



Comparison of Differentiation and Proliferation Potential of Umbilical Cord and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Production of Germ-Like Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Salem M.¹ MSc,
Mirzapour T.^{*2} PhD,
Bayrami A.¹ PhD,
Ghaem Maghami R.¹ MSc

How to cite this article

Salem M, Mirzapour T, Bayrami A, Ghaem Maghami R. Comparison of Differentiation and Proliferation Potential of Umbilical Cord and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Production of Germ-Like Cells. Pathobiology Research. 2019;22 (1):41-50.

¹Biology Department, Sciences Faculty, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

²Biology Department, Sciences Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran

*Correspondence

Address: Biology Department, Sciences Faculty, Manzarieh Boulevard, Rasht, Guilan, Iran. Postal Code: 4193833697

Phone: +98 (13) 33343630

Fax: +98 (13) 33343633

dr.tooba72@gmail.com

Article History

Received: February 03, 2018

Accepted: March 05, 2018

ePublished: March 11, 2019

ABSTRACT

Introduction Due to increase of infertile couples, potential differentiation and proliferation of umbilical cord mesenchymal stem cells (MSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) was compared to find proper stem cells for differentiation into germ-like cells.

Materials & Methods In this experimental study, isolated umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells were treated by Retinoic acid (10⁻⁶M) and Sertoli cells condition medium. Viability percentage and the rate of proliferation (population doubling time) of cells was calculated in both groups. The number of colonies was evaluated in different days of culture, and finally the expression of premeiotic and meiotic genes investigated by RT-PCR.

Findings The viability percentage was higher in BM-MSCs group and the rate of proliferation of cells increased by elevating the passage number. The number of colonies in the bone marrow stem cells was significantly higher than that of the umbilical cord MSCs (p<0.05). In contrast, the expression of PLZF, OCT4 and SCP3 genes were detected in umbilical cord MSCs after 10 days of culture. However, in BM-MSC, the expression of PLZF and SCP3 genes was observed only after 15 days of culture.

Conclusion It seems that the human umbilical MSCs have higher differentiation potential for producing germ-like cells when compared to the Bone marrow stem cells. In contrast, the proliferation potential of BM-MSCs is greater than umbilical cord MSCs. This difference is probably due to secreted growth factors from these cells.

Keywords BM-MSCs; Umbilical cord MSCs; Cell Proliferation; Cell Differentiation; Infertility

CITATION LINKS

[1] BMP4 cooperates with retinoic acid ... [2] PLAG1 deficiency impairs spermatogenesis ... [3] Derivation of male germ cell-like lineage ... [4] Comparison of human amniotic ... [5] Sertoli cell-mediated differentiation ... [6] In vivo differentiation of mesenchymal ... [7] CD61 promotes the differentiation of canine ADMSCs ... [8] CHIR99021 combined with retinoic acid ... [9] Derivation of male germ cells from ram bone ... [10] Two complementary strategies to improve cell ... [11] Human umbilical cord MSCs as new cell sources for ... [12] Bone marrow-mesenchymal stem cells ... [13] Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth ... [14] Stem cells and adipose tissue ... [15] Can mesenchymal stem cells improve spermatogonia ... [16] Physiology of testicular ... [17] Sertoli cell condition medium can induce ... [18] Isolation, culture and characterization ... [19] parallel cellular suicide mechanisms participate ... [20] Retinoic acid induces apoptosis by ... [21] Retinoic acid synthesis and signaling during ... [22] Retinoic acid inhibits rat XY gonad development ... [23] Vitamin A regulation of BMP4 expression in the ... [24] Initiating meiosis: The case for retinoic ... [25] Derivation of male germ cells from ... [26] Proliferation and differentiation of bovine ... [27] Mesenchymal stem cells repair germinal cells of ... [28] Derivation of embryonic germ cells and male ... [29] Mesenchymal stem cells from rat visceral fat ... [30] Relationship between the telomerase ... [31] Mesenchymal stem cells with high growth ... [32] Recovery of fertility in azoospermia rats after ... [33] The effects of sertoli cells condition medium ... [34] In vitro-differentiated embryonic stem cells give ... [35] Fate of bone marrow stem cells transplanted ... [36] Differentiation of human umbilical cord ... [37] Bone marrow-derived stem cells do not reconstitute ...

مقایسه پتانسیل تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و ژله وارتنون بند ناف در تولید سلول‌های شبه‌زایا

مریم سالم MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

طوبی میرزابور* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

ابوالفضل پایرامی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

رقیه قائم‌مقامی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

اهداف: با توجه به افزایش روزافزون زوج‌های نابارور، در این مطالعه پتانسیل تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و سلول‌های بنیادی مغز استخوان مورد مقایسه قرار گرفت تا سلول بنیادی مناسبی، به‌منظور تمایز به سلول‌های زایا معرفی شود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتنون بند ناف و مغز استخوان پس از استخراج، تحت تاثیر غلظت 10^{-7} امولار رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی قرار گرفتند. درصد زیستایی و سرعت تکثیر (زمان دوبرابرشدن جمعیت سلولی) در هر دو گروه محاسبه شد. تعداد کلنی‌ها طی روزهای مختلف کشت، ارزیابی و در نهایت بیان ژن‌های پیش‌میوزی و میوزی با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز معکوس (RT-PCR) بررسی شد.

یافته‌ها: درصد زیستایی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیشتر بود و با افزایش تعداد پاساژ، سرعت تکثیر سلول‌ها در این گروه افزایش یافت. تعداد کلنی‌های ایجادشده در سلول‌های بنیادی مغز استخوان نسبت به سلول‌های بنیادی بندناف، به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). در مقابل بیان ژن‌های *SCP3* و *OCT4*، *PLZF* در سلول‌های بنیادی بند ناف، پس از گذشت ۱۰ روز از کشت مشاهده شد، ولی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان، بیان ژن‌های *PLZF* و *SCP3* فقط پس از گذشت ۱۵ روز از کشت قابل مشاهده بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف به سلول‌های شبه‌زایا بیشتر از پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان و در مقابل پتانسیل تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیشتر از سلول‌های بنیادی بندناف است. این تفاوت احتمالاً به‌دلیل فاکتورهای ترشح‌شده از این سلول‌ها است.

کلیدواژه‌ها: سلول بنیادی مغز استخوان، سلول بنیادی بندناف، تکثیر سلولی، تمایز سلولی، ناباروری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۴

* نویسنده مسئول: dr.tooba72@gmail.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی، یک راهکار درمانی مفید برای ترمیم و بازسازی دوباره بافت‌ها فراهم می‌کنند [1]. محققان نشان داده‌اند که تولید اسپرم از سلول‌های بنیادی تحت شرایط آزمایشگاهی، در تولید و حفظ حیوانات ترانس‌ژنیک موثر است [2]. علاوه بر این، مطالعات اخیر تولید سلول‌های زایا از انواع متفاوتی از سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی مغز استخوان [3]، سلول‌های بنیادی ژله وارتنون [4، 5]، سلول‌های بنیادی بافت چربی [6، 7]، سلول‌های بنیادی جنینی [8] را گزارش کرده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروهی از سلول‌ها هستند که در بخش‌های متنوعی مانند مغز استخوان، خون بند ناف، جفت، کبد، طحال و تیموس یافت می‌شوند [9، 10]. پیوند سلول‌های بنیادی میزبان، با تنوع منابع دهنده سلول‌های بنیادی، دسترسی سریع به آن و نبود مشکلات اخلاقی در ارتباط است [11].

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی

علی‌رغم اینکه سلول‌های بنیادی مغز استخوان و ژله وارتنون بند ناف، ویژگی‌های مشترک سلول بنیادی را داشته ولی تفاوت‌هایی نیز از نظر عملکردی دارند. سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارای توان تکثیر برای مدت طولانی هستند. از طرفی پیوند اتوگراف این سلول‌ها، خطر رد پیوند کمتری نسبت به بافت‌های جنینی دارد [12].

سلول‌های بنیادی ژله وارتنون، از بند ناف انسان که پس از تولد کاربرد فیزیولوژیک ندارند و به‌راحتی در دسترس هستند، استخراج می‌شوند [13]. مطالعات زیادی نشان دادند که این سلول‌ها می‌توانند به انواع سلول‌های دیگر مانند سلول‌های شبه‌زایا تمایز یابند [14]. انتخاب ریزمحیط مناسب و نیز منبع سلولی با پتانسیل تمایزی بالا، نقش مهمی در تمایز دارد. ریزمحیط سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بخش قاعده‌ای لوله‌های منی‌ساز در محافظت و خودنوزایی این سلول‌ها نقش مهمی دارند [15]. همچنین تمایز سلول‌های بنیادی به اسپرم، به تولید فاکتورهای محیطی لازم از سلول‌های سرتولی بستگی دارد. این سلول‌ها در غشای پایه لوله‌های منی‌ساز حجمی حدود ۲۰-۱۷٪ لوله‌ها را اشغال می‌کنند. هر سلول سرتولی ۵۰-۳۰ سلول اسپرماتوگونی را حمایت می‌کند [16]. عملکرد سلول‌های سرتولی شامل فراهم‌نمودن حمایت فیزیکی، غذایی و هورمونی برای سلول‌های زایا، فاگوسیتوز سلول‌های آسیب‌دیده و تنظیم فرآیند اسپرماتوز از طریق تولید پروتئین‌ها و فاکتورهای ضروری است [17-19]. از میان فاکتورهای تولیدشده، رتینوئیک‌اسید نقش بسیار مهمی در تمایز اسپرم دارد.

