



## بررسی اثر انکپسوله‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هیدروژل آلژینات در طی انجماد-ذوب

افشین پیرنیا<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، پریچهر یغمایی<sup>۳</sup>، مسعود حمادی<sup>۴</sup>، محمدرضا غلامی<sup>۵\*</sup>

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران- دانشکده علوم پایه- دکترای علوم جانوری، سلولی، تکوینی.
- ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران- دانشکده علوم پایه- دکترای علوم جانوری، سلولی، تکوینی- گروه زیست‌شناسی جانوری- استاد.
- ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران- دانشکده علوم پایه- دکترای فیزیولوژی جانوری- گروه زیست‌شناسی جانوری- دانشیار.
- ۴- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز- دانشکده پزشکی- دکترای علوم تشریحی- مرکز تحقیقات باروری و ناباروری- دانشیار.
- ۵- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه- دانشکده پزشکی- دکترای علوم تشریحی- گروه علوم تشریحی- دانشیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۷

### چکیده

**مقدمه:** اسپرماتوژنز پستانداران از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) منشاء می‌گیرد. درمان‌های ضد سرطان، اعم از پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی، با هدف قرار دادن این سلول‌های پرتکثیر می‌توانند باعث ناباروری شوند. در مردان بالغ مبتلا به سرطان، انجماد اسپرماتوزوئیدها قبل از شروع درمان راه حفظ باروری در طی روند درمان است؛ اما در پسران نابالغ به دلیل نبود اسپرماتوزوئید، انجام این کار مقدور نیست. هدف این مطالعه بررسی اثر آلژینات بر کاهش اثرات سوء انجماد-ذوب بر پتانسیل SSCs و حفظ این سلول‌ها در بچه‌های سرطانی است که تحت شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی قرار می‌گیرند.

**مواد و روش‌ها:** از SSCs از بیضه موش‌های ۶ روزه نابالغ Balb/C جداسازی شدند. خالص‌سازی به‌وسیله آنتی‌بادی‌های Thy-1 و c-kit به روش MACS انجام گرفت. این سلول‌ها در هیدروژل آلژینات انکپسوله و منجمد شدند. بعد از ذوب سلول‌ها تعیین درصد سلول‌های زنده انجام گرفت. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA بررسی بیان ژن‌های Oct4، Sall4، Plzf، Dazl، Etv5، Bcl6b، Lin28 و Nanog به روش Real time-PCR RT صورت گرفت. برای آنالیز نتایج از نرم‌افزار آماری SPSS و برای تجزیه و تحلیل بیان ژن از نرم‌افزار Rest استفاده گردید.

**نتایج:** درصد سلول‌های زنده پس از انجماد در گروه سلول‌های انکپسوله در آلژینات نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. در گروه انجماد با انکپسوله‌سازی در آلژینات بیان ژن‌های Sall4 و Lin28 افزایش یافته ( $P < 0/0001$ ) و بیان ژن Dazl کاهش یافته است ( $P < 0/0001$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از آلژینات به‌عنوان یک داربست در حفاظت سرمایه‌ی SSCs می‌تواند برای حفظ پتانسیل بنیادی این سلول‌ها مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، حفاظت سرمایه‌ی، آلژینات.

\*نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه- دانشکده پزشکی- گروه علوم تشریحی، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۰۲۶۸۴، نمابر: ۳۳۱۲۰۱۳۳  
Email: rezagholami57@gmail.com

**ارجاع:** پیرنیا افشین، پریور کاظم، یغمایی پریچهر، حمادی مسعود، غلامی محمدرضا. بررسی اثر انکپسوله‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در هیدروژل آلژینات در طی انجماد-ذوب. مجله دانش و تندرستی ۱۱(۴):۳۹-۴۷.

## مقدمه

اسپرمتوزن پستانداران از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) منشاء می‌گیرد، به این صورت که این سلول‌ها برای به‌وجود آوردن اسپرماتوزوئید بالغ تحت میتوز، میوز و اسپرمیوز قرار می‌گیرند. SSCها در واقع سلول‌های بنیادی بزرگسالی هستند که هم خودنوزایی (Self-renewal) می‌کنند و هم تمایز می‌یابند. حفظ پلوری پوتنسی آنها هم توسط عوامل بیرونی ترشح‌شده از سلول‌های سوماتیک احاطه‌کننده و هم توسط عوامل درونی مانند برنامه‌های بیان ژن اختصاصی آنها تنظیم می‌شود (۱).

تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بسیار اندک است، به طوری که در بیضه موش‌ها تنها ۰/۰۳ درصد از سلول‌های زایا را تشکیل می‌دهند (۲). سلول‌های بنیادی که اسپرماتوزوئیدها را به وجود می‌آورند به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی بسیار حساس‌ترند در مقایسه با دیگر سلول‌های بیضه‌ای از جمله سلول‌های لیدیک و سرتولی (۳)، بنابراین ناباروری یکی از اثرات جانبی معمول درمان سرطان در مردان است (۴)؛ چرا که درمان‌های ضد سرطان اعم از پرتو درمانی یا شیمی‌درمانی با هدف قرار دادن سلول‌های پرتکتیو، اثر درمانی خود را بر سلول‌های سرطانی اعمال می‌کنند. در این میان، سلول‌های زایا نیز باتوجه به نرخ بالای تکثیر، دچار آسیب و مرگ سلولی می‌شوند که در نهایت با کاهش توان باروری یا ناباروری کامل بیماران همراه است (۵). باتوجه به پیشرفت‌های موجود در درمان سرطان، یافتن راه‌های حفظ باروری کودکان تحت درمان‌های ضد سرطان از اولویت‌های متخصصان علوم باروری به حساب می‌آید (۶).

