میکروسیال ها و ارتقا بستر کشت سلول: ارزیابی کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در تراشه های میکروفلوئیدیک

سحر نعیمی[۱]، عبدالمحمد کجباف زاده،[۲] اکرم عیدی[۳]*، رمضان خان بابایی[٤]، هومن صدری اردکانی[٥]

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی زمینه درمان ناباروری مردان می باشد، زیرا درمان ناباروری در گروه بیماران سرطانی که تحت درمان با داروهای گنادوتوکسیک قرار می گیرند، حائز اهمیت می باشد. هدف اصلی مطالعه صورت گرفته، مقایسه دو گروه متفاوت از روش های کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونیو بررسی میزان قدرت تمایز و تکثیر این سلول ها می باشد. پیوند موفق سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) در بررسی‌هایآزمایشگاهی نیازمند بستر کشت مناسب برای تکثیر و تمایز این سلول‌ها می‌باشد. ماتریکس خارج سلولی طبیعی ریز محیط مناسبی را برای کشت سلول‌های بنیادی فراهم می‌آورد. در بررسی حاضر، ما در صدد بودیم تا قابلیتتکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را در شرایط استفاده از سیستم میکروفلوئیدیک(ex vivo) مورد ارزیابی قرار دهیم. از سویی در این مطالعه نتایج حاصله را با شرایط کشت در پلیت های آزمایشگاهی متداول(in vitro) برای قابلیت تولید و گسترش SSCs مورد مقایسه قرار دادیم. در ابتدا سلول های بنیادی اسپرماتوگونی از موش های نوزاد را جداسازی کرده و در کشت in-vitroسلول هایجداسازی شده را در پلیت های کشت بر روی داربست متشکل از هیالورونیک اسید، کیتوزان و بافت آسلولار شده بیضه کشت داده و در بررسی ex-vivo سلول های بنیادی اسپرماتوگونیال استخراج شده را در سیستم میکروفلوئیدیک بدون حضور داربست کشت میدهیم. در بررسی ex vivo، از موش‌های نر نوزاد نژاد NMRI سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی استخراج گردید.در ادامه سلول های استخراج گردیده در چیپ میکروفلوئیدیک طراحی شده فاقد پمپ خارجی منتقل گردیده اند و پس از مدت یک ماه روند کشت مذکور را با ارزیابیIHC مورد مقایسه و مطالعه قرار داده شد. در نمونه های مورد مطالعه استقرار سلول ها در لومن منی ساز، رنگ آمیزی DAPI و ایمونوهیستوشیمی ارزیابی گردیده اند. نتیجه بررسی های ایمونوهیستوشیمی نشان دهنده ی افزایش معنی دار بیان مارکرهایPLZF و TEKT1 در مدل های ex-vivoبوده است(P<0.05). در نهایت، نتایج حاصله نشان داد که قابلیت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در القا اسپرماتوژنز و تولید سلول های هاپلوئید در شرایط کشت بافت بیضه در سیستم میکروفلوئیدیکاختلاف معنی دار در مقایسه باشرایطکشت متداول در پلیت های آزمایشگاهی برای سلول های مذکور دارد. در نهایت سیستم میکروفلوئیدیک قادر است بستر حمایتی برای تکثیر و تمایز SSC ها فراهم آورد. به علاوه، تکثیر و تمایز این سلول‌ها در شرایط ex vivoمی‌تواند شرایطی موثر برای درمان آزواسپرمی فراهم آورد.

واژگان کلیدی: سلول های بنیادی اسپرماتوگونی- سیستم میکروفلوئیدیک- داربست- PLZF- TEKT1- TP1

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/٤/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۱/۱٦

مقدمه

در چند دهه گذشته، با پیشرفت در درمان های ضد سرطان مختص اطفال، تعداد بهبود یافتگان به طرز چشمگیری افزایشیافته است. از سوییحفظ باروری به ویژه در گروه بیماران جوان در حال تبدیل شدن به یک زمینه تحقیقاتی است. این روش های کمک باروری برایافرادی که منتخب درمان های گنادوتوکسیک می باشند و به علاوه در اختلالاتی مانند سرطان، لوپوس اریتماتوز سیستمیک، کم خونی سلول داسی شکل، کم خونی فانکونی ، مولتیپلاسکلروزیس و بیماری های کلیویحائز اهمیت می باشد. علاوه بر این، بیماران بااختلالاتی که می تواند باعث تداخل در اسپرماتوژنز شود، مانند cryptorichidismیا سندرم Klinefelter، داوطلبانی برای حفظ یا بازیابی باروری هستند.علیرغم آن که انجماد مایع منی برای بیماران مرد در سنین پس از بلوغیک روش اثبات شده است ، نمی توان از آن روش برای بیماران پسر در سنین قبل از بلوغ استفاده کرد. بنابراین،

۱. دانش آموخته دکتری تخصصی گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲.استاد اورولوژی اطفال و پزشکی بازساختی، پژوهشکده ژن، سلول و بافت، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
*۳.استاد گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران(eidi@srbiau.ac.ir)
٤.استادیار گروه زیست شناسی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران
٥.دانشیار، دانشکده پزشکی ویک فورست، امریکا.

