در سلول‌های گروه RA (۲۳/۲۵ ± ۶/۱۵٪) مشاهده می‌شود. در روز پانزدهم نیز بین گروه رتینوئیک اسید با گروه‌های کنترل و محیط کشت شرایطی شده و ترکیب رتینوئیک اسید و محیط کشت شرایطی شده اختلاف آماری معنی داری مشاهده می‌شود ($p\leq$۰/۰۵) (جدول ۱).

بحث

در افراد مبتلا به سرطان استفاده از رادیوتراپی وداروهای شیمی درمانی مثل بوسولفان، ملفان، سیکلو فسفامید، پرو کاربازین و... اثر سوء بر فرایند اسپرماتوژنز دارد وباعث کاهش اسپرم یا آسیب به DNA اسپرم می‌گردد و فرد به مرور ممکن است توانایی باروری خود را از دست دهد [۱۸]. بنابراین در برخی از این افراد که به علت شیمی درمانی و

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

رادیوتراپی توانایی تولید اسپرم ندارند و یا افرادی که مبتلا به آزو اسپرمی غیر انسدادی هستند، تولید سلول‌های ژرمینال در محیط آزمایشگاهی می‌تواند نوید دهنده درمان باشد.

در مطالعه حاضر اثرات محیط شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی (محیط کشت شرایطی شده) و رتینوئیک اسید در طی روزهای مختلف کشت بر روی تکثیر, کلونی زایی و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت. مغز استخوان دارای دو نوع اصلی سلول‌های بنیادی می‌باشند: یکی سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک[1] یا سلول‌های بنیادی خونساز که مسئول تولید سلول‌های خونی می‌باشند و دیگری سلول‌های بنیادی غیر خونساز یا سلول‌های بنیادی مزانشیمی[2] که چند توان بوده وانواع مختلف سلول‌ها را به وجود می‌اورند [۹۱]. در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی غیر خون ساز با روش آسپیراسیون استخراج گردید. در اصل اولین بار فریداستاین[3] از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها جهت جداسازی آن‌ها استفاده کرد [۲۰]. در مطالعه حاضر استخراج سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان، تقریبا مشابه با روش فریداستاین انجام گرفت. هرچند ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال، لنفوسیت‌ها و سلول‌های ماهیچه ای صاف واقع در مغز استخوان هم توانایی چسبیدن به کف فلاسک و آلوده ساختن کشت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارند ولی طی پاساژهای مختلف حذف می‌شوند.

بر طبق مطالعات گذشته سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان توانایی تولید کلونی‌های فیبروبلاستیک را دارند. در مطالعه ای که توسط آبنوسی و همکاران انجام گرفت توان کلونی زایی این سلول‌ها و تمایز آنها به استئوبلاست در حضور پارانوئیل که یک ترکیب سمی موجود در مواد آرایشی و شوینده می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با گذشت زمان توان تولید کلونی‌های مزانشیمی به طور معنی دار در حضور این ترکیب سمی کاهش می‌یابد [۲۱] نتایج مطالعه دیگری که توسط زارع و همکاران انجام شد نشان داد سلول‌های بنیادی مشتق از ورید بند ناف دارای توان کلونی زایی می‌باشند و این کلونی‌ها در حضور محیط کشت حاوی دگزامتازون، بتاگلیسروفسفات و آسکوربات که محیط تمایزی استخوان می‌باشند قدرت تمایز به استخوان را دارا می‌باشند[۲۲]. در مطالعات باتولا [4] و همکاران و نیز مطالعات آکی یاما[5] و همکاران سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول‌هایی که قابلیت شکل دهی کلونی‌های کوچک منفرد در سطح ECM را دارند معرفی شده اند [۲۴،۲۳] درواقع مونیتور کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت با شناسایی کلونی‌های فیبروبلاستیک چسبنده به این محیط و نیز روشهای فلوسیتومتری با استفاده از آنتی بادی‌های مخصوص انجام می‌شود [۲۵]