برخی از روش‌های حفظ باروری در مردان بالغ انجام می‌گیرد، که این روش‌ها، به علت دسترسی به بافت فعال بیضه و نیز اسپرماتوزوآی مؤثر، روش‌هایی به نسبت دردسترس هستند و در حال حاضر امکان حفظ باروری را فراهم می‌آورند. از جمله اخذ و انجماد نمونه‌های اسپرم قبل از انجام شیمی‌درمانی و پرتودرمانی و استفاده از آن برای تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) یا لقاح آزمایشگاهی (IVF) شانس باروری مردان رهایی یافته از سرطان را افزایش داده است (۷). اما از سویی دیگر، روش‌های حفظ باروری کودکان تحت شیمی‌درمانی با مشکل فقدان سلول‌های اسپرماتوگونی فعال و نبود اسپرم مؤثر مواجه است. وجود مشکلات فوق باعث محدودیت روش‌های حفظ باروری برای کودکان شده است. با این حال، تلاش خوبی در این راه انجام شده است و بسیاری از دانشمندان این فرآیند را پیگیری می‌کنند (۸).

نشان داده شده که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌توانند اسپرماتوزن را در موش‌هایی که به‌طور شیمیایی عقیم شده‌اند دوباره برقرار سازند؛ که این امر پتانسیل درمانی جدیدی را برای بازگشت

باروری پیشنهاد می‌کند. تأخیر میان ریکآوری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و متعاقباً ورود مجدد آنها مستلزم حفاظت سرمایه سلول‌های زایاست (۹). حفاظت سرمایه بافت‌ها و سلول‌های جنسی یکی از روش‌های مورد توجه محققین در سال‌های اخیر در زمینه پزشکی تولیدمثل است. استفاده از تکنیک‌های جدید که در هنگام انجماد-ذوب کمترین آسیب را برای سلول و بافت ایجاد کنند، امروزه به‌شدت در حال گسترش و تحقیق قرار دارد. حفاظت سرمایه قطعات بافت بیضه‌ای و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تنها روش‌های حفظ باروری برای کودکان قبل از بلوغ هستند (۱۰). جینزبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ بافت بیضه‌ای بیماران سرطانی جوان را کرایوپرزرو کردند و گزارش کردند که این مداخله برای والدین قابل‌قبول است و بیوپسی‌های بیضه هیچ‌گونه اثرات مضر حادی را ایجاد نمی‌کند (۱۱). علیرغم پیشرفت‌های زیاد در ایجاد تکنیک‌های جدید و تهیه محلول‌های انجمادی مناسب، تاکنون نتایج رضای‌کننده‌ای حاصل نشده است. یکی از تکنیک‌های جدید در نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی به‌منظور استفاده از آنها در سلول درمانی، استفاده از داربست‌های مختلف برای افزایش بازده حفاظت سرمایه سلولی است. استفاده از هیدروژل‌ها مخصوصاً آلژینات برای حفاظت سرمایه سلول‌ها یکی از روش‌های پیشنهادی برای بهبود حفاظت سرمایه و کاهش اثرات سوء آن است که اخیراً مورد تحقیق وسیع قرار دارد (۱۲ و ۱۳). آلژینات نسبت به اکسیژن، مواد غذایی و مولکول‌های سیگنالی نفوذپذیر است که این ویژگی‌ها آن را مناسب استفاده در فرآیند حفاظت سرمایه می‌کند. یکی از مزایای آلژینات نسبت به بقیه هیدروژل‌ها این است که به‌راحتی دپلمریزه شده و سلول‌ها از آن جدا می‌شوند (۱۳ و ۱۴). هدف این مطالعه استفاده از هیدروژل آلژینات در انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در مقایسه با روش‌های معمول است. آیا آلژینات در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌تواند خواص پرتوکتیو در مقابل انجماد داشته باشد؟ و استفاده از هیدروژل آلژینات در تکنیک‌های انجمادی چه تأثیری بر بیان ژن‌های بنیادی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد؟

## مواد و روش‌ها

موش‌های نژاد Balb/c از بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی خریداری گردیدند. پرورش و نگهداری موش‌ها در اتاق حیوانات و در داخل قفس‌های مخصوص انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به همراه تهویه مطبوع و تغذیه با غذای کنستانتره مخصوص موش تهیه‌شده از مؤسسه انستیتوی رازی، آب کافی و دمای  $2 \pm 20$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به علت اینکه برای استخراج سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به موش نابالغ ۶

مغناطیسی MACS Separator قرار گرفت و سوسپانسیون سلولی داخل ستون ریخته شد. در زیر ستون سلول های نشان دار نشده جاری شده و جمع آوری شدند. ستون از MACS Separator جدا شد و روی یک لوله فالكون استریل مناسب قرار گرفت. چند میلی لیتر بافر به درون ستون با سمپلر اضافه شد و با نصب تلمبه ستون و فشردن آن، محتویات آن به درون لوله فالكون خالی گردید که حاوی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی هستند (۱۸).

پس از هر مرحله جداسازی و در طول کار Viability سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو ۰/۴ درصد بررسی شد. برای شمارش سلول نیز از هموسیتومتر استفاده گردید.

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده به شکل پلت سلولی آماده گردید. محلول آلژینات استریل به لوله فالكون حاوی پلت سلولی (با غلظت سلولی  $2 \times 10^6$  در هر سی سی محلول آلژینات) انتقال یافت و در داخل آن مخلوط شده و چند بار پیپتینگ شدند. سپس مخلوط اسپرماتوگونی/آلژینات به آرامی به شکل قطره قطره به ظرف حاوی کلرید کلسیم استریل ریخته شد. در حدود ۱۵ دقیقه در محلول فوق نگهداری گردید تا دانه های آلژیناتی کاملاً پلیمریزه شدند و سپس در محلول (۹/۰٪) NaCl شستشو شدند (۱۳).

محیط انجمادی مورد استفاده شامل محیط کشت DMEM بعلاوه ۱۰ درصد FBS و ۱۰ درصد DMSO است. کرایوپریال های حاوی سلول و محیط انجمادی ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱ ساعت در ۲۰- درجه سانتی گراد و یک شب در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند و در نهایت به تانک نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی گراد) منتقل شدند.

استخراج RNA برای بررسی سطح بیان ژن های مورد مطالعه انجام گرفت. در این مطالعه برای استخراج RNA از Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience, Germany) استفاده شد. همچنین برای سنتز cDNA از کیت AccuPower® CycleScript RT PreMix (dN6) (BIONEER کشور کره جنوبی) و طبق دستور سازندگان آن استفاده شد.

