

The effect of Low-intensity Pulsed Ultrasound Stimulation on Neonate Mouse Spermatogonial Stem Cells

Mahdi Mohaqiq¹, Mansoureh Movahedin^{2*}, Manizheh Mokhtari Dizaji³,
Zohreh Mazaheri⁴

1- Ph.D. Candidate, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Postdoc Researcher, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: movahed.m@modares.ac.ir

Received: 29/Sep/2013, Accepted: 03/Nov/2013

Abstract

Objective: This study presents an efficient, cost-effective method to improve proliferation and colonization of spermatogonial stem cells (SSCs) in vitro.

Methods: Isolated SSCs from neonate mice were cultured in DMEM culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS). In the first phase of the study, the temperature was controlled by low intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS) of the plate that contained the culture medium. In the next phase, SSCs were stimulated by LIPUS with 200 mW/cm² with 20% and 40% duty cycle for five days. Proliferation and colonization of SSCs were on the seventh day.

Results: LIPUS treatment of mouse SSCs increased the proliferation rate and colonization of SSCs in the experimental groups compared to the control group. Average proliferation rate in the 20% duty cycle group was 1.46 ± 0.06 , in the 40% duty cycle group it was 2.00 ± 0.1 and for the control group, it was 1.26 ± 0.06 . The average number of colonies in the 20% duty cycle group was 24 ± 7.7 , whereas the 40% duty cycle group had 62 ± 1.4 colonies and the control group had an average of 19 ± 5.5 colonies. Average colony diameters were as follows: $186.6 \pm 2.07 \mu\text{m}$ (20% duty cycle group), $185.3 \pm 4.4 \mu\text{m}$ (40% duty cycle group) and $190.0 \pm 2.0 \mu\text{m}$ (control group). Our results showed a significant increase in proliferation rate and number of colonies in the experimental groups compared to the control group ($P < 0.05$), whereas no significant differences were observed between groups in colony diameters.

Conclusion: These results suggested that LIPUS treatment can be an efficient, cost-effective method to improve proliferation and colonization of SSCs during in vitro culture.

Keywords: Proliferation, Colonization, Mouse, Stem cell, Ultrasound

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 2, Summer 2013, Pages: 85-94

تأثیر امواج فراصوت با شدت پایین پالسی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش نوزاد

مهدی محقق^۱، منصوره موحدین^{۲*}، منیژه مختاری دیزچی^۳، زهره مظاهری^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- پژوهشگر فرا دکتری، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: movahed.m@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۸/۱۳

دریافت مقاله: ۹۲/۰۷/۰۸

چکیده

هدف: مطالعه حاضر با هدف آرایه یک روش مؤثر و کم هزینه برای بهبود تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه انجام شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از موش نوزاد در محیط کشت DMEM حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد جدا شدند. در مرحله اول این مطالعه، دما به وسیله تابش امواج فراصوت با شدت پایین روی ظرف کشت حاوی محیط کشت کنترل شد و در فاز بعدی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت تابش امواج فراصوت با شدت پایین پالسی با شدت ۲۰۰ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع با چرخه‌های کاری ۲۰ درصد و ۴۰ درصد به مدت ۵ روز قرار گرفتند و میزان تکثیر و کلونی‌زایی در روز هفتم بررسی شد.

نتایج: تحریک امواج فراصوت با شدت پایین پالسی روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، میزان تکثیر و کلونی‌زایی را در گروه‌های آزمون در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. میانگین میزان تکثیر در گروه‌های چرخه کاری ۲۰ درصد و ۴۰ درصد و کنترل به ترتیب 0.06 ± 0.01 ، 0.06 ± 0.01 و 0.06 ± 0.01 بود. میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه‌های چرخه کاری ۲۰ درصد و ۴۰ درصد و کنترل به ترتیب 7.7 ± 2.4 ، 1.4 ± 6.2 و 5.0 ± 1.9 بود. میانگین قطر کلونی‌ها در گروه‌های چرخه کاری ۲۰ درصد و ۴۰ درصد و کنترل به ترتیب 2.0 ± 1.8 ، 4.0 ± 1.8 و 2.0 ± 1.8 میکرومتر بود. نتایج بررسی حاضر نشان داد که در میزان تکثیر و تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$)؛ در حالی که بین قطر کلونی‌ها در گروه‌های آزمون و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: این نتایج پیشنهاد می‌کند که امواج فراصوت با شدت پایین پالسی می‌تواند یک روش مؤثر و کم هزینه برای بهبود تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی طی کشت آزمایشگاهی باشد.