ویتامین A (رتینول) گروهی از مواد شیمیایی و شبه‌هورمونی هستند که توسط سلول‌های کبدی تولید شده و وارد جریان خون می‌شوند. در اثر اکسیداسیون در روده به رتینوئیک‌اسید تبدیل می‌شوند و پس از آن که توسط شیلومیکرون‌ها جذب شدند، از طریق جریان خون به سلول‌های مختلف انتقال می‌یابند [20]. سنتز رتینوئیک‌اسید در بخش‌های خاصی از بدن و در مرحله خاصی از تکوین صورت می‌گیرد [21]. این مولکول نمی‌تواند مستقیماً به ژن‌ها متصل شود بلکه برای تنظیم بیان ژن‌ها باید به یک‌سری از عوامل رونویسی که گیرنده‌های هسته‌ای RAR هستند اتصال یابند. رتینوئیک‌اسید در سلول هدف دارای دو نوع رسپتور به نام گیرنده‌های X رتینوئیک (RXRs) و گیرنده‌های رتینوئیک‌اسید (RARs) هستند [22].

رتینوئیک‌اسید در تکوین سیستم تولیدمثلی، ورود سلول‌های زایا به مرحله میوز و افزایش بیان ژن *Strab* نقش مهمی دارند [23]. کریس‌ولد و همکاران نشان دادند که در دوران جنینی رتینوئیک‌اسید در گنادها سنتز نمی‌شود بلکه به‌وسیله مزونفروس تولید شده و به سمت گنادها حرکت می‌کند. در جنس نر، رتینوئیک‌اسید بعد از ورود به گنادها، توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده CYP26B1 تخریب شده و مانع ورود سلول‌های زایا به مرحله میوز می‌شود. این آنزیم‌ها توسط سلول‌های سوماتیک سرتولی و سلول‌های میوبیدی اطراف لوله‌های منی‌ساز تولید شده و باعث تجزیه رتینوئیک‌اسید می‌شوند [24]. هنگام بلوغ تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده رتینوئیک‌اسید کاهش یافته و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت تاثیر ریزمحیط بیضه و ترشحات سلول سرتولی وارد فرآیند اسپرماتوز و تولید اسپرم می‌شوند. بنابراین رتینوئیک‌اسید و سلول‌های سرتولی، فاکتورهای مهم در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های اسپرم هستند. گزارش‌های مختلف در مورد پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به سلول‌های زایای بدوی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه و اسپرماتید نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی در شرایط

مخلوط به صورت سوسپانسیون تک سلولی در آید. پس از شمارش سلولها زیر لام نئوبار، بسته به تعداد سلولها، سوسپانسیون سلولی که حاوی سلولهای بنیادی مغز استخوان و نیز سلولهای خونی است به دو یا چند فلاسک جدید منتقل شد [25]. طی تعویض محیط کشت سلولهای نجسیده که بیشتر سلولهای خونی هستند، خارج شدند و جمعیت خالصتری از سلولهای بنیادی مغز استخوان به دست آمد.

استخراج سلولهای بنیادی بند ناف: نمونههای بند ناف نوزادان پسر تازه متولد شده (۲۰ نمونه) با رعایت اصول اخلاق در پژوهش و با رضایت مادر پس از زایمان، با همکاری پرسنل بیمارستان قائم اردبیل جمع آوری شد. نمونهها تحت شرایط استریل در ظروف حاوی سرم فیزیولوژیک به آزمایشگاه منتقل و با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه شسته شدند. سپس در معرض PBS که به آن ۲۰ میکرولیتر پنی سیلین + استرپتومایسین، ۱۰ میکرولیتر آمفی تریسین و ۱۶ میکرولیتر جنتامایسین اضافه شده بود قرار گرفتند. شستن مکرر با PBS، باعث ضد عفونی بیشتر و حذف باقی مانده سلولهای خونی می شود. نمونههای بند ناف با قیچی به قطعات کوچکتر تقسیم شد. به وسیله پنس دو سر خرگ و یک سیاهرگ از بافت جدا و قسمت باقی مانده که همان تکه های ژله وارتون بود، به قطعاتی کمتر از ۰/۵ میلی متر تقسیم شد. برای اطمینان از عدم وجود خون در نمونهها، یک بار دیگر قطعات با PBS شسته و به محیط کشت DMEM که حاوی ۱۵٪ سرم گوساله و ۱٪ پنی سیلین + استرپتومایسین (pen strep) بود منتقل شد. فلاسکها در انکوباتور دارای ۸۸٪ رطوبت و ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۷°C قرار داده شدند. هر سه روز یکبار محیط کشت تعویض شد. به تدریج سلولهای مزانشیمی از بافت جوانه زده و در کف ظرف منتشر شدند. پس از این مرحله، سلولها با تریپسین-EDTA (Biowest؛ ایالات متحده) تریپسینه شده و از کف فلاسک جدا شدند. با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو (سیگما؛ ایالات متحده) و لام نئوبار شمارش سلولی صورت گرفت و بر حسب تعداد سلول به دو یا چند فلاسک جدید انتقال داده شد [26].

استخراج سلولهای سرتولی و تهیه محیط کشت شرایطی شده: در این قسمت از موشهای سوری نوزاد نژاد NMRI (۱۰ نمونه) با میانگین سنی ۲۰-۵ روزه استفاده شد. در کار با حیوانات موازین اخلاقی براساس پروتکل دانشگاه علوم پزشکی اردبیل رعایت شد. پس از بی هوش کردن موشها با روش قطع نخاع گردنی، بلافاصله بیضهها خارج و به درون الکل ۷۰ درجه برای ضد عفونی منتقل شد. پس از شست و شو با PBS جداسازی تونیکا آلبوژینه از هر یک از بیضهها صورت گرفت. سپس به طرف حاوی محیط کشت DMEM منتقل و با قیچی به قطعات کوچک تقسیم شد. قطعات تحت دو مرحله هضم آنزیمی قرار گرفتند. برای این منظور در مرحله اول به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار با آنزیمهای تریپسین (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، کلاژناز (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، هیالورونیداز (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و DNAase (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سپس با انجام سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ محلول رویی دور ریخته شد. محتویات کف فالكون که حاوی لوله های منی ساز بودند دوباره به مدت ۳۰ دقیقه با آنزیمهای نام برده شده در بالا تیمار شدند. هر چند دقیقه یکبار پپیناز با استفاده از پپیت پاستور انجام گرفت و نمونه به انکوباتور ۳۷°C برگردانده شد. پس از جداسازی سلولها، سانتریفیوژ با دور ۱۸۰۰ به مدت ۳ دقیقه انجام شد. این بار محلول رویی که حاوی تعلیق سلولی بود به فلاسک ۲۵ میلی متری جدید منتقل شد و محیط

آزمایشگاهی توانایی تمایز به سلولهای اسپرماتوگونی یا اسپرم را دارند. انتخاب نوع سلول بنیادی نقش مهمی در این فرآیند دارد تا سلولهایی که پتانسیل تکثیر و تمایز بهتری دارند برای پیوند و درمان ناباروری مردانه استفاده شوند. سلولهای بدن در تعامل با محیط اطراف خود اجازه رشد و تکثیر و نیز در صورت نیاز تمایز به بافت های مختلف را کسب می نمایند. کشت طولانی مدت در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن موجب می شود که سلولها به طور کامل به شرایط محیط کشت اطراف خود وابسته شوند. استفاده از سلولهای بنیادی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در پژوهش های سلولی و مولکولی به محققین کمک می کند تا اطلاعات و بینش خوبی از شرایط کشت، نحوه تکثیر و تمایز آنها در کشت طولانی مدت خارج بدن کسب نمایند. اینکه کدام گروه سلولی شرایط کشت بهتری داشته و در زمان کمتری به سلولهای مورد نظر تمایز می یابد چالشی است که باید در محیط آزمایشگاه رفع شود. سلولهای بنیادی مزانشیمی یک کاندید مناسب برای سلول درمانی و ترمیم بافتی محسوب می شوند. در این مطالعه پتانسیل تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان و سلولهای بنیادی ژله وارتون بند ناف، تحت القای محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول سرتولی و رتینوئیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و بیان مارکرهای ژنی اختصاصی سلولهای اسپرماتوگونی پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت مقایسه شد.