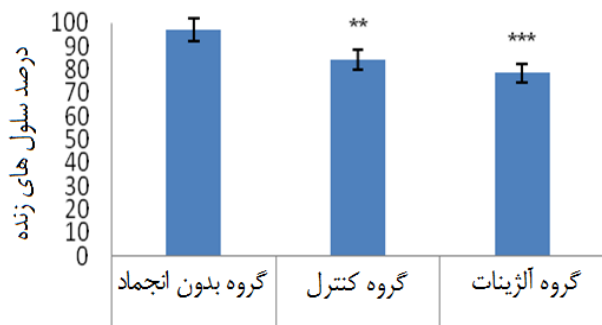
روزه احتیاج است، پس موش های نر و ماده باهم جفت شدند. روز تولد توله موش ها، روز صفر در نظر گرفته شد و ۶ روز بعد توله های نر جدا شده و از بیضه آنها برای استخراج سلول های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده گردید.

موش ها با دوزهای بالای کتامین (۸۰ mg/kg) و زیلازین (mg/kg) (۱۰) کشته شدند (۱۵). ناحیه تناسلی با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد، در قسمت تحتانی شکم بالاتر از لگن با قیچی استریل برشی در دیواره شکم زده و پس از پیدا کردن مثانه در کناره های آن بیضه ها مشاهده می شوند. در مرحله بعد با استفاده از میکروسکوپ استریو، بیضه ها به دقت تشریح و خارج گردید. هضم و استخراج سلول از بیضه موش های ۶ روزه با روش میلرزو و همکاران انجام می شود (۱۶). به این صورت که بیضه ها پس از استخراج به محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ پنی سیلین/استرپتومایسین منتقل شدند و تونیکا آلبوژینه زیر میکروسکوپ استریو برداشته شد. لوله های سمینی فروس به لوله فالكون حاوی DMEM به علاوه ۲ میلی گرم/میلی لیتر کلاژناز و ۳۰۰ میکروگرم/میلی لیتر DNaseI منتقل شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار داده و هر ۵ دقیقه به آهستگی پیپت شدند. لوله ها دو بار با DMEM شستشو شدند (سانتریفیوژ با دور rpm1000 به مدت ۵ دقیقه). به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه ۱ mM EDTA+ 0.25% Trypsin به پلت سلولی حاصل از مرحله قبل اضافه شد و سپس پیپتینگ گردیده و آهسته تکان داده شدند تا سلول های لوله از هم جدا و متفرق گردند. برای جدا شدن بهتر سلول ها ۳۰۰ میکروگرم/میلی لیتر DNaseI اضافه گردید. بعد از جدا شدن سلول ها فعالیت Trypsin با افزودن FBS20-10% متوقف گردید. سوسپانسیون سلولی با مش نایلون ۷۰ میکرو (FALCON, USA) صاف شد. تمام مواد مورد استفاده از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شد.

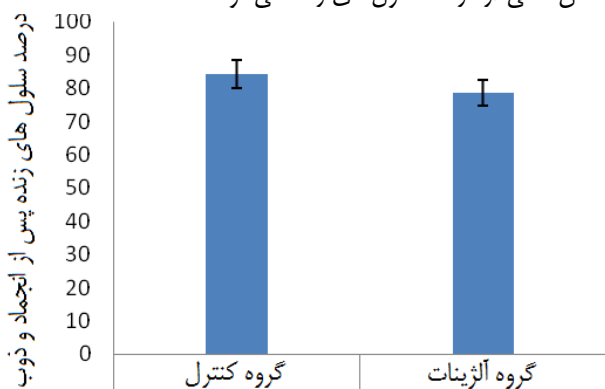
از آنجایی که سلول های بنیادی اسپرماتوگونی  $Thy-1^+$  و  $C-kit^-$  هستند، جهت جداسازی آنها از تکنیک MACS و از میکروبیدهای متصل به آنتی بادی  $Thy-1$  (Miltenyi Biotec, Germany) استفاده گردید و از این طریق ناخالصی های باقیمانده از جمله سلول های سرتولی جدا شدند. تکنیک MACS مطابق با روش Oatley و Brinster انجام گرفت (۱۷). به این ترتیب که  $10^7$  سلول برای انجام آزمایش شمارش گردید و سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شد. پلاک سلولی در ۹۰ میکرو لیتر بافر حل شد و سپس ۱۰ میکرو لیتر از میکروبیدهای  $Thy-1$  اضافه شد. با پیپتینگ ملایم سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگه داشته شدند (دمای ۸-۲ درجه). سلول ها سانتریفیوژ شدند و دوباره در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حل شدند و جداسازی با مگنت انجام شد. به این صورت که ستون (Miltenyi Biotec, Germany) MACS در میدان

جدول ۱- ویژگی پرایمرهای ژن های مورد بررسی توسط Real-Time PCR

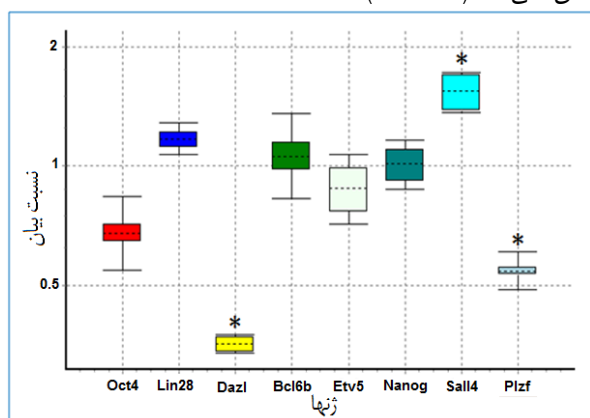
Genes	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
Sall4	F: TCAAGGCCAAGGACGAAGTC R: TGTGGGAGCGAAGGTGAATC	102
Nanog	F: GGAGGACTTCTGCGACCCCTT R: ACCTGGTGGAGTCACAGAGT	154
Etv5	F: GTCGATAAGGCTGAGTCGGG R: AGGAAGGCCAAAGAGGAACG	163
Bcl6b	F: GGAAACACAGAAGGGAGGG R: CAAGCCAAAGGAGAGGCCA	71
Dazl	F: CTGTCCAGGATTGCTCCCTGG R: AGGTAGCAAGGTGCTGTTC	103
Lin28a	F: CTGTCCAGGATGGGAACAT R: GTGAGGTAGGTTTGTGGCGA	196
GAPDH	F: CAATGTGTCCTCGTGGATCT	208