بیماران سرطانیدر دوران کودکینیاز دارند تا از تکنیک های حفظ باروری بهره مند شوند. القایاسپرماتوژنز در شرایط آزمایشگاهی (invitro)از سلولهای زایا، می تواند روشی موثر برای حل این مسئله باشد(۱, ۲).

بیضه عضوی است که وظیفه تولید گامتهای مردانه و هورمونهای جنسی مردانه (آندروژن ها) را دارد. اسپرماتوژنز روندی است که مسئولیت تولید گامت را دارد، در حالی که استروئیدوژنز هورمون های استروئیدی مردانه را تولید میکند. اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز در بخش توبولارو بافت بینابینی بافت بیضه انجام می شود. این دو قسمت از نظر آناتومی جدا از هم هستند ولی ارتباط نزدیک با یکدیگر دارند و تولید طبیعی اسپرم به یکپارچگی آنها بستگی دارد(۳). توبولهای منی ساز حاوی اپیتلیوم اسپرم ساز است که از سلولهای زایا و دو نوع سلول سوماتیک شامل سلول های سرتولی و سلول های بین بافتی می باشند و اسپرماتوژنز در این بخش صورت می گیرد. سلول های سرتولی مسئول خود نوزایی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و هدایت این سلول های به سمت بخش لومنی توبول های منی ساز هستند(٤).

بافت بینابینی مسئولیت پشتیبانی ساختاری و تغذیه ای لوله های اسپرم ساز را بر عهده دارد، زیرا این قسمت از بافت بیضه شبکه سازمان یافته ای برای واکنش های بین سلولی و سلول با ماتریکس خارج سلولی را ایجاد می کند. شاخص ترین سلول این بخش، سلول های لیدیگ می باشند که مسئول تولید و ترشح تستوسترون و فاکتور شبه انسولینی ۳ می باشند. این بخش از بافت بیضه، نه تنها حاوی سلولهای لیدیگ است، بلکه سلولهای ایمنی، عروق خونی و لنفاوی، اعصاب، فیبروبلاست و بافت پیوندی سست نیز در این بخش قرار دارند(۵). سلول های بنیادی اسپرماتوگونی(Spermatogonial Stem Cells, SSCs) شاخص ترین سلولهای زایای اولیه مردانه در مردان بالغ هستند. این سلولها مسئول اسپرماتوژنز، تولید اسپرم و باروری مردان هستند. این سلول ها هم قابلیت خودنوزایی را برای حفظ بستر سلول های بنیادی و هم تقسیم نامتقارن سلول برای تولید اسپرم در دوران بعد از بلوغ را دارند. همانند سایر سلولهای بنیادی بافت بزرگسالان، این گروه از سلول ها نیز کمیاب هستند(۵). مشخصه کلیدی اسپرماتوژنز پستانداران تغییرات در ساختار کروماتین و جا به جایی نوکلئوپروتئین ها می باشد. در اسپرماتید های طویل و متراکم، ساختار اصلی کروماتین بازسازی می شود و در این روند هیستون ها ابتدا با transition proteins (TPs) جایگزین می شوند. پروتئین های TP1 وTP2 اصلی ترین نوع TPها در جوندگان می باشند. این نوع از TPها اختصاصا در اسپرماتید های هاپلوئیدی که در فاز پس از میوز می باشند، بیان می شوند. پروتئین TEKT در بخش تاژک، دم، بدنه و سانتریول اسپرم نقش دارند. در پستانداران پنج نوع از این گروه شامل نوع ۱ تا ۵ در بیضه و سلول های اسپرمی مشاهده می شود. علاوه بر Tnp1 و Tekt1نمی توان از نقش کلیدی Plzf در حفظ SSCs غافل گردید. بررسی نقش پروتئین های plzf، Tnp1 و Tekt1در روند اسپرماتوژنز در شرایط in-vitro بسیار حائز اهمیت می باشد(٦).

سیستم های میکروفلوئیدیک برای کشت سلول های زنده در محفظه های وابسته بر پرفیوژن، با اندازه میکرومتر برای شبیه سازی خصوصیات فیزیولوژیک و بیولوژیکی اندام ها مناسب هستند. این سیستم به نوعی طراحی شده که سلول قادر است عملکرد بافت را شبیه سازی کند. در طراحی این سیستم، دو یا چند میکروکانال و غشاهای متخلخل تعبیه می گردند، سپس سلول مورد مطالعه را می توان در این سیستم کشت داد. سیستم های میکروسیال نسبت به سایر مدل های کشت in-vitro دارای مزایایی هستند زیرا کنترل بیشتری بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، طرح ساختارهای پیچیده و استفاده از چندین ماده برای تکثیر بهتر اندام هایin-vivo فراهم می آورند(۷).