مواد و روشها

استخراج سلولهای بنیادی مغز استخوان موش: در مطالعه تجربی حاضر برای انجام کار روی حیوانات آزمایشگاهی موازین اخلاقی رعایت و روش کار براساس پروتکل دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شد. موشها در قفس های استاندارد نگهداری شدند. اتاق نگهداری دارای شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۳۷°C بود. برای استخراج سلولهای بنیادی مغز استخوان از موشهای صحرایی نژاد ویستار (۱۰ عدد؛ میانگین سن ۶-۴ هفته ای) استفاده شد.

موشها با کلروفورم بیهوش شدند. با احتیاط پوست پاها کاملاً جدا شد و بافت و ماهیچه های اطراف استخوانهای ران و درشتنی حذف شد. سپس استخوانها جدا گشته و با بافر نمکی فسفاتی (PBS) شسته شدند. در زیر هود یک سر استخوان ران و درشتنی با قیچی استریل قطع و بافت مغز استخوان با یک سرنگ حاوی محیط کشت DMEM (Biowest؛ ایالات متحده) که شامل ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS؛ Biowest؛ ایالات متحده) و ۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین (Biowest؛ ایالات متحده) بود به آرامی با روش فلاشینگ بیرون کشیده شدند. تعلیق سلولی حاصل درون لوله فالكون ریخته و سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور و به رسوب سلولی حاصل ۴ میلی لیتر محیط کشت تازه اضافه و به فلاسک ۲۵ میلی متری تخلیه شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از کشت، تعویض محیط کشت صورت گرفت. زمانی که سلولها تقریباً ۸۰٪ فلاسک را پر کردند به درون فلاسکهای جدید پاساژ داده شدند. برای این منظور پس از خروج محیط کشت داخل فلاسک و شست و شوی سلولها با PBS به هر فلاسک، ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین ۲۵٪ ۱X اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در داخل انکوباتور قرار گرفت. سپس سلولها با پپیت پاستور به آرامی از فلاسک خارج و به یک لوله فالكون استریل منتقل شدند. سلولها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۸۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خارج شده و به رسوب سلولی حاصل چند میلی لیتر محیط کشت اضافه شد تا

مرحله پاساژ سوم بودند استفاده شد. برای کنترل سلامت و زنده بودن سلول‌ها، از رنگ حیاتی تریپان بلو برای شمارش استفاده شد. پس از شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده، سلول‌ها به‌طور یکنواخت با غلظت 7×10^4 سلول در خانه‌های یک پلیت شش‌خانه توزیع شدند و در حضور DMEM و ۱۵٪ سرم جنین گاوی کشت شدند. ۴۸ ساعت پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، محیط کشت خارج و براساس گروه‌بندی ذکر شده در پایین محیط کشت‌های جدید اضافه شدند:

گروه اول: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گوساله (گروه کنترل)

گروه دوم: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور ۴۰٪ محیط کشت DMEM و ۵۰٪ محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی و ۱۰٪ سرم جنین گوساله به همراه غلظت 10^6 مولار رتینوئیک‌اسید

گروه سوم: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در حضور محیط کشت DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (گروه کنترل)

گروه چهارم: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در حضور ۴۰٪ محیط کشت DMEM و ۵۰٪ محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی و ۱۰٪ سرم جنین گوساله به همراه غلظت 10^6 مولار رتینوئیک‌اسید

هر سه روز یک‌بار محیط کشت سلول‌ها با محیط جدید تعویض و شمارش کلنی‌ها در هر گروه سلولی در روزهای ۵، ۸، ۱۱ و ۱۵ با استفاده از میکروسکوپ اینورت انجام شد.

تایید ماهیت سلول‌های سرتولی با روش ایمونوسیتوشیمی:

سلول‌های سرتولی حاوی فیلامنت‌های حدواسط ویمنتین هستند. در آنالیز ایمونوهیستوشیمی آنتی‌ژن‌های ویمنتین که در سیتوپلاسم سلول سرتولی وجود دارند، برای ارزیابی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای این منظور بعد از خارج کردن محیط کشت، سلول‌ها دوبار با PBS شسته شدند. سپس با پارافرمالدئید ۴٪ (سیگما؛ ایالات متحده) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 4°C ثابت شدند. سلول‌ها دوبار با PBS شسته و درون اسید هیدروکلریک یک‌نرمال به مدت نیم‌ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. شست‌وشو با بافر بورات صورت گرفت و سپس برای افزایش نفوذپذیری غشا سلول‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌ها محلول تریتون ۳٪ همراه با سرم بز و PBS به مدت یک‌ساعت استفاده شد. آنتی‌بادی اولیه ویمنتین با رقت ۱:۱۰۰ در PBS حل شد و روی لام‌ها قرار گرفت. روی لام‌ها با پارافیلیم پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت به حال خود رها شدند. روز بعد سلول‌ها با PBS سه‌بار هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. سپس آنتی‌بادی ثانویه (FITC-conjugated anti-mouse IgM) با رقت ۱:۵ به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها به مدت دو ساعت در این وضعیت قرار گرفتند. در تمام مواردی که آنتی‌بادی اولیه و ثانویه اضافه شد باید لام را داخل پلیتی که کف و در آن با کاغذ فویل پوشیده و شرایط تاریکی را برای سلول‌ها فراهم می‌کند، قرار داد. افزودن آنتی‌بادی‌ها بهتر است در اتاق تاریک انجام شود. پس از سه‌بار شستن با PBS هسته‌ها با ۴ و ۶ دی‌آمی‌دینو ۲- فنیل‌این‌دول (DAPI) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند.

بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از RT-PCR: در این مطالعه بیان مارکرهای پیش‌میوزی PLZF، OCT4 و میوزی SCP3 در گروه‌های سلولی بند ناف و مغز استخوان پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت با استفاده از روش

کشت تازه (H-DMEM) حاوی ۲۰٪ سرم جنین گوساله، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین به آن اضافه و در انکوباتور با دمای 37°C و ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت سلول‌های سرتولی به کف فلاسک چسبیدند. در مقابل سلول‌های زایا به ته فلاسک نچسبیده و به‌آسانی با شست‌وشوهای مکرر از کف فلاسک جدا شدند. فلاسک حاوی سلول‌های سرتولی دوبار با PBS شسته و محیط کشت تازه به آنها اضافه شد. هر سه روز یک‌بار تا دو هفته محیط کشت جداسازی و فیلتر شد و به‌عنوان محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی در فریزر نگهداری شد تا برای کشت سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گیرد^[25].

تهیه رتینوئیک‌اسید (RA) با غلظت 10^{-6} مولار: زیر هود، بدون روشن کردن لامپ و فن هود ۶ میلی‌گرم پودر رتینوئیک‌اسید در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل و در دمای 20°C نگهداری شد. باقی‌مانده پودر در فریزر 80°C قرار داده شد^[27].

محاسبه زمان دوبرابرشدن جمعیت سلولی: در طول دوره کشت زمان لازم برای دوبرابرشدن جمعیت سلولی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و بند ناف به‌طور جداگانه محاسبه شد. در این مطالعه سلول‌های پاساژ دوم تا پنجم مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ تا ۸۰٪ به کمک تریپسین ۰/۲۵٪ به همراه EDTA (مرک؛ آلمان) ۰/۲٪ سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. برای اینکه مقایسه دو گروه سلول در شرایط یکسان انجام شود، در هر پاساژ سلولی زمانی که یکی از کشت‌ها به مرحله تراکم می‌رسید (در مطالعه حاضر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان زودتر به این مرحله می‌رسیدند) به کشت دیگر نیز با انجام پاساژ خاتمه داده می‌شد.

پس از شمارش سلولی توسط لام نئوبار، برای رسم منحنی رشد تعداد 10^3 سلول پاساژهای دو تا پنج در ظروف ۹۶ چاهکی به مدت ۱۵ روز در محیط DMEM به همراه ۱۰٪ FBS کشت داده شده و طی این مدت محیط کشت سلولی هر سه روز یک‌بار تعویض شد. سپس هر روز سلول‌های مربوط به تعداد ثابتی از چاهک‌ها جدا و پس از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو توسط لام نئوبار شمارش شدند. این کار به‌طور مدام تا پانزده روز برای هر یک از پاساژهایی دو تا پنج به‌صورت تکرار سه‌تایی از بافت‌های مغز استخوان و بند ناف‌های مختلف صورت گرفت. در نهایت منحنی رشد سلولی ترسیم شد. به‌منظور سنجش دوبرابرشدگی جمعیت سلولی که نشان‌دهنده تعداد دفعات دوبرابرشدن یک سلول در یک دوره کشت است، از داده‌های یک دوره کشت محدود و دانستن تعداد اولیه و تعداد سلول‌ها در انتهای دوره استفاده شد.