نمودار ۱- مقایسه درصد سلول های زنده گروه کنترل و گروه سلول های انکپسوله شده در آلزینات پس از انجماد با گروه سلول های تازه جدا شده (Mean±SE)  
انجماد و ذوب سلول ها با آلزینات و بدون آلزینات (گروه کنترل) باعث کاهش معنی دار درصد سلول های زنده می شود.



نمودار ۲- مقایسه درصد سلول های زنده انکپسوله شده در آلزینات پس از انجماد با گروه کنترل بدون آلزینات (Mean±SE)  
درصد سلول های زنده در گروه آلزینات تغییر معنی داری از نظر آماری نشان نمی دهد (P=۰/۳۶۴).



نمودار ۳- بیان نسبی ژن ها در SSCs انکپسوله شده در آلزینات پس از انجماد در مقایسه با گروه کنترل بدون آلزینات

	R: GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG	
Plzf	F: ACATGGCTGTCTTCTGTCTG	174
	R: GGTGGTCACCTGTATGTGAG	
Pou5f1	F: GGATGGCATACTGTGGAC	233
(Oct4)	R: CTTGGCAAACCTGTTCTAGC	

برای ارزیابی بیان رونوشت های ژن های موردنظر در سلول های گروه های تجربی و مقایسه با ژن های سلول های گروه های کنترل، از روش RealTime-PCR استفاده شد. نوع سنجش موردنظر با دستگاه RealTime-PCR از نوع Non specific format و استفاده از SYBER Green بود. کلیه واکنش های RealTime-PCR برای بررسی بیان ژن ها به وسیله دستگاه Rotor.Gene 6000 (corbett) انجام گرفت. از Master mix کیت qPCR GreenMaster with lowROX شرکت Jena Bioscience کشور آلمان استفاده گردید؛ در نهایت با استفاده از روش RT-Real-Time PCR بیان ژن های Sall4 و Nanog, Evt5, Bcl6b, Plzf, Dazl, Lin28, Oct4 بررسی گردید.

تفاوت های آماری میان درصد سلول های زنده پس از انجماد/ذوب سلول های بنیادی اسپرماتوگونی توسط نرم افزار آماری SPSS توسط one-way ANOVA آنالیز شدند و به صورت میانگین های  $SEM \pm$  ارائه گردیده است. از P value به میزان کمتر یا مساوی با ۰/۰۵ به عنوان معنی دار بودن آماری استفاده شد. داده های Real Time-PCR با استفاده از نرم افزار Rest 2009 تجزیه و تحلیل گردید و جداول و نمودارها توسط همین نرم افزار ارائه شدند.

### نتایج

درصد سلول های زنده پس از جداسازی در گروه سلول های تازه (بدون انجماد و ذوب)  $96/90 \pm 0/52$ ، در گروه انجماد بدون آلزینات (کنترل)  $84/37 \pm 1/52$  و در گروه انجماد سلول های انکپسوله در آلزینات  $78/58 \pm 2/07$  می باشد.

همان طور که نمودار ۱ نشان می دهد، فرآیند انجماد سلول ها که به روش انکپسوله سازی در آلزینات و همین طور بدون آلزینات انجام شد در مقایسه با گروه سلول های تازه جدا شده (بدون انجماد و ذوب) باعث کاهش درصد سلول های زنده می شود؛ که این کاهش از نظر آماری در گروه کنترل ( $P=0/002$ ) و در گروه آلزیناتی ( $P<0/0001$ ) معنی دار است (نمودار ۱).

درصد سلول های زنده پس از انجماد و ذوب در گروه سلول های انکپسوله در آلزینات ( $78/58 \pm 2/07$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $84/37 \pm 1/52$ ) کاهش یافته است، اما این کاهش از نظر آماری معنی دار نیست ( $P=0/364$ ) (نمودار ۲).

کاهش دهد و هم احتمال آلودگی را افزایش دهد؛ بنابراین استفاده از یک روش ساده و امکان پذیر جهت هضم برای آماده سازی رضایت بخش سوسپانسیون سلولی لازم است. در مطالعه حاضر برای جداسازی اسپرماتوگونی ها، اول لوله های منی ساز موش ۶ روزه به روش مکانیکی از هم شکافته و جدا شدند. این مرحله اساس کار برای جداسازی است تا مراحل بعدی بهتر انجام شود. سپس از هضم آنزیمی دو مرحله ای به منظور جداسازی بیشتر استفاده شد.

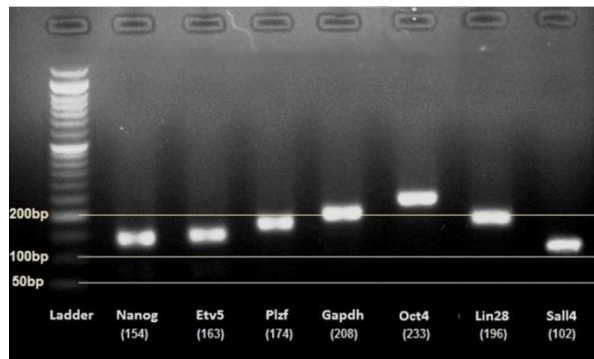
لیو و همکاران از روش هضم آنزیمی دو مرحله ای برای جداسازی سلول های بافت بیضه انسانی استفاده کردند و آن را به عنوان یک روش ساده که با کاهش میزان آلودگی و افزایش تعداد سلول های زنده همراه است معرفی کردند (۲۳). در مطالعه حاضر از سه آنزیم کلاژناز، تریپسین و DNase جهت هضم نمونه بافت بیضه استفاده شد. استفاده از کلاژناز موجب هضم غشاء پایه و حذف شدن سلول های بینابینی بدون قطعه قطعه شدن لوله های منی ساز می شود. سپس لوله ها با استفاده از DNase از هم باز می شوند. این روش موجب آسیب کمتر سلولی می شود و به دنبال هضم مکانیکی مؤثر در اکثر آزمایشگاه ها استفاده می شود (۲۴). تریپسین یک پروتئاز سرینی است که در سیستم گوارش تعداد زیادی از مهره داران وجود دارد و عمل هیدرولیز پروتئین ها را انجام می دهد (۲۵).