در سال ۲۰۰۸ به منظور بررسی قابلیت سیستم میکروفلوئیدیک بر باروری، حرکت اسپرم را در سیستم میکروفلوئیدیک ارزیابی نموده اند تا تقابلات اسپرم را در مایع منی و چگونگی اتصال اسپرم به ائوسیت را بررسی نمایند. وجود سرعت شتاب سیال عاملی مهم در تحرک اسپرم می باشد و در صورت عدم وجود عامل ایجاد شتاب در سیالی که اسپرم در آن مستقر می باشد، مانع از حرکت اسپرم می گردد. در نتیجه استفاده از سیستم میکروفلوئیدیک بستر مناسبی را برای حرکت اسپرم و رسیدن آن به ائوسیت را فراهم آورد. در سال ۲۰۱٦ از دستگاه

میکروفلوئیدیک (MF) برای تولید اسپرم بارور استفاده کردند، آن‌ها بافت‌های بیضه را بصورت کامل در شرایط کشت قرار دادند و به ترتیب بافت‌ها را به طور تصادفی به گروه‌های کشت در دستگاه‌هایمیکروفلوئیدیکیا ژل آگارز اختصاص دادند. برای روش MF، بافت از طریق ورودی‌های بافت به داخل محفظه بافت وارد شده است. با استفاده از سیستم میکروفلوئیدیک درمطالعه مذکور توانستند اسپرماتوژنز را برای مدت ٦ ماه حفظ نمایند(۱۸). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۷ انجام گردید، بیضه‌های موش‌های نوزاد به قطعات به اندازه حدود ۱ میلی متر مکعب برش دادند و بافت‌های برش داده شده را به منظور کشت در سیستم میکروفلوئیدیک انتقال دادند. این گروه با طراحی سیستم میکروفلوئیدیک بدون پمپ با استفاده از فشار هیدروستاتیک و ایجاد مدار مقاومت، جریان محیط را با سرعت آهسته و پیوسته ایجاد نمودند. در طی دوره ۳ ماهه کشت، نتایج نشان از حفظ اسپرماتوژنز داشته (۱۰).

از این رو، در این بررسی ما در صدد بودیم تا نقش بیان پروتئین های Tnp1،Tekt1 و Plzf را در روند کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش های نر نوزاد مورد ارزیابی قرار دهیم، و از سویی هدف مطالعه صورت گرفته بررسی و مقایسه ای بر تاثیر قدرت تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در شرایط حضور داربست هیدروژلی در مقایسه با بکارگیری سیستم میکروفلوئیدیک می باشد.

مواد و روش کار

جداسازی، کشت و تایید سلول های بنیادی اسپرماتوگونی نوزاد موش:

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی را با پروتوکل میزراپور و همکاران در سال ۲۰۱۲، تحت دو مرحله هضم آنزیمی توسط آنزیم های o.5 mg/mlتریپسین(Sigma, USA)، o.5 mg/ml کلاژناز (Sigma, USA) و o.o5 mg/ml آنزیم DNase (Sigma, USA) جدا گردیده است(۸). به طور خلاصه، بیضه چهار موش نر یک هفته ای نژاد NMRIرا به محیط حاوی DMEM/F12 منتقل و با PBS حاوی آنتی بیوتیک شستشوگردیده است. به منظور خالص سازی و حذف سلول های مازاد، SSC ها به مدت یک هفته در DMEM / F12 با ۱۰٪سرم گاوی جنین (FBS) در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ در صد CO_2 نگهداری گردیده اند. شناساییSSC های جدا شده و خالص شده با ردیابی پروتئینPLZF و رنگ آمیزیDAPI به عنوان نشانگر سلول های بنیادی در کلنی های مشتق شده از سوسپانسیون سلول بررسی گردید و نتایج بررسی ها در مقاله ای که پیشتر در سال ۲۰۲۱ منتشر گردیده است، قابل مشاهده می باشد. SSC های جدا شده به منظور بررسی قدرت تکثیر و تمایز در سیستم میکروفلوئیدیک (ex-vivo) و کشت در حضور داربست هیدروژلی (in-vitro) مورد استفاده قرار گرفتند..

تهیه داربست سه بعدی برای کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی:

بیضه های موشهای نر بالغ نژادNMRIبا ایجاد شکاف طولی و عرضی در ناحیه شکم استخراج گردید. به منظور از بین بردن خون و لخته ها، کپسول های بیضه سوراخ گردیده اند و بافت ها بلافاصله با آب مقطر (dH2O) و محلول بافر فسفات (PBS) به مدت یک ساعت شستشو داده شده اند. پس از آن، ۰,۵٪سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ۰,۵٪ (v / v) تریتونX-100 به مدت ۲ ساعت استفاده گردید. تمام فرایندهای آسلولار شدن بیضه ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده از شیکر با ۵۰ دور در دقیقه انجام گردید. به منظور شستشوی مواد شوینده از بافت های آسلولار شده،بافت ها به مدت ٢٤ ساعت با PBS شستشو داده شده اند. داربست هایآسلولار شده توسط ۰,۱٪ پراستیکترکیب شده و با ٤ درصد اتانول به مدت ۲ ساعت ضدعفونیگردیده، سپس سه مرتبهبا کوکتل آنتی بیوتیک ضد قارچ PBS استریل شسته شده اند. در ادامه، هیدروژل

هیالورونیک اسید(HA)، با ترکیب ۰,۰۲ کیتوزان رقیق شده و در ۱٪اسید پراستیک و ۲۰ میلی گرم در میلی لیترHA ساخته شده است. ترکیب هیدروژل و بافت بیضهآسلولار شده (0.4 g)با نسبت ۱: ۱ ترکیب شده اند. ترکیب حاصل به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت DMEM / F12 با مکمل ۱۰٪ FBSدر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 نگهداری گردیده اند.پس از ۷۲ ساعت، SSC ها بر روی داربست ها به مدت ۷۲ ساعت درمحیط کشت DMEM / F12 همراه با ۱۰ درصد FBSمنتقل گردیدهاند تا قدرت تمایزی و تکثیری این سلول ها را بر روی داربست هیدروژلی توسط چندین مطالعه از جمله SEM، DAPI، MTT و آکریدین نارنجی مورد بررسی قرار داده شود.داربست های حاصله در مطالعه in-vitro مورد استفاده قرار گرفتند (۹).