برای مقایسه سرعت رشد سلول‌های حاصل از دو نوع کشت، زمان دوبرابرشدن جمعیت سلول‌ها طی پاساژهای مختلف از رابطه زیر محاسبه شد:

$$PDT = \frac{CT}{\log \frac{N}{NO}} \times 3.31$$

در این رابطه PDT زمان دوبرابرشدن جمعیت سلولی، NO تعداد سلول‌ها در شروع کشت N، تعداد سلول‌ها در پایان کشت، CT مدت زمان دوره کشت است. به‌منظور تعیین مدت‌زمان مورد نیاز برای دوبرابرشدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی این سلول‌ها به مدت ۱۵ روز طی پاساژهای مختلف بررسی شدند.

گروه‌های کشت: در این مطالعه برای کشت و تمایز، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی بند ناف که در

جدول ۲) پرايمرهای استفاده شده در سلول های بنيادی مزانشيمي مغز استخوان پرايمر PCR

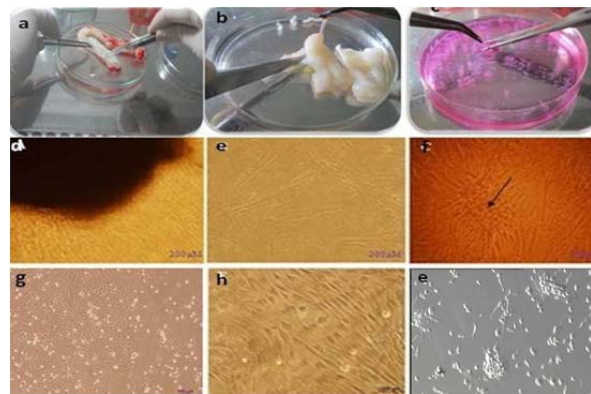
نام پرايمر	توالی پرايمر	طول محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال (°C)
OCT4 رفت برگشت	GAACTAGCATTGAACCGT CATACTCGAACCCACATCCTTC	۶۲۰	۶۰
PLZF رفت برگشت	CCCGTTGGGGGTGAGCTAGAA CTGCAAGGTGGGGCGGTGTAG	۴۶۰	۶۱
SCP3 رفت برگشت	AGCCAGTAACCAGAAAATTGAGC CCACTGCTGCAACACATTTCATA	۵۷۰	۶۰
GAPDH رفت برگشت	AAACCCATCACCATCTTCCA GTGGTTCACACCATCACAA	۱۹۸	۶۰

یافته ها

نتایج کشت سلول های مزانشيمي بند ناف

مراحل آماده سازی بافت ژله وارتنون بند ناف برای کشت در شکل ۱ بخش a تا c نشان داده شده است.

۷-۱۴ روز بعد از کشت قطعات بافتی ژله وارتنون بندناف انسان در محیط کشت، سلول های استرومائی شروع به جوانه زدن از قطعه بافتی کردند (شکل ۱-d). بررسی سلول ها زیر میکروسکوپ اینورت نشان داد سلول هایی شبیه سلول های فیبروبلاستی با زواندی کشیده و خاصیت چسبندگی زیاد که به کف فلاسک چسبیدند قابل مشاهده بودند. این سلول ها پس از گذشت دو هفته به تراکم ۸۰٪ در کف فلاسک رسیدند (شکل ۱-e). سپس پاساژ داده شده و در چند فلاسک دیگر تقسیم شدند. در این زمان شاهد ظهور کلنی های سلولی زیادی در فلاسک های کشتی بودیم که تعداد آنها با گذشت زمان افزایش یافت (شکل ۱-f).



شکل ۱) نتایج کشت سلول های بنيادی ژله وارتنون بند ناف و سلول های بنيادی مغز استخوان: (A-C) مراحل آماده سازی بافت ژله وارتنون بند ناف برای کشت (d) جوانه زنی سلول های بنيادی بند ناف بعد از گذشت ۷-۱۴ روز (درشت نمایی ۲۰۰ میکرومتر). (e) جدا کردن سلول ها و کشت جداگانه آنها، رشد سلول ها بعد از گذشت ۷ روز (درشت نمایی ۲۰۰ میکرومتر). (f) ظهور کلنی های سلول بنيادی بند ناف بعد از گذشت ۲ هفته (درشت نمایی ۲۰۰ میکرومتر). (g) سلول های مزانشيمي مغز استخوان بعد از گذشت دو روز از کشت، سلول های بنيادی مغز استخوان به کف فلاسک چسبیده اند (درشت نمایی ۱۰۰ میکرومتر). (h) روز پنجم کشت، سلول های چسبیده کم کم به شکل دوکی در می آیند (درشت نمایی ۲۰۰ میکرومتر). (i) کلنی های سلول بنيادی مغز استخوان (درشت نمایی ۲۰۰ میکرومتر)

نتایج کشت سلول های بنيادی مغز استخوان: در کشت اوليه، سلول های استخراج شده از مغز استخوان به اشکال مختلف سلولی

واکنش زنجيره ای پلي مراز معکوس (RT-PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور RNA کل از سلول های کشت شده با استفاده از معرف تریزول (Gibco, 15596-026; ایالات متحده) استخراج شد. برای غلظت سنجی RNA از محلول RNA استخراج شده، رقت ۳٪ تهیه شد تا در دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر تعیین کمیت RNA صورت گیرد. نسبت جذب دانسیته نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ (۲۶۰/۲۸۰) به عنوان شاخص کیفیت RNA محاسبه شد. اگر این شاخص بزرگ تر از دو باشد نشانه آلودگی با DNA و کمتر از ۱/۸ باشد نشانه آلودگی محلول RNA تام با پروتئین ها و سوبستراهای آروماتیک است. نمونه های RNA استخراج شده روی ژل آگارز بارگذاری شدند تا از درستی عملیات استخراج اطمینان حاصل شود. به منظور حذف احتمالی DNA در RNA استخراج شده که می تواند در روند تکثیر ایجاد اشتباه کند، یک مرحله حذف آنزیمی DNA استفاده شد.

۵ میکروگرم از این RNA با آنزیم DNaseI تیمار و سپس با استفاده از آنزیم کپی برداری معکوس، دئوکسی نوکلئوتیدتری فسفات ها (dNTPs) و آغازگر مطابق با دستورالعمل کیت (فرمنتاز؛ ایران) به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل با روش PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR برای هر کدام از ژن ها سه بار و طی ۳۰ چرخه انجام شد. چرخه های واکنش شامل دمای باز شدن رشته های DNA ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه، دمای مربوط به اتصال ۵۵-۵۸°C برای ۴۵ ثانیه و دمای طولی شدن رشته ها ۷۲°C برای ۴۵ ثانیه بود. محصولات RT-PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل ۱/۲٪ آگارز آنالیز شده و با اتیدیوم بروماید (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) رنگ آمیزی شد و در زیر مانیتور UV مدل GAS9000 عکس برداری شد (Uvidoc؛ انگلستان). توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع و نیز برای ژن های هدف در جدول های ۱ و ۲ ذکر شده است.

روش های تحلیل آماری: در نهایت تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 22 آنالیز شدند و پس از ادغام داده ها در هر گروه میانگین و خطای استاندارد میانگین (SEM) برای هر گروه محاسبه شد. تست شاپیرو-ویلک به منظور تعیین نرمال بودن توزیع داده ها استفاده شد. با توجه به پارامتریک بودن داده ها تست آنالیز واریانس یک طرفه برای تحلیل واریانس های درون گروهی و میان گروهی استفاده شد. تست Games Howell به عنوان تست متعاقب آنالیز واریانس انجام شد. تست تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر برای آنالیز داده ها در بازه های زمانی در هر گروه مورد استفاده قرار گرفت.