در مطالعه ای که لیو و همکاران انجام دادند درصد سلول های زنده پس از دو مرحله هضم آنزیمی ۹۱/۷٪ گزارش شده است (۲۳). این نتیجه مشابه نتایج حاصل از مطالعه هی و جانگ بود که از چهار آنزیم کلاژناز، تریپسین، DNase و هیالورونیداز جهت هضم نمونه بافت بیضه انسانی استفاده کرده بودند (۲۵ و ۲۶). در مطالعه ای که کروچی و همکاران انجام دادند پس از دو مرحله هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم های فوق درصد سلول های زنده در نمونه انسانی ۹۲٪ گزارش شد (۲۷). در مطالعه هی و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان زنده ماندن سلول ها پس از هضم آنزیمی و اجرای روش MACS را ۹۶ درصد گزارش کردند (۲۸). در مطالعه حاضر درصد سلول های زنده پس از جداسازی ۹۶٪ بود که با مطالعات قبلی انجام شده همخوانی دارد.

هضم آنزیمی امروزه یک روش متداول و اولیه برای جداسازی SSCs است ولی برای غنی سازی کافی نیست. از آنجایی که ترکیبات سلول های سوماتیک بیضه می تواند سلول را به سمت تمایز پیش برد و از طرف دیگر تکثیر اسپرماتوگونی تمایز نیافته، به وسیله سلول های تمایز یافته مهار می شود (۲۹). در مطالعه حاضر نیز انتخاب و خلص سازی سلول های SSCs از سوسپانسیون سلولی به دست آمده انجام شد.

کنراد و همکاران در ۲۰۰۸ با استفاده از تکنیک MACS و نشانگرهای Thyl1 و α6-integrin سلول های بیضه انسان را

بیان ژن های Dazl و Plzf کاهش معنی دار و بیان ژن Sall4 افزایش معنی داری را نشان می دهند و بیان ژن های Oct4, Lin28, Bcl6b, Etv5 و Nanog تغییر معنی داری را نشان نمی دهند.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات Real time-PCR

همان طور که در نمودار ۳ آمده است، با اینکه در بیان ژن های Oct4, Etv5, Bcl6b, Nanog و Plzf در سلول های بنیادی اسپرماتوگونی انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات در مقایسه با گروه کنترل (سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بدون آلژینات) تغییر معنی داری ایجاد نشده است، اما بیان ژن های Sall4 و Lin28 فرا-تنظیم (Up-regulation) شده و Dazl تنها ژنی است که بیان آن در مقایسه با گروه کنترل فرو-تنظیم (Down-regulation) شده است.

## بحث

شیمی درمانی و پرتودرمانی بیماران بالغ و کودکان درمان شده آن ها را با خطر محدودیت های مادام العمری در باروری روبرو می سازد (۱۹). ۳۰٪ درمان بدخیمی های دوران کودکی بر باروری تأثیر دارند و شیوع ناباروری درمان زاد در میان بزرگسالان بازمانده از سرطان کودکی قابل توجه است (۲۰). تامسون همکاران در یک مطالعه گزارش کردند که ۳۰٪ (۱۰ نفر از ۳۳ بیمار) از پسرهایی که از بیماری سرطان نجات یافتند، در زمان بلوغ دچار آرواسپرمی شدند. به علاوه در گروهی که آرواسپرم محسوب نشده بودند نیز غلظت اسپرم به میزان زیادی نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می داد (۲۱).

اولین مرحله کار با SSCs، جداسازی آن ها است. تعداد کم SSCs در بیضه و نبود نشانگر منحصر به فرد، باعث ممانعت از گسترش مطالعه در این زمینه بوده است. در این مطالعه برای جداسازی SSCs از نوزاد موش ۶ روزه استفاده شده است، چرا که یکی از ساده ترین روش های تهیه SSCs با خلوص بالا استفاده از بیضه های نوزاد است (۲۲). سلول های بیضه ای گرفته شده از بافت بیضه ای نوزاد موش ۶ تا ۱۰ روزه دارای نسبت بالاتری از SSCs هستند و برای کشت مناسب تر هستند در مقایسه با بیضه موش بالغ (۹). استفاده از روش های هضم پیچیده، چند مرحله ای و وقت گیر می تواند هم زنده بودن سلول ها را

سلول‌های زایای پس از تولد قابل‌مقایسه با سلول‌های ES نیست. پیسکی و همکاران با روش ایمونوهیستوشیمی، پروتئین Oct4 در اسپرماتوگونی‌های موش را ۷ روز پس از تولد نشان دادند اما در حیوانات بالغ تنها یک زیرمجموعه از اسپرماتوگونی‌ها (نوع A) مثبت بودند (۳۹). جنین‌های هموزیگوت Pou5f1-null در زمان لانه‌گزینی می‌میرند، بنابراین مانع از تجزیه و تحلیل‌های بیشتر عملکرد ژن طی تکوین اسپرماتوگونیال پس از تولد می‌شوند. شینوها را نشان داد که ژن پلوری پوتنسی Oct4 در SSC‌های کشت‌شده در سطح پایینی بیان می‌شود (۴۰). بواس و همکاران هم-بیانی Oct4 و Plzf (مارکر اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته) را در بیضه‌های موش بالغ نشان دادند (۴۱).