کلیدواژگان: تکثیر، کلونی‌زایی، موش، سلول‌های بنیادی، امواج فراصوت

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات: ۸۵-۹۴

[۸] شده است. تاکنون اثر امواج فراصوت با شدت پایین روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هیچ مطالعه‌ای بررسی نشده است. با توجه به نقش مهم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در باروری مردان و اهمیت تکثیر و کلونی‌زایی این سلول‌ها برای درمان ناباروری با علل مردانه، در این پژوهش سعی بر آن است که تأثیر امواج فراصوت با شدت پایین پالسی روی تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های اسپرماتوگونی

موش‌های نر و ماده [نژاد (National Medical Research Institute) NMRI] بالغ در حیوانخانه دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط مناسب (۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی) نگهداری شدند. تمام روش‌های مورد استفاده در این مطالعه طبق موازین مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. تمامی مواد مصرف شده در این مطالعه از شرکت Sigma (ساخت کشور آلمان) تهیه شد. جداسازی سلول‌ها با توجه به مطالعات گذشته [۱۳] و مطابق با روش اصلاح شده جوانمردی و همکاران [۱۴]، به منظور ایجاد سیستم هم‌کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با سلول‌های سرتولی اتولوگ (Autologous Sertoli Cells) انجام شد. برای هر بار جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی، بیضه‌های ۵ تا ۱۰ سر موش نوزاد نر ۳ تا ۵ روزه برداشته شد. ابتدا بیضه‌های خارج شده در PBS (Phosphate Buffer Serum) شست و شو و سپس به محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) منتقل شد. بعد از شست و شوی مجدد، کپسول و بافت‌های اضافی مثل اپیدیدیم (Epididymis) از بیضه‌ها جدا شد. سپس نمونه‌ها در محیط کشت DMEM حاوی آنزیم کلاژناز (Collagenase Enzyme) (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد.

مطالعات نشان می‌دهد که در ۴۰ درصد از موارد ناباروری مشکلاتی نظیر فقدان اسپرم، کاهش تعداد اسپرم یا کاهش تحرک اسپرم به چشم می‌خورد. این کاهش تعداد اسپرم در بعضی موارد به دلیل کاهش در تعداد سلول‌های اجدادی اسپرم یا همان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (Spermatogonial Stem Cells) است [۱]. غنی‌سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط کشت، امری مهم بوده و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی، منبع با ارزشی از سلول‌های ژرم (Germ Cells) را فراهم می‌آورد که برای مطالعات بعدی نظیر انجماد، پیوند سلول‌های ژرم برای درمان ناباروری، دست‌کاری ژنتیکی سلول‌های ژرم، ترانسفکت ژنی (Gene Transfection) سلول‌ها و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه بسیار ارزشمند است [۲]. مطالعات اخیر نشان داده‌است که روش‌های نوینی از جمله استفاده از امواج صوتی به‌ویژه امواج فراصوت با شدت پایین (Low Intensity Ultrasound) می‌تواند در تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها اثر بخش باشد [۳-۸]. امواج فراصوت توانایی تغییر در غشای سلول (چسبندگی سلولی، تأثیر در تراوایی غشا، جریان کلیسم و توان تکثیر سلول‌ها) و نیز توانایی فعال‌سازی مسیرهای گذردهی پیامی منجر به بیان ژن، توانایی تغییر در شکل‌گیری سه بعدی پروتئین‌ها و آنزیم‌های درون سلولی و ایجاد جایگاه فعال (Active Site) و نیز برداشت مهارکننده‌ها را از ساختمان پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را دارند [۹-۱۳].