طراحی و ساخت دستگاه میکروفلوئِیدیک در بررسی ex-vivo

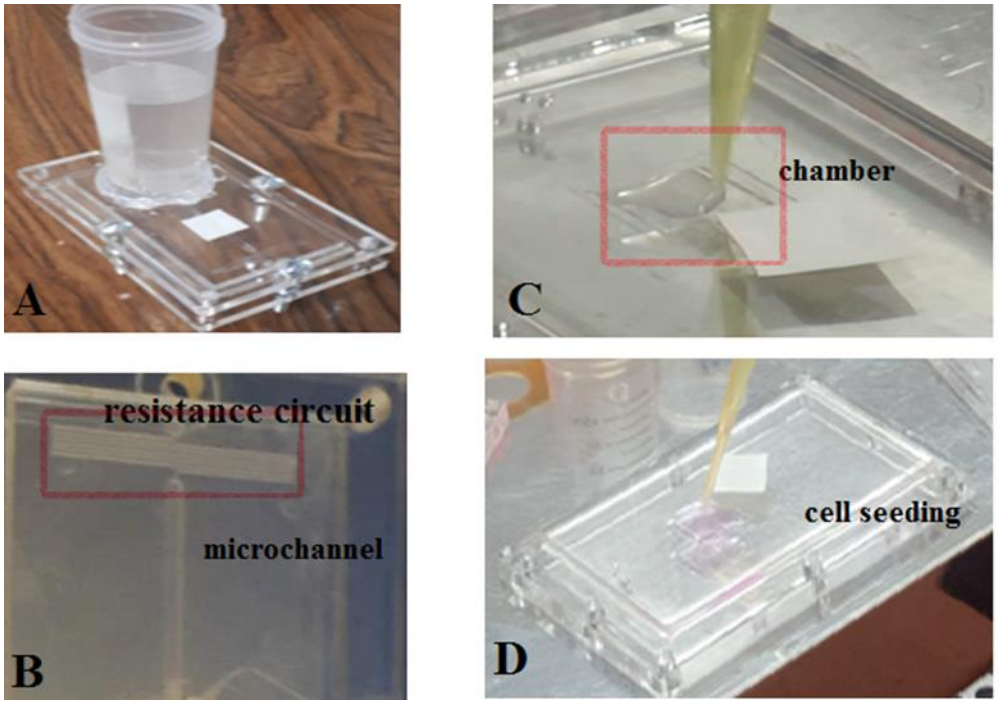
چیپ میکروفوئیدیک طراحی شده دارای دو لایه می باشد که لایه زیرین از جنس PDMS و لایه بالایی از جنس PMMA و یک غشا متخلخل نازک از جنس پلی کربنات (قطر تخلخل =۲۵ میکرون) می باشد.برای ساخت لایهزیرین از روش Soft Lithography استفاده شده. در این روش پلیمرPDMS با سختکننده (Hardener) خود با نسبت وزنی ۱:۱۰ ترکیب گردیده و بر روی قالب ریخته شد. مخزنی که برایافزودن سلول ها استفاده گردید، بر روی لایه پایینی از جنس PDMS ایجاد شده است. همچنین موقعیت قرار گیری غشا مورد نظر بر روی بافت، بر روی این لایه ایجاد شده است(۱۰).

کانال های مورد نیاز برای رساندن سیال محیط کشت از ورودی به مخزن نگهداری بافت و سپس خارج کردن آن، بر رووییک ورق از جنس PMMA به ضخامت ٤ میلیمتر با استفاده از دستگاه (CNC micro-milling (Roland – MDX-40A, Japanایجادشد.به منظور آب بند کردن چیپ مورد نظر از روش کلمپ (Clamp) استفاده کردیم.درلایه فوقانی سیستم میکروفلوئِیدیک طراحی شده، یک مدار مقاومت (resistance circuit) برای تنظیم جریان محیط کشتتعبیه گردیده است. محیط کشت درمخزن مخصوص خود از کانال resistance circuit عبور کرده و سپس از طریق منفذ خروجی از سیستم میکروفلوئیدیک خارج می گردد.همچنین با کم و زیاد کردن میزان فشار اعمالی توسط پیچ ها، میزان و سرعت انتقال سیال تنظیم گردید(نگاره ۱).

کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی داربست و سیستم میکروفلوِئیدیک

SSCهای جدا شده از موش های نوزاد نژاد NMRI، برای کشت بر روی داربست در پلیت و در سیستم میکروفلوئِیدیک مورد استفاده گردید. سپس سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی جدا شده برای مدت یک ماه درپلیت کشت سلول و محفظه تعبیه شده در سیستم میکروفلوئیدیکانتقال یافتند. تعویض محیط کشت به طور متوسط هفته اییک بار انجام گردید. سیستم میکروفلوئیدیک در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 و دمای ۳٤ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. محیط کشت مورد استفاده برای کشت DMEM / F12 بوده است که با ۱۰٪ FBS، GDNF و اسید رتینوئیک (RA) همراه بود.سرانجام، قابلیت تکثیر و تمایزSSCهامورد بررسی قرار گرفتند.