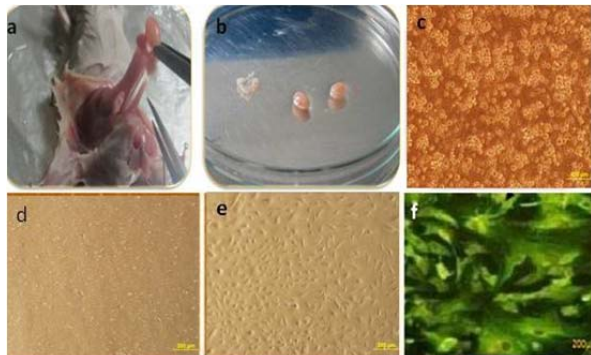
جدول ۱) پرايمرهای استفاده شده در سلول های بنيادی ژله وارتنون بند ناف

نام پرايمر	توالی پرايمر	طول محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال (°C)
OCT4 رفت برگشت	GTTCTTCATCTACTAAGGAAGG CAAGAGCATCATTGAACCTTCAC	۱۰۰	۵۱
PLZF رفت برگشت	GGTCGAGTTCCTGATAACG CCTGTATGTGAGCGCAGGT	۳۹۶	۵۳
SCP3 رفت برگشت	CTAGAATTGTTTCAGAGCCAGAG GTTCAAGTCTTTCTTCAAAG	۲۴۷	۶۰
GAPDH رفت برگشت	TTAGCACCCCTGGCCAAGG CTTACTTGGAGGCCATG	۵۴۱	۷۵

نتایج مربوط به شمارش سلول‌های بنیادی مغز استخوان طی پاساژهای P2 تا P5 نشان داد زمان دوبرابرشدن تعداد سلول‌ها در طی پاساژهای P2 تا P4 به ترتیب بین محدوده $27/8 \pm 0/3$ ، $28/3 \pm 0/1$ و $28/9 \pm 0/1$ بود. از نظر آماری اختلاف بین پاساژ پنجم و پاساژهای قبلی در این گروه معنی‌دار بود ($p < 0/05$).

بنابراین طی پاساژ ۵ زمان بیشتری برای رشد سلول‌ها نیاز بود. به‌طور کلی در مطالعه حاضر میانگین زمان دوبرابرشدن تعداد سلول‌ها برای سلول‌های بنیادی بندناف ۵۹.۸۷ و برای سلول‌های بنیادی مغز استخوان ۳۱.۵۵ به دست آمد. بنابراین زمان دوبرابرشدن سلول‌های بنیادی مغز استخوان نسبت به سلول‌های بنیادی بند ناف کمتر بود.

مقایسه سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و بند ناف طی پاساژهای مختلف نشان داد در همه پاساژها بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد ($p < 0/05$). به عبارتی پتانسیل تکثیر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به‌مراتب از سلول‌های مزانشیمی بند ناف بیشتر است (جدول ۳).



شکل ۲ (a و b) آماده‌سازی و کشت سلول‌های سرتولی، (c) سوسپانسیون سلول‌های بیضه‌ای حاصل از مرحله دوم هضم آنزیمی لوله‌های منی‌ساز، (d) روز اول کشت، سلول‌های سرتولی به شکل گرد به کف فلاسک چسبیده‌اند (درشت‌نمایی ۲۰۰ میکرومتر)، (e) روز هفتم سلول‌های سرتولی به شکل دوکی در آمدند (درشت‌نمایی ۲۰۰ میکرومتر)، (f) واکنش ایمنونوسیتوشیمی برای فیلامنت‌های حدواسط ویمنتین درون سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی مثبت بود (درشت‌نمایی ۲۰۰ میکرومتر)

جدول ۳ زمان دوبرابرشدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و بند ناف طی پاساژهای P2 تا P6

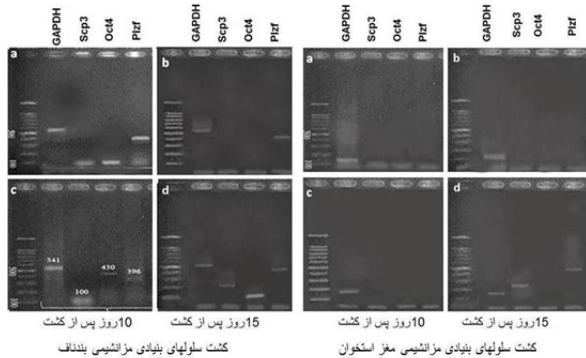
تعداد پاساژ	زمان دوبرابرشدن سلول‌های مزانشیمی بندناف (ساعت)	زمان دوبرابرشدن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (ساعت)
P2	$55/03 \pm 0/12$	$27/8 \pm 0/3$
P3	$57/02 \pm 0/3$	$28/3 \pm 0/3$
P4	$59/7 \pm 0/2$	$28/9 \pm 0/1$
P5	$67/3 \pm 0/3$	$41/2 \pm 0/5$

نتایج نشان داد سلول‌های مزانشیمی بند ناف تحت القا غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید و محیط شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی در روز پنجم تیمار و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در روز دوم تیمار شروع به تشکیل کلنی در محیط کشت نمودند. پس از آن هر سه روز یکبار تعداد کلنی‌ها شمارش شده و مورد آنالیز آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش روزهای کشت تعداد کلنی‌ها نیز افزایش می‌یابد. تعداد کلنی‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نسبت به سلول‌های مزانشیمی بند ناف در تمام روزها بیشتر بود که این اختلاف از

مشاهده شدند که به تدریج در پاساژهای بعدی، فنوتیپ سلولی یک‌دست به دست آمد. اکثریت سلول‌ها به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن به همراه لخته‌های خونی کوچک مشاهده شدند. دو تا ۳ روز پس از کشت اولیه این سلول‌ها، ۷۰ تا ۸۰٪ کف ظرف کشت را پر کرده و به تراکم رسیدند. این سلول‌ها به ظرف کشت چسبیده، به‌سرعت تکثیر شدند. در این زمان به سه شکل در محیط کشت قابل رویت بودند. تعدادی از سلول‌ها که در حال تکثیر بودند ظاهری کروی و کوچک داشتند در روز دوم بعد از شست‌وشو، که لخته‌های خونی و سلول‌های آزاد حذف شدند این سلول‌های گرد که به کف فلاسک چسبیده بودند قابل مشاهده بودند (شکل ۱-g). دسته دوم سلول‌ها تعدادشان کم بود و به‌صورت سلول‌های پهن که از نظر اندازه بزرگ‌تر از سایر سلول‌ها بودند در محیط کشت مشاهده شدند. دسته سوم سلول‌ها که شامل اکثریت سلول‌های کشتی بود به شکل دوکی و شبه‌فیبروبلاستی قابل رویت بودند. در روز پنجم کشت، این سلول‌های دوکی‌شکل کوچک به‌صورت منفرد و چسبیده به کف فلاسک مشاهده شدند در این زمان سلول‌های همانوپویتیکی خونی باقی‌مانده به‌صورت سلول‌های گرد، شفاف و شناور قابل مشاهده بودند (شکل ۱-d). در پاساژهای بعدی با هر بار تعویض محیط کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌صورت خالص در آمده و از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر شبیه سلول‌های فیبروبلاست (دوکی‌شکل) بودند. تشکیل کلنی در پاساژهای دوم به بعد مشاهده شد (شکل ۱-i). در پاساژهای بالاتر، از سرعت تکثیر سلولی کاسته شد و مورفولوژی آنها به سلول‌های پهن‌تر تغییر شکل یافت. ارزیابی میزان حیات سلولی نشان داد، بیش از ۹۵٪ سلول‌ها در پاساژهای مختلف زنده بودند (شکل ۱).

نتایج حاصل از آماده‌سازی محیط کشت شرایطی شده سلول‌های سرتولی: آماده‌سازی و کشت سلول‌های سرتولی در شکل ۲ قسمت a و b نشان داده شده‌اند. سلول‌های سرتولی استخراج‌شده پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، شروع به چسبیدن به کف فلاسک کردند (شکل ۲-d). سلول‌های چسبیده از لحاظ مورفولوژیکی شبیه سلول‌های فیبروبلاستی و دوکی‌شکل بودند و طی ۵ تا ۷ روز به میزان زیادی تکثیر یافتند (شکل ۲-e). هر ۴-۳ روز یکبار محیط کشت تعویض شد. محیط کشت شرایطی شده جمع‌آوری و فیلتر شد. این کار به‌مدت دو هفته ادامه یافت. با استفاده از روش ایمنونوسیتوشیمی حضور ویمنتین به‌عنوان فیلامنت‌های حدواسط درون سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی اثبات شد (شکل ۲-f).

تعیین زمان دوبرابرشدن جمعیت سلول‌ها در طی مراحل کشت: در کشت اولیه هر دو گروه، کلاسترهای کوچکی از سلول‌های فیبروبلاستی ظاهر شد که با گذشت زمان و طی تعویض کشت‌های مختلف جمعیت خالص‌تری از سلول‌های بنیادی به دست آمد که کلونی‌های بزرگ‌تری شکل دادند. در کشت اولیه، پس از پاساژ اول سلول‌های بنیادی مغز استخوان طی ۳ روز کف فلاسک را پر کردند در حالی که این زمان برای سلول‌های بنیادی بند ناف ۴ روز بود. در مورد سلول‌های مزانشیمی بند ناف زمان دوبرابرشدن تعداد سلول‌ها در طی پاساژهای P2 تا P4 به ترتیب بین محدوده $55/03 \pm 0/12$ ، $57/02 \pm 0/3$ و $59/7 \pm 0/2$ بود که این میزان برای سلول‌های پاساژ P5 به $67/3 \pm 0/3$ افزایش یافت. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین زمان دوبرابرشدن تعداد سلول‌ها طی پاساژ پنجم و پاساژهای قبلی در این گروه وجود داشت ($p < 0/05$). در واقع طی پاساژهای P2 تا P4 زمان کمتری برای رشد سلول‌ها نیاز است.