در حال حاضر تأثیر مثبت امواج فراصوت روی انواع سلول‌های بنیادی منجر به افزایش رشد، تکثیر، تمایز و ... شده است. این امواج باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف انسانی [۳]، سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک (Hematopoietic Stem Cells) [۴] و سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی [۵] شده است. همچنین این امواج باعث افزایش تکثیر سلول‌های کندروسیت (Chondrocyte Cells) [۶، ۷] و فیبروبلاست (Fibroblast)

مخلوط سلول‌ها و آنزیم در داخل انکوباتور ۳۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار گرفته و هر ۵ دقیقه با استفاده از پیپت با هم مخلوط شدند. بعد از ۱۵ دقیقه سلول‌ها با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. بعد از دور ریختن مایع رویی، سلول‌ها ۲ بار با استفاده از PBS شسته شده و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. در این مرحله ۳ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین (Trypsin Enzyme) ۰/۱ درصد به پلاک سلولی در کف لوله فالکون اضافه شد و به مدت ۶۰ ثانیه پیپتاژ شد تا این‌که سلول‌ها کاملاً به صورت مجزا درآمدند. در ادامه سوسپانسیون سلولی به دست آمده که اغلب حاوی سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی بود به صورت هم کشتی و با تعداد مساوی در ظرف کشت‌های ۳۵ میلی‌متری حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد سرم FBS کشت داده شدند. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک بار انجام شد.

تأیید ماهیت کلونی‌های حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی

به منظور تأیید ماهیت کلونی‌های به دست آمده از سلول‌های اسپرماتوگونی از روش ایمونوسیتوشیمی (PLZF Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger) براساس دستورالعمل کارخانه سازنده (Santa Cruz Biotechnology، آمریکا) استفاده شد. روش کار به اختصار شامل موارد زیر بود:

ابتدا کلونی‌های کشت شده روی لامل دوبار به مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات شستشو شدند. سپس برای ثبوت به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدید ۴ درصد قرار گرفتند. پس از شستشو در بافر فسفات به مدت ۵ دقیقه برای تسهیل نفوذ آنتی‌بادی به داخل سلول از تریتون X-۱۰۰ (Triton x-100) ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. مرحله مهارسازی در سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس به کلونی‌ها، آنتی‌بادی اولیه آنتی PLZF موشی

با رقت ۱ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بعد از این مرحله و سه بار شستشو با بافر فسفات هربار به مدت ۵ دقیقه روی نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه (Goat FITC-conjugated anti Rabbit IgM) (Sigma، آمریکا) با غلظت ۱ درصد در تاریکی و دمای اتاق پوشیده شد.

پس از سه بار شستشو با بافر فسفات هربار به مدت ۵ دقیقه نمونه‌ها با چسب گلیسرول فسفات چسبانده شد. از نمونه‌های رنگ شده به کمک میکروسکوپ فلورسنت عکسبرداری شد.

تابش امواج فراصوت با شدت پایین بر سلول‌های اسپرماتوگونی

روش تابش دهی و پارامترهای اولیه (فرکانس ۱ مگاهرتز به مدت ۵ روز) با توجه به شباهت سلول‌ها و فرضیه‌های پژوهش، براساس مطالعات قبلی [۴، ۵] انتخاب شد. به این صورت که امواج فراصوت به وسیله دستگاه فراصوت (Ultrasound Machine) (PHYSIOMED، آلمان) به سلول‌ها تابیده شد. امواج به وسیله یک مبدل (Transducer) با سطح مقطع ۳۵ میلی‌متر به واسطه ژل واسط (Coupling Gel) بین مبدل و ظرف کشت، از زیر ظرف کشت به سلول‌ها تابیده شد. تابش امواج فراصوت در انکوباتور با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد به سلول‌ها انجام گرفت (شکل ۱). در مرحله اول ظرف کشت حاوی محیط کشت و بدون سلول با شدت ۲۰۰ میلی‌وات بر سانتی‌متر مربع (mW/cm²) تحت تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی قرار داده شد. همزمان دمای محیط کشت به وسیله میکروترمو متر کنترل شد (شکل ۲). زمان مناسب برای تابش، زیر حد بیش‌گرمایی یعنی زمان لازم برای افزایش ۱ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. در مرحله بعدی امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با شدت ۲۰۰ mW/cm² در ۲ گروه آزمون با چرخه‌های کاری ۲۰ درصد و ۴۰ درصد

امواج فراصوت و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

گرفت. کلونی‌های مشتق از سلول‌های اسپرماتوگونی در روز هفتم از نظر تعداد و قطر به کمک میکروسکوپ معکوس (Ziess، آلمان) مجهز به عدسی چشمی مدرج (Ocular Grid) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به کمک آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) و آزمون T (T-test) و آزمون تکمیلی توکی (Tukey)، تجزیه و تحلیل شد. تمام داده‌ها ۳ بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است. سطح معنی‌داری در مقایسه بین گروه‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تأیید ماهیت کلونی‌های به‌دست آمده از

سلول‌های اسپرماتوگونی

برای حصول اطمینان از ماهیت کلونی‌های حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی جداسازی شده، از نشانگر اختصاصی PLZF استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد که نشانگر PLZF به‌طور بارز و مشخص در کلونی‌های حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی بیان و در نتیجه ماهیت این کلونی‌ها تثبیت شد (شکل ۳ و ۴).