از کار انداختن Bcl6b به‌واسطه siRNA در SSC‌ها باعث ارتقاء آپوپتوز می‌شود، بدین‌صورت که فقدان Bcl6b ژن‌های مرتبط با آپوپتوز را فرا-تنظیم می‌کند که این واقیعت، Bcl6b را به‌عنوان یک عامل حیاتی موردنیاز برای رشد *in vitro* سلول‌های زایا حمایت می‌کند (۴۲). موش‌های Bcl6b null اسپرماتوژنر معیوبی را نشان می‌دهند.

Etv5 از دیگر عوامل رونویسی است که نقش مهمی در بقای SSCs دارد. در موش‌هایی که Etv5 دچار جهش شده است میزان SSCs کاهش پیش‌رونده‌ای را نشان می‌دهد که در نهایت منجر به سندرم سرتولی می‌گردد (۴۳ و ۴۴). Etv5 برای خود-نوزایی SSC هم در شرایط *in vitro* و هم *in vivo* ضروری است و در نگهداری مخزن SSC نقش دارد (۴۵).

Dazl یک پروتئین باند شونده به RNA را تولید می‌کند که برای تکوین یافتن سلول‌های زایای اولیه و تولیدمثل هر دو جنس ضروری است (۴۶). فقدان بیان Dazl باعث آپوپتوز سلول‌های زایای می‌شود. در موش‌هایی که دارای جهش در این ژن هستند لوله‌های منی‌ساز حاوی اسپرماتوگونی و تعداد کمی اسپرماتوسیت‌های پاک‌تن می‌باشند. اسپرماتوگونی‌های مشاهده شده از نوع تمایز نیافته می‌باشند (۴۷). در بیشتر مطالعات انجام‌شده عملکرد Dazl را به‌عنوان یک تقویت‌کننده ترجمه‌ای نشان داده‌اند. چن و همکاران در ۲۰۱۴ شبکه‌ای از پروتئین‌ها و mRNA‌های تعامل‌کننده Dazl را شناسایی کردند که نقش مرکزی را در کنترل پلوری پوتنسی، تمایز و آپوپتوز ایفاء می‌کند. آنها همچنین نشان دادند که Dazl آپوپتوز را در PGC‌های در حال تکوین سرکوب می‌کند (۴۸).

ژن Sall4 که برای حفظ پلوری پوتنسی در سلول‌های بنیادی جنینی مهم است، از اهداف mRNA‌های Dazl بوده و دارای موتیف باند شونده به Dazl در 3' UTRs خود در رونوشت‌های موش و انسان است. Dazl اثر مهاری بر بیان ژن Sall4 دارد. در مقابل، OCT4،

خالص‌سازی نمودند (۳۰). شینوها را در سال ۲۰۰۰ از روش MACS با استفاده از نشانگرهای فوق‌جدا سازی SSCs را انجام دادند و MACS را بهتر از FACS دانسته است (۳۱). کوبوتا و همکاران در سال ۲۰۰۳ از نشانگرهای MHC-1، Thy-1 و c-kit برای خالص‌سازی استفاده کردند. آنها همچنین اعلام کردند که Thy-1 مارکر اختصاصی در موش است (۳۲ و ۳۳). کوبوتا و همکاران به‌وضوح نشان داده‌اند که SSCs توسط فنوتیپ سطحی c-kit<sup>-</sup> و Thy-1<sup>+</sup> شناخته می‌شوند؛ بنابراین در مطالعه حاضر خالص‌سازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با استفاده از روش MACS و نشانگرهای Thy-1 و c-kit انجام گرفت. سلول‌های جدا شده از نظر اندازه، شکل، نسبت هسته به سیتوپلاسم و مورفولوژی هسته مشابه هم بودند. این مورد را استونبرگ نیز گزارش کرده بود (۳۴).

در سال ۱۹۹۹ پژوهشگران متعددی از جمله اوگاوا و دوربینسکی با استفاده از دی متیل سولفوکساید ۱۰٪ موفق به انجماد سلول‌های زایا شدند و همچنین آن‌ها بقای سلول‌های ذوب‌شده را بعد از انجماد ۷۰٪ گزارش نمودند (۳۵ و ۳۶). در این مطالعه درصد سلول‌های زنده در گروه انجماد بدون آلزینات (کنترل) ۸۴٪ و در گروه انجماد سلول‌های انکپسوله در آلزینات ۷۸٪ است (نمودار ۲).

نتایج بررسی بیان ژن‌های Oct4، Bcl6b، Etv5، Nanog و Plzf در این مطالعه که با استفاده از روش Real-Time PCR انجام گرفت حاکی از بیان این ژن‌ها در SSCs است. علاوه بر این، انکپسوله کردن SSCs در هیدروژل آلزینات و انجماد-ذوب آن‌ها تغییر معنی‌داری را در بیان این ژن‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرده است. در مقابل، بیان ژن‌های Lin28 و Sall4 در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی که در هیدروژل آلزینات انجماد و ذوب شدند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌اند و Dazl تنها ژنی است که بیان آن در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌دار کاهش یافته است (نمودار ۳).

وظیفه رده زایا انتقال اطلاعات ژنتیکی و اپی ژنتیکی لازم برای جنین‌زایی است، امکان اینکه سلول‌های زایای پس از تولد می‌توانند مستعد پلوری پوتنسی باشند را مطرح می‌کند. داده‌های حمایت‌کننده این فرضیه توسط گروه‌های متعددی منتشر شده که به‌طور برجسته‌ای توسط شینوها در ۲۰۰۴ ارائه شده‌اند (۳۷). برحسب بیان ژن و ساختار کروماتین، SSCها خصوصیات مشترکی با سلول‌های بنیادی پلوری پوتنت دارند (۳۸). یک سؤال اساسی در بیولوژی سلول بنیادی این است که چه عواملی برای تعیین Stemness در رده‌های مختلف بافتی وجود دارند. در زیر به ژن‌های بررسی‌شده در این مطالعه و اهمیت و ارتباط آن‌ها با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اشاره می‌شود؛

مطالعات با روش‌های ایمونولوژیکی و سیستم‌های گزارشگر ژنتیکی، بیان Oct4 را در بیضه پس از تولد نشان داده‌اند گرچه سطح آن در

5. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:864.
6. Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol* 2010;116:1171-83. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181f87c4b
7. Van Casteren N, van Santbrink E, Van Inzen W, Romijn JC, Dohle GR. Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. *Fertil Steril* 2008;90:2245-50. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.055
8. Sabanegh ES, Ragheb AM. Male fertility after cancer. *Urology* 2009;73:225-31. doi: 10.1016/j.urology.2008.08.474
9. Gouk SS, Loh YF, Kumar SD, Watson PF, Kuleshova LL. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertil Steril* 2011;95:2399-403. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.035
10. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:2500-10. doi: 10.1200/JCO.2013.49.2678
11. Ginsberg JP, Carlson CA, Lin K, Hobbie WL, Wigo E, Wu X, et al. An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety. *Hum Reprod* 2010;25:37-41. doi: 10.1093/humrep/dep371
12. Lin N, Lin J, Bo L, Weidong P, Chen S, Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010;43:427-34. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00692.x
13. Pravyduk AI, Petrenko YA, Fuller BJ, Petrenko AY. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. *Cryobiology* 2013;66:215-22. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.02.002
14. Tomkoria S, Masuda K, Mao J. Nanomechanical properties of alginate-recovered chondrocyte matrices for cartilage regeneration. *Proc Inst Mech Eng H* 2007;221:467-73.
15. Aoki T, Koizumi T, Kobayashi Y, Yasuda D, Izumida Y, Jin Z, et al. A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation. *Cell Transplant* 2005;14:609-20.
16. Milazzo J, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum Reprod* 2008;23:17-28. doi: 10.1093/humrep/dem355
17. Oatley JM, Brinster RL. [11]-Spermatogonial Stem Cells. *Methods in Enzymology* 2006;419:259-82. doi: 10.1016/S0076-6879(06)19011-4
18. van Waas M, Neggers SJ, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. Components of the metabolic syndrome in 500 adult long-term survivors of childhood cancer. *Ann Oncol* 2010;21:1121-6. doi: 10.1093/annonc/mdp414
19. Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, et al. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 2010;28:332-9. doi: 10.1200/JCO.2009.24.9037
20. Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DS, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WHB. Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* 2002;360:361-7.
21. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 2003;69:612-6. doi: 10.1095/biolreprod.103.017012
22. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:141. doi: 10.1186/1477-7827-9-141

دیگر ژن کلیدی پلوری پوتنسی، هدف mRNA ی Dazl نیست (۴۹). هوبز و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که SALL4 و PLZF اثر آنتاگونیست بر روی هم دارند و با این عملکرد سرنوشت سلول بنیادی را کنترل می‌کنند. و با این عمل متقابل آنتاگونیستی باعث هم-تنظیمی Kit (co-regulation) می‌شوند. به طوری که کاهش سطوح Sall4 باعث افزایش بیان Plzf شده که این به نوبه خود باعث تقویت مهار Kit می‌شود (۵۰).

نتایج این مطالعه نیز مؤید این مطلب است؛ به طوری که فرو تنظیم بیان ژن Dazl در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات، باعث کاهش اثر مهاری آن بر بیان ژن Sall4 شده است و در نتیجه Sall4 فرا-تنظیم شده است.

Lin28 را به‌عنوان ژنی که به‌طور متمایزی در اسپرماتوگونی‌های موش بیان می‌شود می‌شناسیم. Lin28 به‌طور غالبی در اسپرماتوگونی‌های نوع A بیان می‌شود (۵۱). یو و همکاران در ۲۰۰۷ از LIN28 به همراه OCT4، SOX2 و NANOG برای برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک انسانی به سلول‌های بنیادی پلوری پوتنت استفاده کردند (۵۲). ژنگ و همکاران در ۲۰۰۹ نشان دادند که Lin28، یک عامل پلوری پوتنسی است که به‌طور اختصاصی در اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته بیان می‌شود و می‌تواند در حفظ حالت تمایز نیافتگی در اسپرماتوگونی‌ها نقش بازی کند (۵۳).

استفاده از هیدروژل آلژینات به‌عنوان یک داربست در حفاظت سرمایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌تواند در جهت حفظ پتانسیل بنیادی این سلول‌ها مؤثر باشد. تعداد سلول‌های زنده پس از حفاظت سرمایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری ندارد. همچنین تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های سنجش شده نشان می‌دهد که استفاده از داربست آلژیناتی به فرم انکپسوله‌سازی باعث حفظ پتانسیل بنیادی SSCs طی نگهداری طولانی‌مدت آنها می‌شود. با بررسی‌های بیشتر در انسان این روش شاید کمکی در جهت حفظ توان تولیدمثلی پسران نابالغ مبتلا به سرطان در طی روند درمان باشد.

## References

1. Yang L, Wu W, Qi H. Gene expression profiling revealed specific spermatogonial stem cell genes in mouse. *Genesis* 2013;51:83-96. doi: 10.1002/dvg.22358
2. Tagelensbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 1993;290:193-200.
3. Shalet SM, Tsatsoulis A, Whitehead E, Read G. Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J Endocrinol* 1989;120:161-5.
4. Ginsberg JP. New advances in fertility preservation for pediatric cancer patients. *Curr Opin Pediatr* 2011;23:9-13. doi: 10.1097/MOP.0b013e3283420fb6

