مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۴، تیر ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تهیه داربست بیضه‌ای زیست سازگار برای استفاده در مهندسی بافت

نسرین مجیدی قره ناز: دکتری گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

منصوره موحدین: استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) movahed.m@modares.ac.ir

زهره مظاهری: دکتری علوم تشریح، مرکز تحقیقات علوم پایه، شرکت بافت و ژن، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: ایجاد اسپرماتوژنز آزمایشگاهی با استفاده از سلول‌های اسپرماتوگونی نیازمند بستر مناسب برای رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد. ماتریکس خارج سلولی بیضه‌ای به عنوان یک داربست بیولوژیکی می‌تواند برای چسبندگی، تکثیر، مهاجرت و تمایز سلولی عمل کند. هدف مطالعه ما سلول زدایی بافت بیضه به صورت کامل برای تهیه داربست و بررسی چسبندگی سلول‌های اسپرماتوگونی پس از تزریق به درون داربست می‌باشد.

روش کار: به منظور تهیه داربست، از بیضه‌های موش و غلظت‌های مختلف دترجنت‌ها استفاده گردید. کارایی فرآیند سلول‌زدایی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و اندازه‌گیری محتویات DNA بررسی گردید. برای ارزیابی حفظ اجزاء ماتریکس خارج سلولی از رنگ‌آمیزی تری‌کروم‌ماسون، آلشین‌بلو و ایمونوهیستوشیمی و کیت استفاده گردید. سپس سلول‌های اسپرماتوگونی جدا شده از بیضه نوزاد از طریق مجرای وابران به داربست‌ها تزریق شد و سپس به مدت دو هفته بر روی ژل آگارز کشت داده شد. بررسی‌های بافت‌شناسی درپایان کشت انجام گردید.

یافته‌ها: استفاده از سدیم دودسیل سولفات دودسیل سولفات ۰/۵ درصد و تریتون ۰/۵ درصد منجر به حذف کامل سلول‌ها از بافت گردید. رنگ‌آمیزی اختصاصی و ایمونوهیستوشیمی حفظ کلاژن، فیبرونکین و لامینین و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در داربست بیضه‌ای را تایید کرد. تست MTT نشان داد که داربست‌ها زیست‌سازگار بوده و تاثیر منفی بر بقای سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی ندارند. نتایج ارزیابی بافت‌شناسی نشان داد که که سلول‌ها در داربست بیضه‌ای نشست کرده‌اند.

نتیجه‌گیری: روش سلول‌زدایی ما، پروتئین‌های مهم ماتریکس خارج سلولی را در داربست‌های بیضه‌ای حفظ نمود. داربست‌ها، زیست‌سازگار بوده و تاثیر منفی بر بقای سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی و اسپرماتوگونی نداشتند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه تربیت مدرس

کلیدواژه‌ها

داربست،

بیضه،

ماتریکس خارج سلولی،

سلول بنیادی اسپرماتوگونی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۲۶

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۴/۰۸

شیوه استناد به این مقاله:

Majidi Gharenaz N, Movahedin M, Mazaheri Z. Production of biocompatible testis scaffold for use in tissue engineering. Razi J Med Sci. 2020;27(4):37-48.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

Razi Journal of Medical Sciences. 2020;27(4):37-48. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Production of biocompatible testis scaffold for use in tissue engineering

Nasrin Majidi Gharenaz, Anatomical Sciences Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Mansoureh Movahedin, Professor, Anatomical Sciences Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (* Corresponding author) movahed.m@modares.ac.ir

Zohreh Mazaheri, Basic Medical Science Research Center, Histogenotech Company, Tehran, Iran

Abstract

Background: Cryopreservation of immature testicular tissue before chemo/ radiotherapy is the only option to preserve fertility of cancer-affected prepubertal boys. To avoid reintroduction of malignant cell, induction of in vitro spermatogenesis could be considered. Induction of in vitro spermatogenesis using spermatogonial cells requires a suitable platform for cell growth and proliferation. The extracellular matrix of the testis could be used for adhesion, proliferation, migration and differentiation of spermatogonial cells. The extracellular matrix of the testis consists of glycosaminoglycans (GAGs), fibronectin, collagen and laminin. It can mimic specific microenvironment of testis. The extracellular matrix as a biological scaffold provided an appropriate platform for proliferation and differentiation of spermatogonial cells. Biological scaffolds were developed using decellularization of tissues and organs. Decellularization is a process that removes the cells, their nuclei and debris from tissues and organs without sever damage to structure and biochemical component of the tissues. The aim of our study was decellularization of whole testis for preparation of scaffold and evaluation of spermatogonia cells homing after injection into the scaffold

Methods: In order to prepare the scaffolds, adult mouse testes and different concentrations of detergents were used. Initially, the adult mice were scarified using chloroform and their testes were removed and washed with PBS, then decellularization was performed using different concentrations of detergents according following protocols.