در مطالعه حاضر توان تکثیر و کلونی زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور محیط کشت شرایطی شده و رتینوئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تعداد کلونی‌های سلول‌های بنیادی در گروهی که تحت تاثیر محیط کشت شرایطی شده قرار گرفته بودند با گذر زمان رشد صعودی داشتند و تعدادشان افزایش یافت، به طوریکه در روز پانزدهم بیشترین تعداد کلنی‌ها در این گروه مشاهده شد. در مقابل سلول‌هایی که تحت تاثیر رتینوئیک اسید به تنهایی قرار گرفتند شکل گیری کلنی‌ها ابتدا در آنها رشد صعودی داشت اما بعد از روز هشتم تعداد این کلنی‌ها کاهش یافت، به طوریکه در روز پانزدهم کمترین تعداد کلنی‌ها مشاهده شد.

[1] Hoematopoitic Stem Cells
[2] Mesenchymal Stem Cells
[3] Feridenstein
[4] Battula
[5] Akiyama

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

مطالعات پیشین نشان داده Conditioned Medium حاصل از سلول‌های سرتولی باعث افزایش تکثیر سلول‌های مختلف می‌شود. شامخ[1] و همکاران نشان دادند، سلول‌های سرتولی خارج شده از بیضه در حین هم‌کشتی در شرایط آزمایشگاهی باعث افزایش تعداد و بهبود ساختار و عملکرد تکاملی نورون‌ها می‌شوند [۲۶]. مطالعات زی‌هانگ[2] و همکاران نشان داد هم‌کشتی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با سلول‌های سرتولی باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در تکثیر و مهاجرت مثل Cyclin D1،Cyclin D3، Akt می‌شود. در نتیجه تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد [۲۷]. تحقیقات نشان داده هم کشتی سلول‌های اندوتلیال با سلول‌های سرتولی باعث افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال پس از گذشت ۷۲ ساعت می‌شود و سطح بیان KDR (رسپتور VEGF) نیز افزایش می‌یابد. احتمالا محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی در رگ زایی و رساندن اکسیژن کافی به سلول‌های ناحیه پیوند شده نقش به سزایی دارد [۲۸].

در محیط داخل بدن سلول‌های زایای اولیه در میان ریز محیط داخل لوله‌های منی‌ساز[3] قرار دارند. سرنوشت این سلول‌ها توسط فاکتورهای پاراکرین و اندوکرین باالقوه‌ای که توسط خود سلول‌های زایا و یا سلول‌های سوماتیک اطراف تولید می‌شود قابل تنظیم است [۲۹]. از آن‌جا که سلول‌های سرتولی تنها سلول‌هایی هستند که در ارتباط مستقیم با سلول‌های بنیادی هستند تنظیم منبع سلول‌های زایا احتمالاً از طریق این سلول‌ها می‌باشد. سرتولی‌ها دارای نواحی تماس با سلول‌های زایا بوده و این ارتباط را از طریق دسموزوم و کمپلکس‌های منفذدار برقرار می‌کنند [۳۰]. از آنجایی که در مطالعه حاضر رتینوئیک اسید به عنوان یک القا کننده تمایز به محیط کشت سلول‌های مزانشیمی اضافه گردید و محیط شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی نیز اطراف سلول‌ها حضور داشت احتمالا این سلول‌ها وارد مسیر تمایز شده و از طریق کمپلکس‌های منفذ دار و دسموزوم‌ها با ترشحات سلول‌های سرتولی وارد واکنش شدند و میزان تکثیر و کلونی زایی آنها افزایش یافت. در واقع فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های موجود در محیط شرایطی شده وارد فضای بین سلول‌های مزانشیمی شده با اتصال به گیرنده، نقش خود را در برقراری واکنش‌های آبشاری سلولی ایفا می‌کنند لذا در مسیر رونویسی از ژن‌های خاص تکثیر سلولی قرار می‌گیرند. به دنبال آن احتمالا مسیرهای درون سلولی یا برون سلولی آپوپتوز مهار می‌گردد.