س



نگاره ۱ : A. سیستم میکروفلوئیدیک طراحی شده. B. مدار مقاومت (resistance circuit) طراحی شده که تنظیم کننده سرعت روند خروج محیط کشت از منفذ خروجی چیپ می باشدC.. منفذ(chamber) تعبیه شده به منظور انتقال و حفظ سلول مورد مطالعه. D. روند انتقال سلول های بنیادی اسپرماتوگونی(cell seeding) در محفظه چیپ میکروفلوئیدیک.

بررسی های ایمونوهیستوشیمی

نمونه برداری در هفته ٤ پس از کشت برای بررسی های بیشتر بافت شناسی ارزیابی گردیده اند. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس با مارکرهای خاص از جمله PLZF، TP1 و TEKT 1 انجام گردیده است.

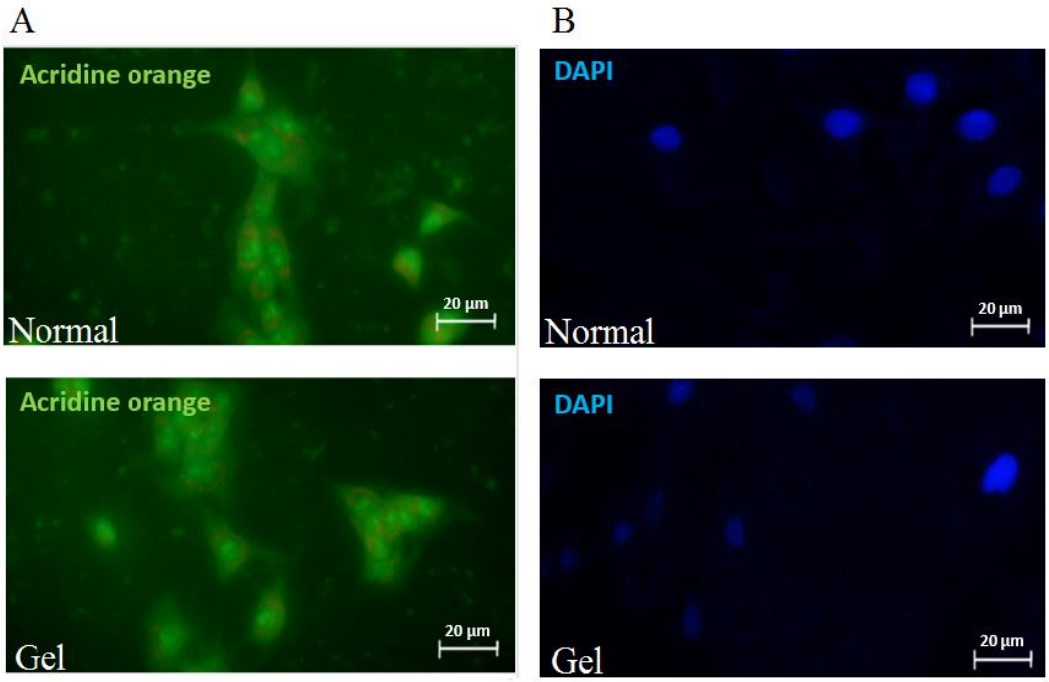
آنالیزهای آماری

نتایج بدست آمده به صورت دادهایاولیهبا استفاده از نرم افزار Prism (Graph Pad Prism 5.04)و در گروه های مورد مطالعه که شامل دو نمونه مورد بررسی بودند از تست t-test و آنالیز One-way ANOVAاستفاده گردیده است و در گروه های مورد مطالعه که بیش از دو نمونه گروه مورد بررسی بوده اند توسط تست Post hoc Tukeyمورد ارزیابی قرار گرفته اند.سپس مقایسه میانگین‌ها با در نظر گرفتن انحراف معیار(SE±) و P<0.05 صورت گرفته است.