23. Izadyar F, Creemers LB, van Dissel-Emiliani FM, van Pelt AM, de Rooij DG. Spermatogonial stem cell transplantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000;169:21-6. doi: 10.1016/S0303-7207(00)00346-4
24. Riboldi M, Rubio C, Pellicer A, Gil-Salom M, Simón C. In vitro production of haploid cells after coculture of CD49f+ with Sertoli cells from testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermic patients. *Fertil Steril* 2012;98:580-90. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.039
25. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 2010;82:363-72. doi: 10.1095/biolreprod.109.078550
26. Gang B, Yanfeng L. Isolation and purification of human spermatogenous cells. *Acta Acad Med Militaris Tertiae* 2005;27:1142-4.
27. Koruji M, Shahverdi A, Janan A, Piryaei A, Lakpour MR, Sedighi MAG. Proliferation of small number of human spermatogonial stem cells obtained from azoospermic patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2012;29:957-67. doi: 10.1007/s10815-012-9817-8
28. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Zeng W, Dobrinski I, Dym M. Isolation of human male germ-line stem cells using enzymatic digestion and magnetic-activated cell sorting. *Methods Mol Biol* 2012;825:45-57. doi: 10.1007/978-1-61779-436-0\_4
29. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Morimoto H, Takashima S, et al. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *J Reprod Dev* 2010;56:145-53.
30. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008;456:344-9.
31. Shinohara T, Brinster RL. Enrichment and transplantation of spermatogonial stem cells. *Int J Androl* 2000;23:89-91.
32. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6487-92. doi: 10.1073/pnas.0631767100
33. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004;71:722-31. doi: 10.1095/biolreprod.104.029207
- function and testicular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1120:144-51. doi: 10.1196/annals.1411.005
34. Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, et al. Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. *J Androl* 2008;29:312-29. doi: 10.2164/jandrol.107.002857
35. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 1999;60:515-21.
36. Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod Dev* 1999;53:142-8. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<142::AID-MRD3>3.0.CO;2-O
37. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004;119:1001-12. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.011
38. Seandel M, Falciatori I, Rafii S. Pluripotent stem cells from the postnatal testis: unlocking the potential of spermatogonial stem cells. *Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential*: Springer; 2011.p.25-47.
39. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler HR. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mechanisms of Development* 1998;71:89-98. doi: 10.1016/S0925-4773(98)00002-1
40. Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, et al. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod* 2008;78:681-7. doi: 10.1095/biolreprod.107.066068
41. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2004;36:647-52. doi: 10.1038/ng1366
42. Hartatik T, Okada S, Okabe S, Arima M, Hatano M, Tokuhisa T. Binding of BAZF and Bc16 to STAT6-binding DNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:26-32. doi: 10.1006/bbrc.2001.4931
43. Morrow CM, Hostetler CE, Griswold MD, Hofmann MC, Murphy KM, Cooke PS, et al. ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood–testes barrier
44. Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem* 2007;282:25842-51. doi: 10.1074/jbc.M703474200
45. Wu X, Oatley JM, Oatley MJ, Kaucher AV, Avarbock MR, Brinster RL. The POU domain transcription factor POU3F1 is an important intrinsic regulator of GDNF-induced survival and self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2010;82:1103-11. doi: 10.1095/biolreprod.109.083097
46. Lin Y, Page DC. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Dev Biol* 2005;288:309-16. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.06.032
47. Schrans-Stassen BH, Saunders PT, Cooke HJ, de Rooij DG. Nature of the spermatogenic arrest in Dazl<sup>-/-</sup> mice. *Biol Reprod* 2001;65:771-6.
48. Chen H-H, Welling M, Bloch DB, Muñoz J, Mientjes E, Chen X, et al. DAZL limits pluripotency, differentiation, and apoptosis in developing primordial germ cells. *Stem Cell Reports* 2014;3:892-904. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.09.003
49. Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2005;25:6031-46. doi: 10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005
50. Wang PJ, Page DC, McCarrey JR. Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet* 2005;14:2911-8. doi: 10.1093/hmg/ddi322
51. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20. doi: 10.1126/science.1151526
52. Zheng K, Wu X, Kaestner KH, Wang PJ. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol* 2009;9:38. doi: 10.1186/1471-213X-9-38





## Study Effect of Encapsulation of Spermatogonial Stem Cells in Alginate Hydrogel During Cryopreservation

Afshin Pirnia (Ph.D.)<sup>1</sup>, Kazem Parivar (Ph.D.)<sup>1</sup>, Parichehr Yaghmaei (Ph.D.)<sup>1</sup>, Massoud Hemadi (Ph.D.)<sup>2</sup>,  
Mohammadreza Gholami (Ph.D.)<sup>3\*</sup>

1- Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Fertility and Infertility Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3- Dept. of Anatomical Sciences, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Received: 10 September 2016, Accepted: 18 October 2016

### Abstract:

**Introduction:** Spermatogonial stem cells (SSCs) are the foundation of spermatogenesis. Cancer treatments such as chemotherapy or radiotherapy by targeting of these high proliferating cells can cause infertility. In pubertal male patients, cryopreservation of spermatozoa before chemotherapy is the way for fertility preservation during treatment. However, for prepubertal male patients, because of the absence of spermatozooids, this is not possible. The aim of this study is the investigation of the effect of alginate hydrogel in reduction of cryopreservation effects on SSCs potential and preserve of these cells in cancer childhoods that undergoes chemotherapy or radiotherapy.

**Methods:** SSCs were isolated from the testes of Balb/c mice pups (6 days old), purified by MACS with Thy-1 and c-kit microbeads, encapsulated in alginate hydrogel and then cryopreserved. After thawing, cell viability was evaluated. After RNA was isolated and cDNA was synthesized, the expression of stemness genes Oct4, Sall4, Plzf, Dazl, Etv5, Bcl6b, Lin28, and Nanog was considered using RT Real-time PCR. Statistical analyses were performed using SPSS. Gene expression was analyzed with REST software.

**Results:** Cell viability after cryopreservation show no significant decrease in alginate encapsulated cells group compared to control group. Lin28 and Sall4 genes were significantly upregulated ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ ), whereas Dazl was upregulated ( $P < 0.0001$ ) after SSCs cryopreservation in alginate hydrogel.

**Conclusion:** This study indicates that use of alginate as scaffold in SSCs cryopreservation can be effective for stemness preservation of these cells.

**Keywords:** Spermatogonial Stem Cells, Cryopreservation, Alginate.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: M.R. Gholami, Email: rezagholami57@gmail.com

**Citation:** Pirnia A, Parivar K, Yaghmaei P, Hemadi M, Gholami MR. Study effect of encapsulation of spermatogonial stem cells in alginate hydrogel during cryopreservation. Journal of Knowledge & Health 2017;11(4):39-47.