شکل ۳ مقایسه بیان ژن‌های تمایزی پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و مغز استخوان در گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار با غلظت ۱۰^{-۶} مولار رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی؛ a و b کشت در شرایط کنترل c و d کشت در شرایط تیمار را نشان می‌دهد.

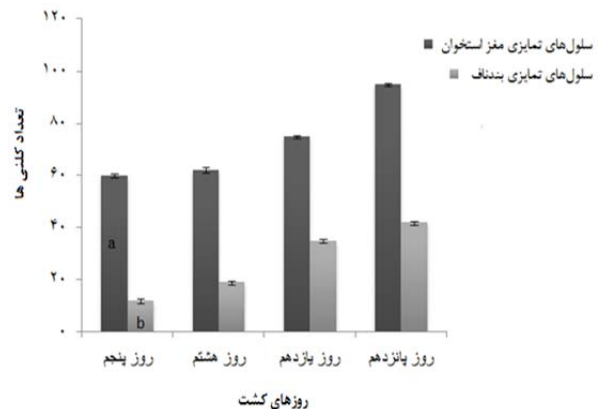
بحث

در افراد مبتلا به سرطان که به علت شیمی‌درمانی و رادیوتراپی توانایی تولید اسپرم ندارند یا افرادی که مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی هستند، تولید سلول‌های ژرمینال از سلول بنیادی در محیط آزمایشگاهی می‌تواند نویددهنده درمان باشد [28]. یافتن سلول‌های بنیادی که دارای ویژگی‌های پرتوان بوده و از یک بافت یا اندام بالغ به دست آمده باشند می‌تواند جایگزین مناسبی برای سلول‌های مذکور در تولید گامت‌های درون آزمایشگاهی باشد [29]. در این مطالعه ابتدا منحنی رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و مغز استخوان طی پاساژهای P2 تا P5 رسم و سپس زمان دوبرابردن تعداد سلول‌ها در هر دو گروه محاسبه شد. در مطالعه حاضر میانگین زمان دوبرابردن تعداد سلول‌ها برای سلول‌های بنیادی بند ناف ۵۹/۸۷ و برای سلول‌های بنیادی مغز استخوان ۳۱/۵۵ به دست آمد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سرعت تکثیر سلول‌های مزانشیمی در پاساژهای متعدد با یکدیگر اختلاف داشته و سرعت و توان تکثیر سلولی در پاساژهای پایین‌تر، بیشتر است. گزارش‌های اندکی در مورد زمان دوبرابردن سلولی وجود دارد که در این مورد در مطالعه‌ای میانگین زمان دوبرابردن سلول‌های مزانشیمی خون بند ناف انسان ۲۶ ساعت گزارش شده است [14]. حسین‌زاده و همکاران میانگین زمان دو برابر شدن تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان را ۵۹/۶ گزارش کردند [30] که با مطالعه حاضر همسو بود. براساس نتایج مطالعه باغبان/اسلامی‌نژاد و همکاران پس از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، این سلول‌ها به‌طور متوسط هر ۱۹±۲ ساعت دوبرابر می‌شدند [31]، در حالی که در مطالعه حاضر این میانگین ۳۱/۵۵ ساعت به دست آمد.

ارزیابی حیات و شمارش سلولی به روش هموسایتومتر نشان داد که ۹۵٪ سلول‌ها زنده بودند.

در مطالعه حاضر به مقایسه تعداد کلنی‌های تشکیل‌یافته از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی بند ناف، پس از گذشت ۵، ۸، ۱۱ و ۱۵ روز از کشت در گروه‌های کنترل و تیمار با غلظت ۱۰^{-۶} مولار رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده سلول‌های سرتولی پرداخته شد. در مطالعه حاضر کشت سلول‌ها در گروه‌های مورد بررسی بعد از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز مورد مطالعه قرار



نمودار ۱ مقایسه کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی بند ناف و مغز استخوان تحت القا غلظت M 6-10 رتینوئیک‌اسید و کاندیشن مدیوم سلول‌های سرتولی در روزهای مختلف کشت؛ a در هر گروه مربوط به سلول بنیادی مغز استخوان است که اختلاف معنی‌داری با b یعنی سلول‌های بنیادی بند ناف در هر گروه دارد.

نتایج حاصل از بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایا در گروه‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از بیان مارکرهای پیش‌میوزی *PLZF*، *OCT4* و میوزی *SCP3* نشان داد که در گروه کنترل سلول‌های بنیادی مغز استخوان، هیچ کدام از ژن‌های تمایزی بیان نشدند در حالی که در سلول‌های بنیادی مغز استخوان تیمار شده با رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی در دو دوره زمانی ۱۰ و ۱۵ روز پس از کشت نتایج نشان داد که ژن *OCT4* پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت در هیچ‌کدام از گروه‌ها بیان نشد. بیان ژن *PLZF* پس از گذشت ۱۵ روز از کشت مشاهده شد. این ژن در روز ۱۰ کشت بیان نشد. ژن *SCP3* نیز پس از گذشت ۱۵ روز از کشت بیان و بیان آن پس از گذشت ۱۰ روز از کشت مشاهده نشد.

در مورد سلول‌های بنیادی بند ناف نیز، بیان مارکرهای پیش‌میوزی *PLZF*، *OCT4* و میوزی *SCP3* پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ژن *OCT4* در گروه کنترل سلول‌های بنیادی بندناف، فقط پس از گذشت ۱۰ روز از کشت مشاهده شد و بیان آن پس از گذشت ۱۵ روز از کشت قابل مشاهده نیست. اما در گروه کنترل بیان مارکر پیش‌میوزی *PLZF* پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت مشاهده شد. ژن میوزی *SCP3* در گروه کنترل سلول‌های بنیادی بند ناف پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت بیان نشد.

در مورد سلول‌های بنیادی تیمار شده با رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی در دو دوره زمانی ۱۰ و ۱۵ روز پس از کشت نتایج نشان داد که بیان ژن‌های پیش‌میوزی *PLZF*، *OCT4* و ژن میوزی *SCP3* پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت در گروه سلول‌های بنیادی بند ناف مشاهده شد. اما در گروه سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیان ژن‌های *PLZF* و *SCP3* فقط در روز ۱۵ کشت مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی بند ناف در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان، تحت تاثیر رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی بیشتر است (شکل ۳).

بیشتر است. در گروه کنترل سلول‌های بنیادی مغز استخوان هیچ‌کدام از ژن‌های تمایزی بیان نشدند در حالی که در گروه کنترل سلول‌های بنیادی بند ناف، بیان ژن‌های پیش‌میوزی *PLZF* و *OCT4* پس از گذشت ۱۰ روز از کشت مشاهده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که حتی بدون حضور ماده القاکننده، توان تمایزی در سلول‌های بنیادی بند ناف بیشتر از سلول‌های بنیادی مغز استخوان است. گزارش‌های مختلفی نیز در مورد پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به سلول‌های زیای بدوی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید وجود دارد. نیرنیا و همکاران سلول‌های بنیادی جنینی که با *Stra8* ترانسفکت شده بودند را تحت تیمار رتینوئیک‌اسید قرار دادند و آنها را به سلول‌هایی که برای *Prm1* (مارکر پس‌میوزی) مثبت بودند، تمایز دادند. سپس این سلول‌ها را به سلول تخم به‌صورت داخل سیتوپلاسمی تزریق و آنها را به مادران گیرنده منتقل کردند و توانستند نوزادانی سالم تولید کنند [25]. کاکچی و همکاران [32] سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی را به بیضه موش عقیم شده با بوسولفان پیوند زدند. بررسی‌های هیستولوژی آنها نشان داد که این سلول‌ها بعد از پیوند به بیضه تا مراحل تشکیل اسپرماتوزوآ پیش می‌روند. لقاح این موش‌ها با موش ماده باعث تولد نوزاد شد. منصفی و همکاران سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان را از موش صحرایی استخراج کردند و برای اینکه سلول‌ها کنفورماسیون یکنواختی پیدا کنند، بدون عامل القاگر، سلول‌ها را به مدت دو هفته کشت دادند، سپس این سلول‌ها را به بافت بیضه موش عقیم شده (با بوسولفان) تزریق کرده و با بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی نشان دادند که این سلول‌ها تا مرحله تشکیل اسپرماتوزوآ نیز پیش می‌روند [27]. مطالعه حاضر نیز از جهت تمایز سلول‌های بنیادی و بیان مارکرهای پیش‌میوزی و میوزی با این تحقیقات مطابقت دارد.