نتایج

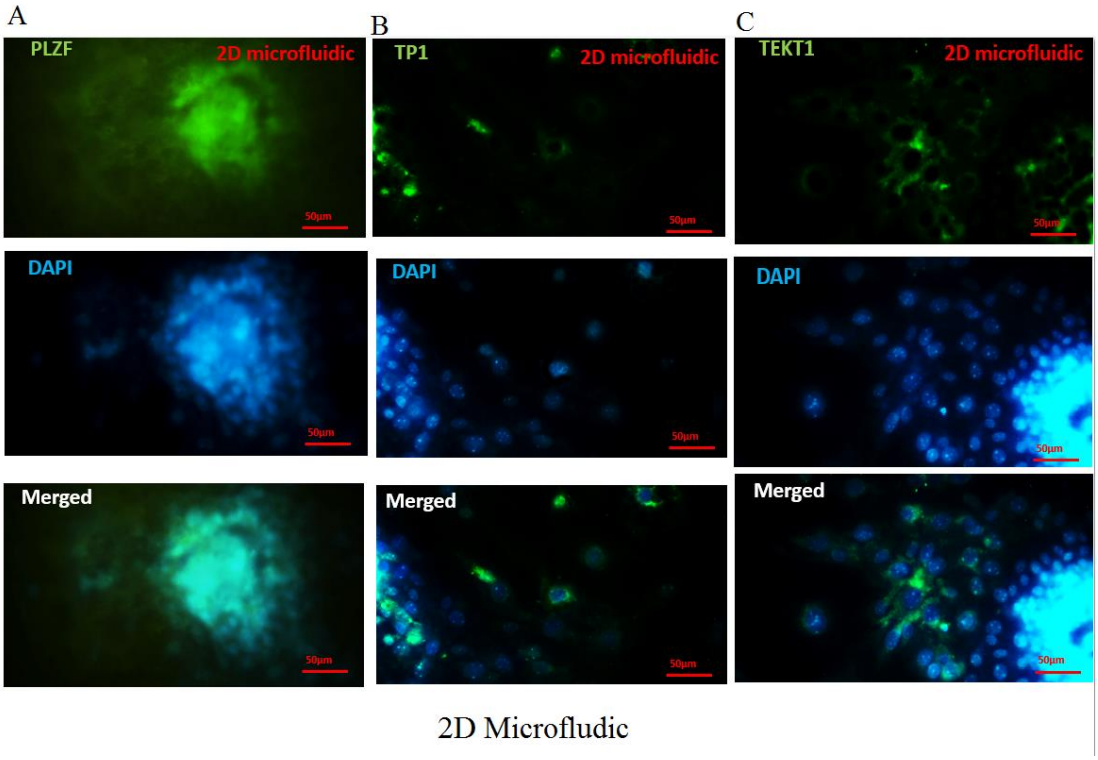
تمام داربستهای بیضه پس از آخرین مرحله از فرآیند آسلولاریزاسیون به طور کامل سلول زدایی شدندو با رنگ آمیزی H&E و تری کروم حفظ ECM و حذف کامل سلول از داربست سلول زدایی شده تائید گردید. علاوه بر این، فیبرهای کلاژنی آغشته به رنگ آبی در بافت های مورد مطالعه با رنگ آمیزی تریکروم ماسون، بقایای سلول را نشان داد، در حالی که در هیچ نقطه ای رنگ آمیزی قرمز قابل مشاهده نبوده است. رنگ آمیزیAlcian blue ، حفظ GAGs در داربست های بیضه در مقابل بافتهای نرمال را

تأیید کرده است(۹). به منظور برآورد ظرفیت داربست برای تکثیر و تمایز SSC ها، داربست سه بعدی در شرایط in vitroمجدداًrecellularگردیده است. نتایج رنگ آمیزی Acridine orange و DAPI یکپارچگی DNA اسپرم را بدون تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوتیک در SSC نشان داد و تاییدی بر عدم مرگ سلول ها در حضور داربست بود(نگاره ۲).

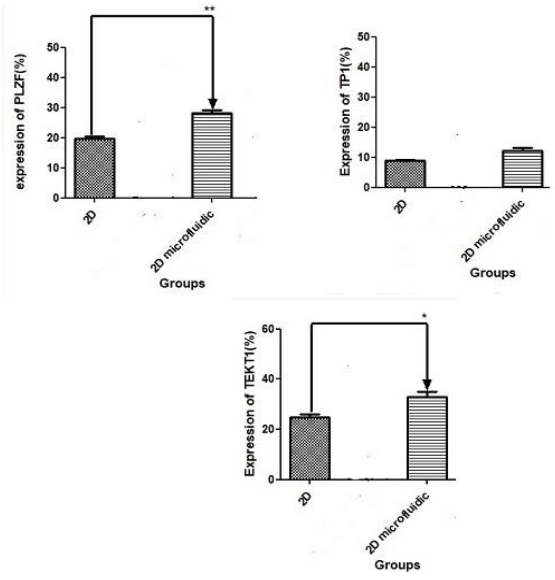


نگاره ۲: A. رنگ آمیزی آکریدیناورنج و تاییدی بر عدم سمیت داربست ژلی در قیاس با شرایط عدم حضور داربست که با حفظ یکپارچگی DNA اسپرم و عدم تغییرات مورفولوژیکآپوپتوتیک در SSCها همراه می باشد. B. رنگ آمیزی DAPI موید بیان معنی دار سلول های بنیادی اسپرماتوگونی بر روی داربست ژلی در مقایسه با شرایط عدم حضور داربست می باشد.

پس از مدت یک ماه، ارزیابی IHC به منظور درک قدرتتکثیر و تمایز سلولهای SSC، اسپرماتیدها و سلول های شبه اسپرم با مارکرهایPLZF، TEKT1 و TP1 به ترتیب انجام گردیده است. بیان ژنیPlzf و Tekt1 به عنوان یک مارکر خاص برای سلولهای اسپرماتوگونیموید آن است که سلوهای تمایز نیافته کشت داده شده در سیستم میکروفلوئیدیک در قیاس با کشت در پلیتپس از یک ماه بررسی، قابلیت تکثیر و تمایز معنی دار سلول ها را نشان می دهند. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که شدت رنگ پذیری در سلول های کشت شده در سیستم میکروفلوئیدیک در مقایسه با کشت in-vitro پس از پیوند در شرایط آزمایشگاهی به طور معنی داری افزایش یافته است (p<۰,۰5). رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس نیز نتایج مشابهی در مارکر های PLZF، TEKT1 و TP1 به عنوان نشانگرهای خاص اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها نشان داد(نگاره ۳)(نگاره ٤).