علاوه بر اینها بر اساس تئوری دیسک حافظه سلول[4] سلول سرتولی بهترین سلولی است که می‌توان برای هم کشتی انتخاب کرد زیرا به دلیل موقعیت مکانی خود نسبت به سلول‌های اسپرماتوگونی، حافظه نگهداری و حمایت از این سلول‌ها را در خود دارند [۳۳-۳۱]، بنابراین اگر رتینوئیک اسید سلول‌های مشابه زایا در محیط کشت تولید کرده باشد ترشحات سلول‌های سرتولی قادر به حمایت این سلول‌ها خواهد بود.

در این مطالعه واکنش ایمونوسیتوشیمی وجود پروتئین سایتواسکلتون ویمنتین را در سلول‌های سرتولی اثبات کرد. ویمنتین پروتئینی است که از روز ۱٤ جنینی به بعد در سلول‌های سرتولی و در اطراف هسته آنها بیان می‌شود. لذا نتایج تایید سلول‌های سرتولی بر اساس وجود پروتئین ویمنتین در این مطالعه با یافته‌های ریچ بورگ[5] و همکاران مطابقت دارد [۳٤].

در سال‌های اخیر تولید سلول‌های زایای بدوی از انواع مختلف سلول‌های بنیادی در حیوانات مورد

[1] Shamekh
[2] Zhang
[3] Nich
[4] Cell Memory Disk
[5] Richburg

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

چالش قرار گرفته است. طراحی محیط کشت‌هایی که بتوانـد تعـداد سـلول‌هـای بنیـادی را افـزایش داده و سلامت آنها را از نظر آسیب‌های DNA تضمین کنـد حـائز اهمیـت زیـادی مـی‌باشـد. امـروزه روشـهای مختلفی برای تشخیص آپوپتوز و مرگ برنامه ربزی شده سـلولی وجـود دارد. تسـت‌هـای تانـل، کاسـپاز، DNA Ladder و آزمون کامـت بـرای ایـن منظـور استفاده می‌شوند. روش آکریدین اورنـج نیـز روش دیگـری بـرای شناسـایی مورفولـوژی سـلول‌هـای آپوپتیک می‌باشد که نسبت به روشهای بالا مقرون به صرفه تر می‌باشـد [۳٤]. در مطالعـه حاضـر بررسـی مورفولـوژی هسـته و سیتوپلاسـم بـا رنـگ آمیـزی آکریدین ارنج نشان داد گروه محیط کشت شرایطی شده کمترین درصـد سـلول‌هـای آپوپتیـک و گـروه رتینوئیک اسید بیشترین تعداد سلول‌های آپوپتیک در روزهای ۱۰ و ۱۵ تمایز را شامل می‌شوند. مطالعـات زانگ[1] و همکاران نشان داد که هم‌کشـتی سـلول‌هـای مزانشیمی بنـد نـاف بـا سـلول‌هـای سـرتولی باعـث افزایش بیان ژن‌های دخیل در تکثیر و مهـاجرت مثـل Cyclin D3،Cyclin D1 ، Akt مـی‌شـود [۳۵] در نتیجه تعداد کلونی‌های مزانشـیمی در محـیط کشـت افزایش می‌یابد.