در مطالعات دیگر تاثیر محیط کشت شرایطی شده و رتینوئیک‌اسید به‌تنهایی روی تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفته بود. نتایج نشان داد پس از گذشت یک هفته از کشت تعداد کلونی‌ها در گروه محیط کشت شرایطی شده افزایش یافت. اما در گروه رتینوئیک‌اسید به‌تنهایی ابتدا تعداد کلنی‌ها افزایش یافت اما از روز هشتم به بعد دچار کاهش شد. به‌طوری که پس از گذشت ۱۵ روز از کشت کمترین تعداد کلنی‌ها در گروه رتینوئیک‌اسید و بیشترین تعداد کلنی‌ها در گروه محیط کشت شرایطی شده مشاهده شد. نتایج بررسی تعداد سلول‌های آپوپتوز شده در دو گروه هم نشان داد تعداد هسته‌های فراگمنته سبز و قرمز در گروه رتینوئیک‌اسید به‌تنهایی بیشتر از گروه دیگر بود. در گروهی که تحت تاثیر محیط کشت شرایطی شده به‌تنهایی قرار گرفته بودند تعداد سلول‌های زنده بیشتر از گروه‌های دیگر بود [33].

طبق مطالعات صورت‌گرفته که به‌عنوان گروه اول تحقیقات مطرح هستند نشان داده شده که با پیوند MSCs (بدون تمایز با القاگر خاص در شرایط درون آزمایشگاهی) یا با MSCs‌های تمایز یافته به سلول‌های زایا (با القاگر مناسب در شرایط درون آزمایشگاهی) به مدل‌های حیوانی عقیم‌شده، MSCs‌ها مراحل تمایزی خود را پیش برده و موجب تولید اسپرم و در نهایت تولد نوزاد شدند [25].

اما در نتایج گروه دوم تحقیقات، اگر چه MSCs‌ها در شرایط درون آزمایشگاهی به سلول‌های زیای بدوی تمایز می‌یابند اما در نهایت این سلول‌ها نمی‌توانند به اسپرماتوسیت و اسپرماتید تبدیل شوند و حتی بعد از پیوند به مدل‌های حیوانی عقیم‌شده نیز، تمایز به اسپرماتوسیت یا اسپرم مشاهده نمی‌شود. در این مورد، ليو و

گرفت. همان‌طور که می‌دانیم فرآیند اسپرماتوزون در انسان ۶۴ روز طول می‌کشد. نصف این زمان برای تولید اسپرماتوسیت‌های اولیه، ثانویه و نهایتاً اسپرماتید صرف می‌شود. نصف دیگر آن صرف اسپرمیوزون و تولید اسپرم‌های کارا می‌شود. در شرایط کشت با توجه به اینکه ترکیبات استفاده‌شده در محیط کشت بیشتر نیازهای تغذیه‌ای سلول‌ها را تامین کرده و نیز رتینوئیک‌اسید و محیط شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی تاثیر مستقیم‌تری بر سلول‌های کشتی دارند، این زمان کاهش می‌یابد به‌طوری که در مطالعات محققین دیگر نیز، طراحی شرایط کشت برای تمایز سلول‌های بنیادی در فاصله ۲ تا سه هفته‌ای انجام شده است. مطالعات نیرنیا و همکاران [25] و نیز مطالعه هو و همکاران [5] به‌منظور تولید سلول‌های شبه‌زایا از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و نیز مطالعه کاکچی و همکاران [32] در تولید سلول‌های زایا از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موید این ادعا است. مطالعه حاضر نشان داد که تعداد کلنی‌های تشکیل شده در سلول‌های بنیادی مغز استخوان در تمام روزها بیشتر از تعداد کلنی‌های تشکیل شده در سلول‌های بنیادی بند ناف است. طبق مطالعات قبلی غلظت 10^{-1} مولار رتینوئیک‌اسید در سلول بنیادی مغز استخوان پس از گذشت سه روز از کشت تاثیری در آپوپتوز سلول‌ها ندارد [25]. در مطالعه‌ای دیگر اثرات غلظت 10^{-1} مولار رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده طی روزهای مختلف تا روز پانزدهم، هر کدام به‌صورت جداگانه روی کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در گروهی که فقط با رتینوئیک‌اسید تیمار شده بود تعداد کلنی‌های فیبرولاستیک تا روز هشتم کشت افزایش یافت و سپس بعد از آن دچار کاهش شد. از طرفی در گروهی که فقط با سلول سرتولی تیمار شده بودند این تعداد کلنی تا روز پانزدهم رشد صعودی داشتند [33]. از آنجایی که در این مطالعه، تعداد کلنی‌ها در سلول‌های بنیادی بند ناف و مغز استخوان تیمار شده با رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده، به تدریج افزایش می‌یابد، پس می‌توان اظهار داشت که این افزایش تعداد کلنی در این سلول‌ها به‌دلیل حضور محیط کشت شرایطی شده سلول‌های سرتولی باشد.

در این مطالعه با وجودی که تعداد کلنی‌ها در هر دو گروه سلول بنیادی بند ناف و مغز استخوان افزایش یافت اما این افزایش در سلول‌های بنیادی مغز استخوان به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که توان تکثیری سلول‌های بنیادی مغز استخوان نسبت به سلول‌های بنیادی بند ناف بیشتر است. این نتیجه با نتایج محققین قبلی که نشان دادند پتانسیل تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان کمتر از سلول‌های بنیادی ژله وارتن بند ناف است، مغایرت دارد [34].

این دو گروه سلولی از نظر تمایز به سلول‌های شبه‌زایا نیز بررسی شدند و نتایج نشان داد که بیان مارکرهای پیش‌میوزی *PLZF*، *OCT4* و میوزی *SCP3* در سلول‌های بنیادی بند ناف تیمار شده با رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده در هر دو دوره زمانی ۱۰ و ۱۵ روزه از کشت مشاهده شد در حالی که ژن‌های *PLZF* و *SCP3* در سلول‌های بنیادی مغز استخوان فقط پس از گذشت ۱۵ روز از کشت بیان شد. این ژن‌ها در روز ۱۰ کشت بیان نشدند، طبق مطالعات گذشته *SCP3* طی فرآیند میوز در اسپرماتوسیت‌ها از شروع مرحله لپتوتن تا مرحله پاکتی‌تن بیان می‌شود [26].

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی بند ناف در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان، تحت تاثیر رتینوئیک‌اسید و محیط کشت شرایطی شده

استخوان بیشتر از سلولهای بنیادی بندناف است. این تفاوت احتمالاً به دلیل فاکتورهای ترشح شده از این سلولها است.

تشکر و قدردانی: مقاله حاضر پژوهشی حاصل از دو پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد است. از مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی که در فراهم کردن شرایط لازم برای انجام این کار ما را حمایت کردند، تشکر و قدردانی می شود.

تاییدیه اخلاقی: موضوع پژوهشی "مقایسه پتانسیل تمایز و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و ژله وارتنون بند ناف در تولید سلولهای شبه زایا" که توسط دانشجوی ارشد خانم مریم سالم و به راهنمایی خانم دکتر طوبی میرزاپور صورت گرفت در جلسه پژوهشی دانشکده به شماره ۵۲۸/۱۳/د/۹۳ و تاریخ ۲۶/۷/۹۳ مورد تایید کمیته اخلاق پژوهشی قرار گرفته و مجوز انجام پژوهش را دریافت کرده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مریم سالم (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ طوبی میرزاپور (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ ابوالفضل بابرامی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ رقیه قائم مقامی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: منابع مالی خاصی برای مقاله مورد نظر وجود نداشت و بیشتر با همکاری مولفین انجام شد.

منابع

- 1- Yang Y, Feng Y, Feng X, Liao Sh, Wang X, Gan H, et al. BMP4 cooperates with retinoic acid to induce the expression of differentiation markers in cultured mouse spermatogonia. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9536192.
- 2- Juma AR, Grommen SVH, O'Bryan MK, O'Connor AE, Merriner DJ, Hall NE, et al. PLAG1 deficiency impairs spermatogenesis and sperm motility in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):5317.
- 3- Hua J, Pan S, Yang C, Dong W, Dou Z, Sidhu KS. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(1):99-105.
- 4- Asgari HR, Akbari M, Yazdekhasti H, Rajabi Z, Navid S, Aliakbari F, et al. Comparison of human amniotic, chorionic, and umbilical cord multipotent mesenchymal stem cells regarding their capacity for differentiation toward female germ cells. *Cell Reprogr.* 2017;19(1):44-53.
- 5- 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;20(1):9.
- 6- Fazili A, Gholami S, Zangi BM, Seyedjafari E, Gholami M. In vivo differentiation of mesenchymal stem cells into insulin producing cells on electrospun Poly-L-Lactide acid scaffolds coated with Matricaria chamomilla L. *Oil. Cell J.* 2016;18(3):310-21.
- 7- Fang J, Wei Y, Lv Ch, Peng Sh, Zhao Sh, Hua J. CD61 promotes the differentiation of canine ADMSCs into PGC-like cells through modulation of TGF- β signaling. *Sci Rep.* 2017;7:43851.
- 8- Cheng T, Zhai K, Chang Y, Yao G, He J, Wang F, et al. CHIR99021 combined with retinoic acid promotes the

همکاران [35] با استخراج سلولهای مغز استخوان که با GFP ترانسفکت شده بودند و شامل سلولهای بنیادی همانوپویتیک، سلولهای بنیادی اندوتلیال، سلولهای بنیادی مزانشیمی و پیوند مستقیم سلولهای استخراج شده به بیضه موش عقیم شده (با بوسولفان) بودند، نشان دادند که این سلولها به سلولهای سرتولی، اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه تمایز می یابند اما در نهایت قادر نیستند به اسپرماتید تمایز یابند.