کنترل دما

براساس نتایج حاصل از بررسی‌های مرحله کنترل دما، مدت زمان لازم برای ایجاد بیش‌گرمایی به‌وسیله امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با شدت 200 mW/cm^2 حدود ۲۰۰ ثانیه بود. روند افزایش دما طی تابش امواج در (شکل ۵) ارائه شده است.

استفاده شد. زمان تابش امواج فراصوت براساس نتایج حاصل از مرحله کنترل دما برای تابش‌دهی به‌دست می‌آید.



شکل ۱ روش تابش‌دهی امواج فراصوت روی سلول‌ها

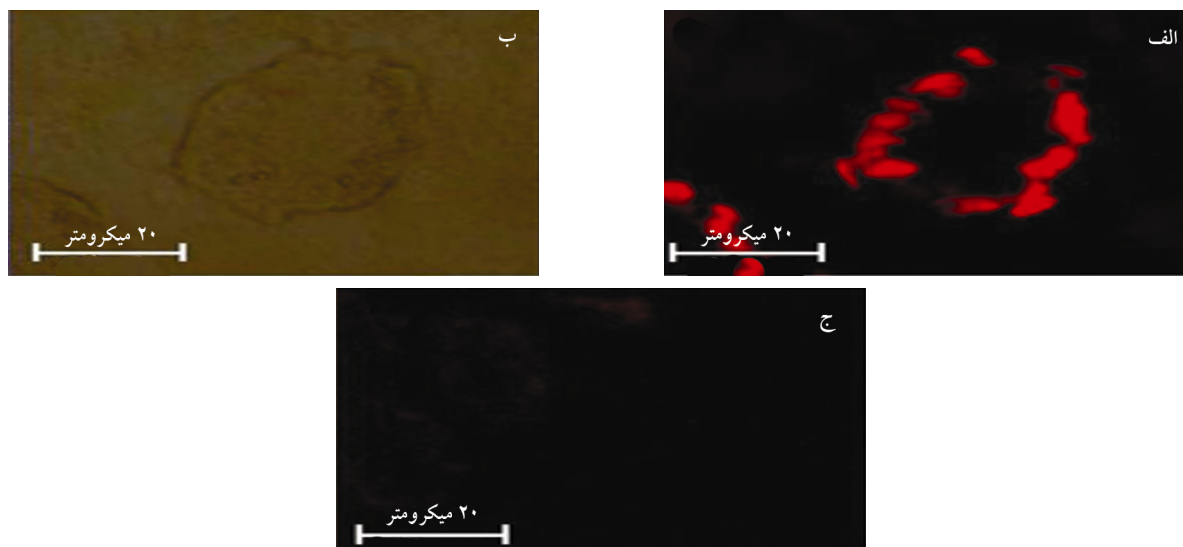


شکل ۲ نحوه به‌کارگیری میکروترمو متر برای اندازه‌گیری دمای محیط کشت و دمای محیط انکوباتور