زانـگ و همکـاران اولـین بـار دوز ۱ میکـرو مـولار رتینوئیک اسید را به مدت ۳ روز بر روی سلول‌هـای مزانشیمی مغز استخوان تاثیر دادند و نشان دادند که دوز۱ میکرو مولار رتینوئیک اسید باعـث مهـار رشـد سلولی نسبت به گروه کنترل می‌شود و سـطح بیـان cyclin A ،cyclinE،cdk2 کـه تنظـیم کننـده‌هـای چرخه سـلولی هسـتند را کـاهش مـی‌دهـد و چرخـه سـلولی در عبـور از مرحلـه ی G1 بـه S متوقـف می‌شود. از طرفی القـای بیـان ژن‌هـای ضـد تکثیـری p27Kip1 و p16INK4A اتفاق می‌افتد. به دنبال این واکنش‌ها تعداد سلول‌ها و در نتیجه کلونی‌ها کـاهش می‌یابند [۳۶]. زانوتو[2] و همکاران غلظت‌های مختلـف RA (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۰میکرو مـولار) را به مدت ۲٤ ساعت بر روی سلول‌های سرتولی تـاثیر دادند و نشان دادند که کاهش تعداد سلول‌های زنده در دوزهای ۰/۵ تـا ۱۰ میکرومـولار رتینوئیـک اسـید مشـاهده مـی‌شـود. بنـابراین RA در دوزهـای سـلول‌هـای مختلـف باعـث کـاهش حیـات سـلول‌هـا می‌شود و افزایش آپوپتوز می‌شود [۳۷]. در مطالعـه ما نیز درصد سلول‌های آپوپتیک در گروه القـا شـده با رتینوئیک اسید به تنهایی بیشتر بود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان مـی‌دهـد کـه اثـرات رتینوئیک اسید روی تکثیر و بقای سـلول‌هـای بنیـادی مغز استخوان وابسته به زمان است، به نظر می‌رسـد که در زمان کم باعث افزایش تکثیر سلول‌ها و تولیـد تعداد زیادی کلونی می‌شود در حالی کـه بـا افـزایش زمان همین غلظت انـدک ۱میکـرو مـولار رتینوئیـک اسید باعث کـاهش تعـداد کلـونی‌هـا و نهایتـا شـروع آپوپتوز سلول‌ها می‌گـردد. همچنـین محـیط کشـت شرایطی شده حاصـل از سـلول‌هـای سـرتولی باعـث افـزایش تکثیـر سـلول‌هـای بنیـادی مغـز اسـتخوان می‌شود. به نظر می‌رسد که در تمایز سلولی استفاده از محیط کشت شرایطی شده در کنار رتینوئیک اسید به دلیل خاصیت تکثیری آن بهتر از رتینوئیک اسید به تنهایی باشد. با توجـه بـه اثـر مسـاعد محـیط کشـت شرایطی شده در افزایش تعداد کلنی‌های سلول‌هـای مغز استخوان، می‌توان از هم‌کشـتی سـلول‌هـای مغـز استخوان با محیط کشت شرایطی شده برای افـزایش تعداد سلول‌ها قبل از پیوند استفاده کرد.

[1] Zhang

[2] Zanotto

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقی حاصل پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد. از مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی که در فراهم کردن شرایط لازم برای انجام این کار ما را حمایت کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

References

1- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 Jul-Sep; 8(3): 301-16.

2- Baharvand H, Kazemi Ashtiani S. Embryonic stem cells: concepts and potentials. Yakhteh. 2005 Oct; 7(27):178-93.

3- Keating A. Mesenchymal stromal cells. Curr Opin Hematol. 2006 Nov;13(6):419-25.

4- Dexter TM. Stromal cell associated haematopoiesis. J Cell Physiol Suppl. 1982; 1:87-94.

5- Kermani SH, Karbalaei K, Madani H, Jahangirnezhad A, Nasresfahani MH. Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. Arak Med Univ J. 2008 Fall; 11(3): 117-25. [Full text in Persian]

6- Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. Lab Invest. 2006 Jul; 86(7): 654-63.

7- Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. Am J Pathol. 2007 Mar;170(3):899-908.

8- Lassalle B, Mouthon MA, Riou L, Barroca V, Coureuil M, Boussin F. Bone Marrow-derived stem cells do not reconstitute spermatogenesis in vivo. Stem Cells. 2008 May; 26(5): 1385-6.

9- Xuemei L, Jing Y, Bei X, Juan H, Xinling R, Qun L. Retinoic acid improve germ cell differentiation from human embryonic stem cells. Iran J Reprod Med. 2013 Nov;11(11):905-12.

10- Li P, Hu H, Yang S, Tian R, Zhang Z, Zhang W. Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro through embryoid body formation and retinoic acid or testosterone induction. Biomed Res Int. 2013; 1-9.

11- Xie L, Lin L, Tang Q, Li W, Huang T, Huo X, et al. Sertoli cell-mediated differentiation of male germ cell-like cells from human umbilical cord Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in an in vitro co-culture system. Eur J Med Res. 2015 Feb; 20(9): 35-47.

12- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, & Nieschlag E. Physiology of testicular function. Andro J, Springer Berlin Heidelberg. 2010 Apr; 47(3):11-59

13- Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, & Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. Nat Rev Uro. 2012 May;9(6): 330-338.

14- Shamekh R, Saporta S, Cameron DF, Willing AE, Sanberg CD, Johe K, et al. Effects of sertoli cell-conditioned medium on ventral midbrain neural stem cells: a preliminary report. Neurotox Res. 2008 May-Jun;13(3-4):241-6.

15- Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, de Oliveira RB, Dal-Pizzol F, Izquierdo I, et al . Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. Cell Signal. 2006 Oct;18(10):1685-94.

16- Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. Cell. 2008 Sep; 134(6): 921-931.

17- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online. 2005 Aug;11(2):198-205.

18- Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 2004 Jan; 427(6970): 148-154.

19- Griswold MD, Hogarth CA, Bowles J, Koopman P. Initiating meiosis: the case for retinoic acid. Biol Reprod. 2012 Feb 14;86(2):35.

Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 8:09 IRST on Friday October 20th 2017

20- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 1966 Dec;16(3):381-90.
21- Abnosi MH, Soleimani M, Dehdehi L. Para-nonylphenol impairs osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells by influencing the osteoblasts mineralization. Iranian J Med Sci. 2012Nov; 15(6): 1131-1139.
22- Zare MA, Baghban Eslaminezhad MR, Hosseini A. Study of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord vein wall and determining the Process of differentiation to cartilage and bone. Iran South Med J. 2015; 17 (6) :1135-1142
23- Battula VL, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinc mesenchymal stem cells subsets using antibodies against CD56, CD271 and mesenchymal stem cell-1. Haematologica. 2009 Feb; 94(2):173-184.
24- Akiyama K, You YO, Yamaza T, Chen C, Tang L, Jin Y, et al. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. Stem Cell Res Ther. 2012 Oct 19;3(5):40.
25- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood. 2001 Jun; 98(7):2396-2402.
26- Shamekh R, Saporta S, Cameron DF, Willing AE, Sanberg CD, Johe K, et al. Effects of Sertoli cell-conditioned medium on ventral midbrain neural stem cells: a preliminary report. Neurotox Res. 2008 May-Jun;13(3-4):241-6.
27- Zhang F, Lu M, Liu H, Ren T, Miao Y, Wang J. Sertoli cells promote proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in co-culture. Indian J Exp Biol. 2016 May; 54(5): 309-14.
28- Fan P, He L, Pu D, Lv X, Zhou W, Sun Y, et al. Testicular Sertoli cells influence the proliferation and immunogenicity of co-cultured endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jan 21;404(3):829-33.
29- Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Nov; 4(11): 1-19.
30- Tokas J, Mukhopadhyay CS, Verma A. Self-renewal of spermatogonial stem cells: the most promising multipotent cells- a review. Vet World. 2011; 4(5): 234-240.
31- Anjamrooz SH. CMD kinetics and regenerative medicine. Am J Transl Res. 2016 Apr; 8(3): 1615-24
32- Anjamrooz SH. Cell memory-based therapy. J Cell Mol Med. 2015 Nov; 19 (11):2682-9
33- Anjamrooz SH. The cellular memory disc of reprogrammed cells. Stem Cell Rev. 2013 Apr; 9(2):190-209
34- Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. Toxico Appl Pharmmacol. 1996 Mar; 137(1): 42-50.
35- Parra MT, Viera A, Gómez R, Page J, Benavente R, Santos JL, et al. Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. J Cell Sci. 2004 Mar; 117(7):1221-1234.
36- Zhang F, Hong Y, Liang W, Ren T, Jing S, Lin J. Co-culture with Sertoli cells promotes proliferation and migration of umbilical cord mesenchymal stem cells. Biochem biophys res commun. 2012 Oct; 427(1):86-90.
37- Zanotto-Filho A, Cammarota M, Gelain DP, Oliveira RB, Delgado-Cañedo A, Dalmolin RJ, et al. Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. Toxicol in Vitro. 2008 Aug; 22(5):1205-1212.