نگاره ۳ : ارزیابی هیستولوژیکی و رنگ آمیزی DAPI از سلول های بنیادی اسپرماتوگونیکشت داده شده برای مدت یک ماه روی سیستم میکروفلوئیدیک و تایید بیان مارکرهای PLZF(A)، TP1(B) و TEKT1(C).



نگاره ٤ : ارزیابی آماری میزان بیان مارکرهایPLZF، TP1 و TEKT1 نشان از افزایش معنی دار بیان دو مارکرPLZF و TEKT1 در شرایط کشت برای مدت یک ماه در سیستم میکروفلوئیدیک را در مقایسه با شرایط کشت در پلیت های آزمایشگاهی دارد ($p<0.05$).

بحث

کشت طولانی مدت بافت و در عین حال حفظ یکپارچگی و ساختار بافت مبحث مطالعاتی مهمی برای محققین بوده. از سویی، استفاده از داربست های ECM در دهه های گذشته برای شبیه سازی ساختار و عملکرد های بدن در حال افزایش است(۱۱).اخیراً، به کارگیری سیستم های میکروفلوئیدیک در آزمایشات کشت سلولی رواج یافته است(۱۲-۱٤). همچنین، داربستی متشکل از ماتریکس بیضه آسلولار شده،ژل هیالورونیک اسید وکیتوزان برای ایجادبستری مناسب به منظور پشتیبانی سلول های بنیادی بیضه، می تواند یک سیستم ایمن مشابه بدن میزبان برای القا اسپرماتوژنز فراهم آورد. به تازگی، محققان موفق شده اند بافت ها یا سلول ها را برای چندین هفته در دستگاه های

میکروفلوئیدیک کشت دهند(۱۵, ۱۶). نتایج تحقیقات حاکی از آن است که قطعات بافت بیضه رت با حفظ ساختار اولیه لوله های اسپرم ساز و همچنین حفظ خاصیت عملکردی برای حدود دو ماه در سیستم های میکروفلوئیدیک قابلیت نگهداری دارند. این محققین نتایج رضایت بخشی پس از پیوند به بیضه رت های میزبان مشاهده کردند و نتایج آن ها با پیدایش مجدداسپرماتوژنز همراه بود. بررسی های ما تائید کرده است که سیستم میکروفلوئیدیک می تواند از سلولهای کشت شده در سیستم میکروفلوئیدیک طراحی شده در قیاس با کشت در شرایط in-vitro بستری مناسب برای پشتیبانی تکثیر و تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونی ها فراهم کند. یکی از ویژگیهای این سیستم داشتن غشای متخلخل منفذ دار برای جدا کردن محفظه ها و کانال های کشت سلولی می باشد که شرایط ایده آلی را برای کشت موثر سلول و تحریک اسپرماتوژنزفراهم می آورد(۱۵).

در یک مطالعه در سال ۲۰۱۷، یک سیستم میکروفلوئیدیک با دو کانال مشابه و کشت سلول سه بعدی مبتنی بر پرفیوژن مرکزی برای مطالعه کارایی سیستممیکروفلوئیدیک در مورفولوژی و تکثیر غدد لگن مفصلی خرگوش طراحی شد. سلولها برای مدت ۲ هفته کشت داده شدند. سیستم میکروفلوئیدیک از طریق کانال ها مواد مغذی محیط کشت را تأمین می کرد. علاوه بر این، این دستگاه امکان حذف مواد دفعی را داشت. همه این ظرفیت ها با هم، الگوی متابولیسم in vivo را شبیه سازی می کنند. علاوه بر این، از آنجا که مکانیسم کشت بسته و به صورت خودکار بود، امکان آلودگی کاهش یافت(۱۷).

گروهی از محققین در سال ۲۰۱۶یک سیستم میکروفلوئیدیک را طراحی کردند که از یک کانال با جریان مستمر و مداوم محیط کشت تشکیل شده است. سیستم طراحی شده آن ها داراییک غشای نفوذپذیر برای انتقال مواد مغذی است که این غشا کانال عبور محیط کشت را از محفظه نگهدارنده نمونه مجزا می کند تا شرایط بهینه ای برای حفظ بافت بیضه موش و اسپرماتوژنز فراهم آید(۱۸).گروه مذکور، یک سیستم میکروفلوئیدیک بدون پمپ طراحی کردند که در آن سرعت جریان محیط کشت توسطیک مدار مقاومت(resistance circuit) قابلیت تنظیم داشت. آنها در طراحی قبلی خود در نظر گرفتند که اسپرماتوژنز در شرایط in-vitroبه میزان جریان محیطکشت با سرعت متوسط بیش از ۰/۰۵ میکرولیتر در دقیقه نیاز دارد. بنابراین، آنها دستگاه بدون پمپ خود را به گونه ای تنظیم کردند که دنبال کننده مطالعه قبلی باشد(۱۸). در مطالعه حاضر، ما ایده های آنها را در ساخت و طراحی سیستم میکروفلوئیدیک دنبال کردیم، این بدان معنی است که ما طراحی بدون پمپ یعنی طراحی با مدار مقاومت را برای کنترل جریان محیط کشتاعمال کردیم. همچنین ما از غشا منفذدار متخلخل در بین دو لایه PDMS استفاده کردیم.