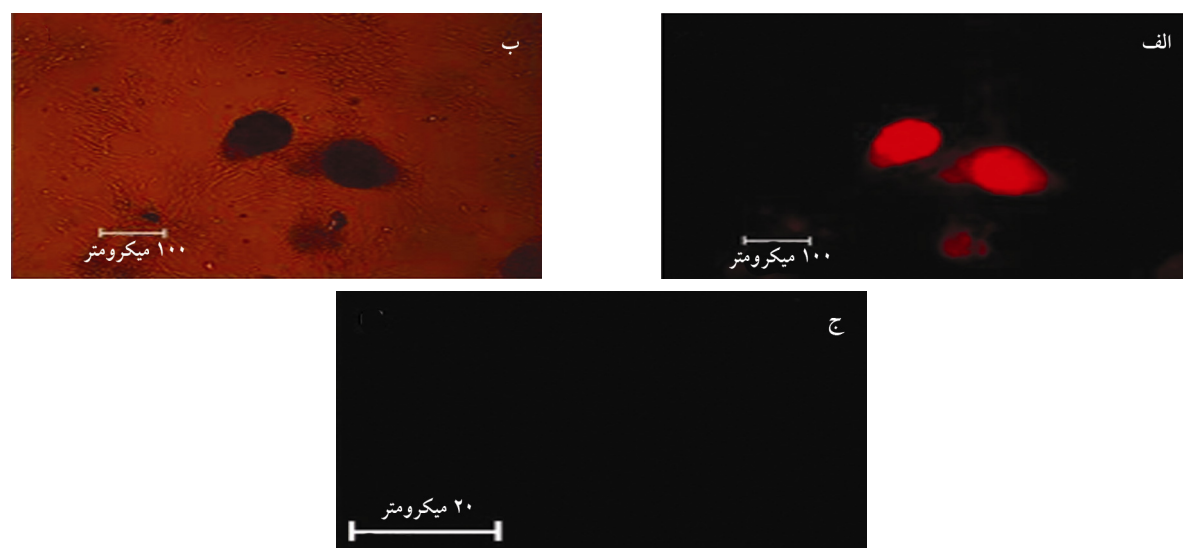
بررسی میزان تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های

اسپرماتوگونی

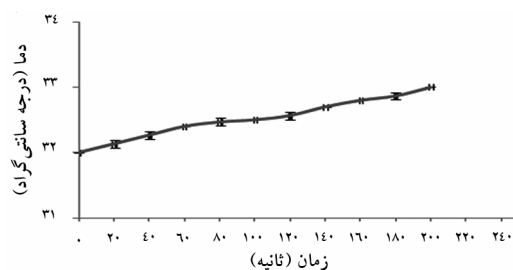
تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای مختلف به کمک لام شمارش سلولی مخصوص، شمارش و با هم مقایسه شدند. ارزیابی کلونی‌زایی براساس مطالعات قبلی [۱۵] صورت



شکل ۳ بررسی نشانگر PLZF در بیضهٔ موش نوزاد به‌عنوان گروه کنترل مثبت (الف)؛ شکل‌های (ب) و (ج) به‌ترتیب تصاویر فاز و کنترل منفی است.



شکل ۴ بیان نشانگر PLZF در کلونی‌های به‌دست آمده از سلول‌های اسپرماتوگونی (الف)؛ شکل‌های (ب) و (ج) به‌ترتیب تصاویر فاز و کنترل منفی است.

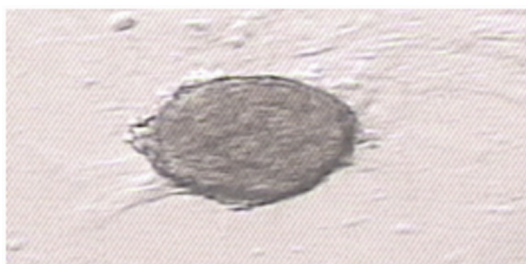


شکل ۵ زمان لازم برای ایجاد ۱ درجه سانتی‌گراد افزایش دما در محیط کشت؛ امواج فراصوت طی ۲۰۰ ثانیه، ۱ درجه سانتی‌گراد بیش‌گرمایی را ایجاد کرد.

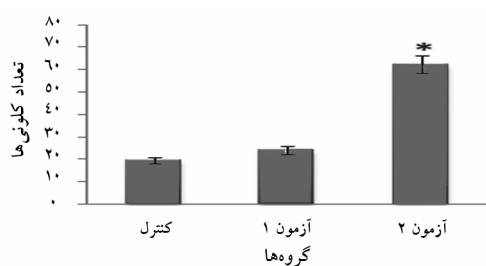
امواج فراصوت و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

ابتدا تجمعات سلولی را شکل داده و در ادامه کلونی (شکل ۷) ایجاد کردند. در این میان امواج فراصوت با پارامترهای ذکر شده باعث افزایش تعداد کلونی‌های حاصل از سلول‌های اسپرماتوگونی شد ولی بر قطر کلونی‌ها تأثیری نداشت. نتایج حاصل از بررسی کلونی‌زایی شامل تعداد و قطر کلونی‌ها در شکل ۸ و ۹ ارایه شده است.

نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد تعداد کلونی‌ها در گروه آزمون ۲ ($62 \pm 1/4$) نسبت به دو گروه آزمون ۱ ($24 \pm 7/7$) و کنترل ($19 \pm 5/5$) به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/05$). میانگین تعداد کلونی‌ها در گروه‌های آزمون ۱ و کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین براساس نتایج قطر کلونی‌های به‌دست آمده در گروه‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌داری نداشت.



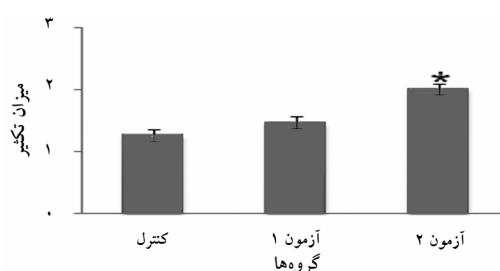
شکل ۷ نمونه کلونی به‌دست آمده از سلول‌های اسپرماتوگونی



شکل ۸ مقایسه کلونی‌زایی بین گروه‌های آزمون و کنترل در روز هفتم؛ گروه آزمون ۲ حداکثر تعداد کلونی را داشت. *: تفاوت معنی‌دار با گروه‌های دیگر وجود دارد ($P < 0/05$). گروه آزمون ۱: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با چرخه کاری ۲۰ درصد، گروه آزمون ۲: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با چرخه کاری ۴۰ درصد، گروه کنترل: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بدون تابش امواج فراصوت

ارزیابی میزان تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی

نتایج به‌دست آمده از بررسی روند تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت نشان داد که امواج فراصوت با پارامترهای مذکور، میزان تکثیر و کلونی‌زایی این سلول‌ها را افزایش داده است. نتایج حاصل از بررسی میزان تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی تحت تأثیر امواج فراصوت در شکل ۶ ارایه شده است.

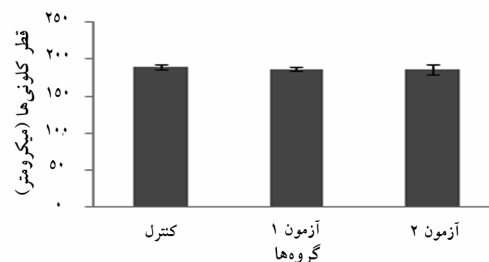


شکل ۶ مقایسه میزان تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی بین گروه‌های آزمون و کنترل در روز هفتم؛ گروه آزمون ۲ حداکثر میزان تکثیر را داشت. *: تفاوت معنی‌دار با گروه‌های دیگر وجود دارد ($P < 0/05$). گروه آزمون ۱: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با چرخه کاری ۲۰ درصد، گروه آزمون ۲: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با چرخه کاری ۴۰ درصد، گروه کنترل: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بدون تابش امواج فراصوت

بعد از هفت روز کشت، سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل ۱/۲۶ برابر ($\pm 0/06$) شد، در حالی‌که میزان تکثیر سلول‌ها در گروه آزمون ۱، ۱/۴۶ ($\pm 0/06$) برابر و در گروه آزمون ۲، دو برابر ($\pm 0/10$) شد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میزان تکثیر در گروه آزمون ۲ نسبت به دو گروه آزمون ۱ و کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$). بین میانگین میزان تکثیر در گروه‌های آزمون ۱ و کنترل اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد.

ارزیابی کمی کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی

نتایج حاصل از بررسی روند کلونی‌زایی سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط کشت نشان داد که این سلول‌ها در



شکل ۹ مقایسه قطر کلونی‌ها بین گروه‌های آزمون و کنترل در روز هفتم؛ قطر کلونی‌ها در گروه‌های مختلف یکسان بود. گروه آزمون ۱: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با چرخه کاری ۲۰ درصد، گروه آزمون ۲: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت ۵ روز تابش امواج فراصوت ۱ مگاهرتزی با چرخه کاری ۴۰ درصد، گروه کنترل: کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بدون تابش امواج فراصوت

بحث

در مطالعه حاضر به منظور غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه، از روش تابش امواج فراصوت با شدت پایین استفاده شد. با توجه به این‌که میزان خلوص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز موش نوزاد (سن کمتر از ۶ روز) در بالاترین سطح است، در مطالعه حاضر از سلول‌های موش ۳ تا ۵ روزه استفاده شد.