هوانگ و همکاران گزارش کردند که تحت شرایط مناسب، سلولهای بنیادی جنینی و سلولهای بنیادی مغز استخوان و حتی سلولهای مشتق از پوست جنین خوک و تراوشات خارجی الوزالمعه موش می توانند به دودمان سلول زایا تمایز یابند. علاوه بر این، سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتنون بندناف انسان و سلولهای بنیادی بالغ در شرایط آزمایشگاه می توانند به سلول زایا تمایز یابند. بیان ژنهای خاص سلول زایا *Stella*، *Oct4*، *C-kit*، *Cdf49* و *Vasa* در تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتنون بند ناف انسان تاکیدکننده این است که این سلولها می تواند به سلول زایا در شرایط آزمایشگاهی تمایز یابند [36]. همچنین نیرنیا و همکاران با استخراج سلولهای مزانشیمی مغز استخوان ترانسفکت شده با *Stra8-EGF* و تمایز آنها تحت تاثیر رتینوئیک اسید نشان دادند که این سلولها در شرایط آزمایشگاهی فقط مارکرهای پیش میوزی و میوزی را بیان می کنند و قادر به بیان مارکرهای پس میوزی نیستند. همچنین پیوند این سلولها به موش عقیم شده (با بوسولفان) نشان داد که این سلولها درون بافت بیضه قادر به بیان مارکرهای پس میوزی نیستند [34].

گروه سوم تحقیقات نیز نشان داد که سلولهای مزانشیمی قادر به تمایز به سلولهای زایای بدوی نیستند و در صورت پیوند به بیضه موش عقیم شده نیز اثری از سلولهای اسپرماتوگونی و فرآیند اسپرماتوژنز مشاهده نمی شود. همان طور که لاسال و همکاران [37] با پیوند سلولهای مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان به بیضه موش صحرایی عقیم شده و بررسی های انجام شده پس از ۶، ۳ و ۹ ماه از زمان پیوند، نشان دادند که سلول هاپلوئیدی و روند اسپرماتوژنز در بافت بیضه مشاهده نمی شود. مطالعه حاضر فقط در سطح کشت سلولی انجام شد و نشان داد که مارکرهای پیش میوزی و میوزی بیان می شوند، بنابراین با نتایج گروه سوم تحقیقات مغایرت دارند.

در واقع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلولهای بنیادی بند ناف و مغز استخوان قادر به تمایز به سلولهای شبه زایا هستند. ولی پتانسیل تمایزی سلولهای بنیادی بند ناف در مقایسه با سلول بنیادی مغز استخوان بیشتر است. اما در مقابل پتانسیل تکثیری سلولهای بنیادی مغز استخوان نسبت به سلولهای بنیادی بندناف بیشتر است. به عبارت دیگر سلولهای بنیادی ژله وارتنون بندناف و سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از نظر پتانسیل تمایزی و تکثیری متفاوت هستند. علی رغم شرایط یکسان کشت سلولی، به نظر می رسد که این تفاوت به دلیل فاکتورهای ترشح شده از این سلولها باشد. بنابراین پیشنهاد می شود در مطالعات آتی آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی مربوط به بررسی نوع فاکتورهای ترشح شده از این سلولها نیز بررسی شود.

نتیجه گیری

به نظر می رسد پتانسیل تمایز سلولهای بنیادی بند ناف به سلولهای شبه زایا بیشتر از پتانسیل تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان و در مقابل پتانسیل تکثیر سلولهای بنیادی مغز

- regulation of BMP4 expression in the male germ line. *Dev Biol.* 2005;286(1):78-90.
- 24- Griswold MD, Hogarth CA, Bowles J, Koopman P. Initiating meiosis: The case for retinoic acid. *Biol Reprod.* 2012;86(2):35.
- 25- 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;86(7):654-63.
- 26- Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod.* 2003;68(1):272-81.
- 27- Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iran J Reprod Med.* 2013;11(7):537-44.
- 28- 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;427(6970):148-54.
- 29- Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;272(1):398-402.
- 30- Hosseinzadeh Anvar L, Hosseini Asl S, Sagha M. Relationship between the telomerase activity and the growth kinetics of the human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Tehran Univ Med J.* 2016;74(5):321-9. [Persian]
- 31- Baghaban Eslaminejad MR, Nazarian H, Taghiyar L. Mesenchymal stem cells with high growth rate in the supernatant medium from rat bone marrow primary culture. *J Babol Univ Med Sci.* 2008;10(2):12-22. [Persian]
- 32- Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: The sperm generation. *BioMed Res Int.* 2013;2013:529589.
- 33- Salem M, Mirzapour T, Bayrami A, Sagha M, Asadi A. The effects of sertoli cells condition medium and retinoic acid on the number of colonies of bone marrow mesenchymal stem cells. *Ardabil Univ Med Sci.* 2017;17(1):7-21. [Persian]
- 34- Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell.* 2006;11(1):125-32.
- 35- Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang Ch, Hikim AS, et al. Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: Potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol.* 2007;170(3):899-908.
- 36- Huang P, Lin LM, Wu XY, Tang QL, Feng XY, Lin GY, et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2010;109(4):747-54.
- 37- Lassalle B, Mouthon MA, Riou L, Barroca V, Coureuil M, Boussin F, et al. Bone marrow-derived stem cells do not reconstitute spermatogenesis in vivo. *Stem Cells.* 2008;26(5):1385-6.
- differentiation of primordial germ cells from human embryonic stem cells. *Oncotarget.* 2017;8(5):7814-26.
- 9- Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Baghaban Eslaminejad M, Sedighi-Gilani M. Derivation of male germ cells from ram bone marrow mesenchymal stem cells by three different methods and evaluation of their fate after transplantation into the testis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2016;52(1):49-61.
- 10- Ezquer FE, Ezquer ME, Vicencio JM, Calligaris SD. Two complementary strategies to improve cell engraftment in mesenchymal stem cell-based therapy: Increasing transplanted cell resistance and increasing tissue receptivity. *Cell Adh Migr.* 2017;11(1):110-9.
- 11- Shang F, Liu Sh, Ming L, Tian R, Jin F, Ding Y, et al. Human umbilical cord MSCs as new cell sources for promoting periodontal regeneration in inflammatory periodontal defect. *Theranostics.* 2017;7(18):4370-82.
- 12- Kermani Sh, Karbalaei K, Madani H, Jahangirnezhad AA, Nasresfahani MH, Baharvand H. Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. *J Arak Univ Med Sci.* 2008;11(3):117-25. [Persian]
- 13- Sobolewski K, Małkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta.* 2005;26(10):747-52.
- 14- Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(36):6052-63.
- 15- Kadam P, Van Saen D, Goossens E. Can mesenchymal stem cells improve spermatogonial stem cell transplantation efficiency?. *Andrology.* 2017;5(1):2-9.
- 16- Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction.* 3rd Edition. Berlin: Springer; 2010. pp. 11-59.
- 17- Hajian Monfared M, Minaee B, Rastegar T, Khrazinejad E, Barbarestani M. Sertoli cell condition medium can induce germ like cells from bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(11):1186-92.
- 18- Lakpour MR, Aghajanzpour S, Koruji M, Shahverdi A, Sadighi-Gilani MA, Sabbaghian M, et al. Isolation, culture and characterization of human sertoli cells by flow cytometry: Development of procedure. *J Reprod Infertil.* 2017;18(2):213-7.
- 19- Lohr HR, Kuntchithapatham K, Sharma AK, Rohrer B. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Exp Eye Res.* 2006;83(2):380-9.
- 20- 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;22(5):1205-12.
- 21- Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell.* 2008;134(6):921-31.
- 22- Li H, Kim KH. Retinoic acid inhibits rat XY gonad development by blocking mesonephric cell migration and decreasing the number of gonocytes. *Biol Reprod.* 2004;70(3):687-93.
- 23- Baleato RM, John Aitken R, Roman SD. Vitamin A