گروه محققین فوق الذکر، همچنین در طراحی دستگاه میکروفلوئیدیک خود با داشتن غشای متخلخل برای جداسازی بافت و محیط کشت، با تقلید از عروق خون که مواد مغذی و اکسیژن را فراهم می کند و ضایعات را به صورت کاملا سازمان یافته از بین می برد، ساختاری مشابه بدن را شبیه سازی کرده اند. آنها در آزمایشات تجربی خود بیضه های نرمال ۵/۵–۰/۵ روزپسازززایمان (dpp) موش را به مدت ۶ ماه کشت دادند. آنها گزارش دادند که اسپرم های ایجاد شده قادر به تولید فرزندان سالم هستند. بنابراین، نتایج حاکی از آن است که دستگاه میکروفلوئیدیک می تواند به طور موثری شرایطی مشابهin-vivoبرای بافتها و ارگانهای مختلف ایجاد کند(۱۰). در مطالعه ما، دستگاه میکروفلوئیدیک طراحی شده قادر به اعمال نقش حمایتی ویژه ای است و در نتیجه قادر است تا از تداوم اسپرماتوژنز پشتیبانی کند.

به منظور شناسایی ماهیت سلول های مشاهده شده در توبولهای اسپرم ساز، بیان ژنی سلول خاص مانند Tp1، TEKT1 و بیانPLZF در اسپرماتیدهای هاپلوئیدی پس از مرحله میوز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حفظ بهترSSC ها را در سیستم میکروفلوئیدیک در مقایسه با روند کشت in-vitro تأیید کردند. PLZFنقش کلیدی در خود نوسازی و حفظSSC ها در بافت بیضه را دارد. مطالعات صورت گرفته حاکی از آن است که، کاهش بیان ژن PLZF می تواند باعث کاهش تعداد اسپرماتوزواهای نرمال گردد(۱۹, ۲۰).در مطالعه حاضر، پس از چهار هفته کشت سلول های بنیادی اسپرماتوگونی در سیستم مایکروفلوییدیک شاهد افزایش بیان این فاکتور موثر در تکثیر و خودنوزایی SSCها بودیم.

در نهایت نتایج بررسی ها نشان می دهند که استفاده از سیستم میکروفلوئیدیک می تواند بستر بهینه ای برای بقا بافت فراهم آورد و در نتیجه سبب بهبود روند اسپرماتوژنز در روند کشت سلول گردد.

فهرست منابع

1. Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, et al. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. PLoS One. 2018;13(2.(
2. Reda A, Hou M, Winton T, Chapin R, Söder O, Stukenborg J-B. In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. Mhr: Bas Sci Rep Med. 2016;22(9.(
3. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. Androl: Springer; 2010. p. 11-59.
4. Vermeulen M, Del Vento F, De Michele F, Poels J, Wyns C. Development of a cytocompatible scaffold from pig immature testicular tissue allowing human sertoli cell attachment, proliferation and functionality. Int JMol Sci. 2018;19(1).
5. Aoshima K, Baba A, Makino Y, Okada Y. Establishment of alternative culture method for spermatogonial stem cells using knockout serum replacement. PLoS One. 2013;8(10).
6. Alrahel A, Movahedin M, Mazaheri Z, Amidi F. Study of Tnp1, Tekt1, and Plzf genes expression during an in vitro three-dimensional neonatal male mice testis culture. Iranian Biomed J. 2018;22(4).
7. Yu F, Hunziker W, Choudhury D. Engineering microfluidic organoid-on-a-chip platforms. Micromachine. 2019;10(3).
8. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim T, Koruji M, Haron A, Nowroozi M, et al. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. Androl. 2012;44.
9. Naeemi S, Eidi A, Khanbabaee R, Sadri-Ardekani H, Kajbafzadeh A-M. Differentiation and proliferation of spermatogonial stem cells using a three-dimensional decellularized testicular scaffold: a new method to study the testicular microenvironment in vitro. Int Urol Nephrol. 2021.
10. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, et al. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. Sci Rep. 2017;7(1).
11. Rajab TK, O'Malley TJ, Tchantchaleishvili V. Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective. Artif Organ. 2020;44(10).
12. Berthier E, Young EW, Beebe D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. Lab on a Chip. 2012;12(7).
13. Halldorsson S, Lucumi E, Gómez-Sjöberg R, Fleming RM. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. Biosensor Bioelectronic. 2015;63.
14.

TehranirokhM, Kouzani AZ, Francis PS, Kanwar JR. Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. Biomicrofluidic. 2013;7(5).
15. Berdichevsky Y, Sabolek H, Levine JB, Staley KJ, Yarmush ML. Microfluidics and multielectrode array-compatible organotypicslice culture method. J Neurosci method. 2009;178(1).
16. Wagner I, Materne E-M, Brincker S, Süßbier U, Frädrich C, Busek M, et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skintissue co-culture. Lab on a Chip. 2013;13(18).
17. Pendergraft SS, Sadri-Ardekani H, Atala A, Bishop CE. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. Biol Rep. 2017;96(3).
18. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. Sci Rep. 2016;6(1).
19. Baert Y, Rombaut C, Goossens E. Scaffold-based and scaffold-free testicular organoids from primary human testicular cells. Organoid: Springer; 2017. p. 283-90.
20. Azizi H, Koruji M, Skutella T. Comparison of PLZF Gene Expression between Pluripotent Stem Cells and Testicular Germ Cells. CellJ. 2020;22(1).