Protocol 1: The testes were immersed in 0.1% SDS solution for 24 hours

Protocol 2: The testes were immersed in 0.5% SDS solution for 24 hours.

Protocol 3: The testes were immersed in 1% SDS solution for 24 hours.

Protocol 4: The testes were immersed in 0.5% SDS solution for 18 hours, then washed with PBS and immersed in 0.5% Triton solution for 18 hours.

In order to remove detergents, scaffolds were washed using PBS and disinfected by 70% ethanol. All protocols of decellularization and washing were done at room temperature on orbital shaker with 50 rpm speed. The efficiency of the decellularization process was determined by hematoxylin-eosin staining and DNA quantification. To evaluate the preservation of collagen and GAGs, Masson's trichrome staining and alcian blue staining were done respectively. Confirmation of fibronectin, collagen 4 and laminin presence in decellularized scaffolds was done using immunohistochemistry (IHC). The quantity of totlal collagen and GAGs in scaffolds was evaluated using Sicrol assay kit and Blyscan assy kit respectively. The biocompatibility of testicular scaffolds was evaluated using MTT test. Initially, mouse embryonic fibroblast cells were cultured on testicular scaffold for 24 hours and 72 hours. Then, the culture medium was removed and 200 µl of MTT reagent with a concentration of 0.5 mg / ml was added to the cells and incubated at 37 ° C for 4 h. Finally, 200 micrometers of DMSO was added and the samples were transferred to the 96 well plates and located in ELISA reader. In

Keywords

Scaffold,

Testis,

Extracellular Matrix,

Spermatogonial Stem Cells

Received: 14/04/2020

Published: 25/06/2020

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

order to evaluation of spermatogonial cells support by scaffolds, the isolated cells from neonatal testes were injected to scaffolds via efferent ductile and then cultured on agarose gel for two weeks. Histological studies were carried out at the end of culture.

Results: The results of hematoxylin-eosin staining showed that immersion testis in 0.1% SDS solution and 0.5% SDS solution couldn't decellularize the testes. On the other hand, immersion testis in 1% SDS solution led to destruction of seminiferous base membrane. Immersion testis in 0.5% SDS and 0.5% Triton resulted in complete decellularization of the testes without severe damage to seminiferous base membrane. In order to further evaluation of methods efficiency, the amount of DNA residue in the scaffolds was extracted using kit and examined by nanodrop. Spectrophotometric analysis showed 50% and 70% of DNA were removed in first and second methods respectively, while more than 98% of DNA was removed in third and forth methods. The first and second methods were discarded due to inefficiency in DNA removal from the testes and third method due to destruction of the basement membrane of the tubes. So, the scaffolds that prepared by forth method were selected for further evaluation. The result of alcian blue staining indicated the good preservation of the GAGs in decellularized testes scaffolds .The result of thrichrom staining confirmed the preservation of collagen decellularized testes scaffolds. Presence of blue fibers in the scaffold (representing collagen fibers) and the lack of red dots (representing the cell nuclei) indicate that the prepared scaffolds are cell-free and Collagen strands are well preserved. Examination of fluorescent microscopic images showed that extracellular testicular matrix proteins including fibronectin, collagen type 4 and laminin were expressed in testicular scaffolds, indicating preservation of these proteins in scaffolds. Quantified evaluation of GAGs and collagen content of decellularized scaffolds showed that there was no significant reduction in GAGs and collagen level in scaffolds compared to testes. In order to evaluation of the cytotoxicity of testicular scaffolds, MTT test was done. The results of the MTT test showed that the survival rate of mouse embryo fibroblastic cells didn't show significant difference after 24 and 72 hours of culture in the presence of testicular scaffolds compared to culture without scaffolds, so the scaffolds were biocompatible and did not negative effect on cell survival. Mouse embryo fibroblastic cells could metabolize MTT in the presence of scaffolds, so mitochondria of the cells were active in the presence of scaffolds and led to the survival and proliferation of cells. Examination of hematoxylin-eosin images showed that the injected cells were located on basement membrane of seminiferous tubules and in the interstitial space and created colonies that resemble organoid structures. The tubes were completely collapsed in control group, and no cells were seen in the scaffolds.