فرایند اسپرم‌زایی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در موش‌ها همانند دیگر پستانداران، نسبت به افزایش دما حساس بوده و به دنبال آن درجاتی از ناباروری را به دنبال خواهد داشت [۱۶، ۱۷]. به منظور جلوگیری از افزایش دما و ایجاد بیش‌گرمایی و به دنبال آن تأثیرات منفی آن روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، همچنین جلوگیری از آثار حرارتی امواج فراصوت روی سلول‌ها، که مورد نظر محققان حاضر نبود، دمای محیط کشت تحت تأثیر امواج فراصوت کنترل شد. پنگ (Peng) و همکارانش در سال ۲۰۱۲ تأثیر این امواج را روی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک بررسی کردند و بیان کردند که طی تابش امواج فراصوت با شدت پایین، تغییرات دمایی نداشته‌اند و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را به صورت عمومی در

نظر گرفته و تابش امواج فراصوت را انجام دادند [۴]. همراهی و همکارانش در سال ۱۳۸۷ نیز تأثیر امواج فراصوت با شدت پایین را روی سلول‌های مزانشیمی مطالعه کردند و عنوان نمودند که افزایش دما تا یک درجه سانتی‌گراد مجاز بوده و از آن فراتر نرفته است [۱۸].

در این مطالعه تأثیر امواج فراصوت با شدت پایین با چرخه‌های کاری مختلف روی میزان تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه بررسی شد و این نتیجه به دست آمد که امواج فراصوت با شدت پایین پالسی، باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بعد از هفت روز کشت، می‌شوند. امواج فراصوت باعث افزایش تعداد کلونی‌ها بدون تغییر در قطر آن‌ها شد که نتایج این مطلب را بیان می‌کند که احتمال دارد این امواج باعث شود که تعداد بیشتری از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی وارد روند تقسیمات میتوزی شود. تحریک مکانیکی مثل کشیدگی سلولی، می‌تواند یک شروع کننده در افزایش فعالیت سلولی باشد و باعث فعالیت آبشار ERK (Extracellular signaling Regulated Kinases) در سیستم‌های مختلف سلولی [۱۹]، تأثیر روی اسکلت سلولی اکترین و چرخه رشد سلولی [۲۰] شده و منجر به تکثیر سلولی شود [۲۱]. امواج فراصوت با شدت پایین به عنوان یک تحریک مکانیکی روی پیام‌های داخل سلولی تأثیر گذاشته و با توجه به عوامل رشد و دیگر ژن‌های روشن سلول باعث تأییراتی روی میزان تکثیر، رشد، ترمیم و غیره سلول می‌شود. جانگ (Jong) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که امواج فراصوت با شدت پایین باعث بهبود تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف انسانی می‌شود [۳]. پنگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که امواج فراصوت با شدت پایین پالسی روی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک، منجر به افزایش تکثیر، حفظ قدرت زیست این سلول‌ها و افزایش تشکیل کلونی‌های اریتروئید (Erythroid) می‌شود؛ در حالی‌که تأثیری روی درصد سلول‌های CD34⁺ و CD14⁺ نداشت. آن‌ها معتقد بودند که

سلولی می‌شود [۲۲].

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که امواج فراصوت با شدت پایین به‌عنوان یک روش کم هزینه و بدون عوارض جانبی برای بهبود غنی‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بوده و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

تأثیرات مطلوب امواج فراصوت با شدت پایین پالسی روی تکثیر، حفظ قدرت زیست و تمایز سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئیتیک برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی آن، نیازمند تحقیقات بیشتر است [۴]. ژو (Zhou) و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که امواج فراصوت با شدت پایین پالسی، خانواده ژن همولوگ Ras و RhoA که ناشی از تشکیل فیبر اکسین است را فعال می‌کند. این امواج منجر به فعالیت ERK1/2 (در ارتباط با مسیر خارج سلولی تنظیم شده با کینازها) و تولید DNA شده و در نهایت باعث افزایش تکثیر سلولی فیبروبلاست‌ها می‌شود [۸]. ایواشینا (Iwashina) و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که امواج فراصوت با شدت پایین پالسی روی سلول‌های دیسک بین مهره‌ای خرگوش باعث افزایش تولید پروتئوگلیکان و تکثیر

منابع

- [1] Terada T, Hatakeyama S. Morphological evidence for two types of idiopathic 'Sertoli-cell-only' syndrome. *Int J Androl* 1991; 14(2): 117-26.
- [2] Mohammadi SM, Movahedin M, Korouji SM. A comparison between the colony formation of adult mouse spermatogonial stem cells in co cultures with sertoli and STO (mouse embryonic fibroblast cell line). Master Thesis. Tehran: Tarbiat Modares University 2009. (Persian)
- [3] Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Lee DS, Han KS, Kim JS, Kim BJ, Jeon HW, Yoon KS. Introducing pulsed low-intensity ultrasound to culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 2009; 31(3): 329-35.
- [4] Xu P, Gul-Uludag H, Ang WT, Yang X, Huang M, Marquez-Curtis L, McGann L, Janowska-Wieczorek A, Xing J, Swanson E, Chen J. Low-intensity pulsed ultrasound-mediated stimulation of hematopoietic stem/progenitor cell viability, proliferation and differentiation in vitro. *Biotechnol Lett* 2012; 34(10): 1965-73.
- [5] Jiang T, Xu T, Gu F, Chen A, Xiao Z, Zhang D. Osteogenic effect of low intensity pulsed ultrasound on rat adipose-derived stem cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2012; 32(1): 75-81.
- [6] Zhang ZJ, Huckle J, Francomano CA, Spencer RG. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(11): 1645-51.
- [7] Korstjens CM, van der Rijt RH, Albers GH, Semeins CM, Klein-Nulend J. Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro. *Med Biol Eng Comput*

- 2008; 46(12): 1263-70.
- [8] Zhou S, Schmelz A, Seufferlein T, Li Y, Zhao J, Bachem MG. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279(52): 54463-9.
- [9] Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 2002; 37(3): 293-9.
- [10] Fischell TA, Abbas MA, Grant GW, Siegel RJ. Ultrasonic energy. Effects on vascular function and integrity. *Circulation* 1991; 84(4): 1783-95.
- [11] Maxwell L, Collecute T, Gledhill M, Sharma S, Edgar S, Gavin JB. The augmentation of leucocyte adhesion to endothelium by therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1994; 20(4): 383-90.
- [12] Steffen W, Cumberland D, Gaines P, Luo H, Nita H, Maurer G, Fishbein MC, Siegel RJ. Catheter-delivered high intensity, low frequency ultrasound induces vasodilation in vivo. *Eur Heart J* 1994; 15(3): 369-76.
- [13] Scarpino S, Morena AR, Petersen C, Fröysa B, Söder O, Boitani C. A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 146(1-2): 121-7.
- [14] Javanmardi S, Asadi MH, Movahedin M. Isolation, expansion and purification of mouse spermatogonial stem cells in an autologous sertoli cell co-culture system. *Modares J Med Sci Path* 2013; 15(4): 21-33.
- [15] Hasthorpe S. Clonogenic culture of normal spermatogonia: in vitro regulation of postnatal germ cell proliferation. *Biol Reprod* 2003; 68(4): 1354-60.
- [16] Hand JW, Walker H, Hornsey S, Field SB. Effects of hyperthermia on the mouse testis and its response to X-rays, as assayed by weight loss. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1979; 35(6): 521-8.
- [17] McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod* 2002; 66(5): 1374-9.
- [18] Hamrahi D, Shiran MB, Baghban Eslaminezhad MR, Gourabi H, Rouhi L. Effect of low- intensity ultrasound on osteogenic differentiation of rat bone- marrow mesenchymal stem cell: an in vitro study. *Laser in Medicine*; 2008; 5(2): 6-11. (Persian)
- [19] Weyts FA, Li YS, van Leeuwen J, Weinans H, Chien S. ERK activation and α v β 3 integrin signaling through Shc recruitment in response to mechanical stimulation in human osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002; 87(1): 85-92.
- [20] Johnston DS, Russell LD, Griswold MD. Advances in spermatogonial stem cell transplantation. *Rev Reprod* 2000; 5(3): 183-8.
- [21] Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5-6): 755-63.
- [22] Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. *Biomaterials* 2006; 27(3): 354-61.