Conclusion: Immersion of adult mouse testes in 0.5% SDS solution and 0.5% triton solution was an effective method for decellularization of whole testes without severs damage to seminiferous tubules. Our decellularization method could preserve important proteins of extra cellular matrix including fibronectin, collagen type 4 and laminin in testicular scaffolds. Decellularized testicular scaffolds were biocompatible and did not have a harmful effect on MEF and spermatogonial cells viability. Also prepared scaffolds could support the proliferation of spermatogonial cells during two weeks culture

Conflicts of interest: None
Funding: Tarbiat Modares University

Cite this article as:

Majidi Gharenaz N, Movahedin M, Mazaheri Z. Production of biocompatible testis scaffold for use in tissue engineering. Razi J Med Sci. 2020;27(4):37-48.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

اسپرماتوژنز یک فرآیند بسیار پیچیده و منظم است که طی آن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی درون ساختارهایی بنام لوله‌های سمی‌نفروس تکثیر و تمایزیافته و سلول‌های دختری را برای ایجاد مداوم اسپرماتوزوا تولید می‌نمایند (۱). این روند در داخل بدن تحت کنترل فاکتورهای مختلف از جمله هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی است. هر کدام از این فاکتورها برهم کنش بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا می‌تواند فرآیند اسپرم‌زایی را تحت تاثیر قرار دهد. نقص هر یک از این عوامل می‌تواند منجر به ناباروری مردانه گردد (۲). برای درمان ناباروری مردانه و القاء و از سرگیری فرآیند اسپرماتوژنز می‌توان از روش‌های مختلف استفاده کرد. از مهم‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده و مورد توجه محققین، کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در محیط آزمایشگاه و پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که نیازمند شبیه سازی شرایط محیط داخلی بدن و بافت بیضه است.

در بافت بیضه، اپی‌تلیوم سمی‌نفروس بوسیله یک تیغه پایه و یک لامینا پروپریا تقویت می‌گردد. این لوله ها به وسیله ماتریکس خارج سلولی از یکدیگر جدا می شوند. ماتریکس خارج سلولی بیضه غنی از گلیکوزآمینوگلیکانها، پروتئین‌های لامینین، کلاژن و فیبرونکتین است (۳-۵). ماتریکس خارج سلولی بافت بیضه‌ای مسئول انتقال مولکول‌های زیست فعال است که ارتباط بین اجزاء مختلف سلولی را فراهم می‌کند و مکالمه متقابل بین اپی‌تلیوم سمی‌نفروس و بافت بینابینی را به وسیله تشکیل یک سد فیلتراسیون انتخابی برای مواد فعال بیولوژیکی تسهیل می‌کند. مطالعات نشان داده که اجزاء ماتریکس خارج سلولی مانند لامینین و کلاژن برای بازسازی رویدادهایی که در اپی‌تلیوم سمی‌نفروس در طول اسپرماتوژنز رخ می دهد مهم است (۶). بنابراین ماتریکس خارج سلولی طبیعی می تواند به عنوان یک داربست زیستی، بستر رشد ایده‌آلی را فراهم می‌کند، زیرا ریزمحیط اختصاصی بافت را تقلید می‌کند (۷).

داربست بیضه ای، پتانسیل این را دارند که به عنوان یک ابزار برای مطالعه روند اسپرماتوژنز و ایجاد اسپرماتوژنز آزمایشگاهی از طریق تمایز سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی برای درمان ناباروری مورد استفاده قرارگیرند. داربست‌ها همراه با سلول‌ها و سیگنال‌های محرک رشد یک جزء کلیدی مهندسی بافت را می‌سازند و حمایت ساختاری برای چسبندگی سلولی و بازسازی متعاقب بافتی را فراهم می‌کنند. و به دلیل پاسخ‌های مناسب ایمونولوژیک، خواص آنتی‌ژنیک ملایم، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه می‌باشند (۸) و در مهندسی بافت برای تولید ارگان‌های جایگزین مورد استفاده جهت تولید داربست‌های زیستی از روش سلول‌زدایی استفاده می‌شود. بافت‌های فاقد سلول، بیشتر ویژگی‌های مکانیکی طبیعی خود را حفظ نموده و موجب سازمان‌دهی مجدد بافت می‌شوند (۹). درسال های اخیردر سال‌های اخیر توجهات زیادی برای تولید داربست‌های بیولوژیکی از بافت بیضه جلب شده است. Baert و همکاران نشان دادند که سلول‌زدایی قطعات بافت بیضه انسانی از طریق غوطه‌وری در سدیم-دودسیل‌سولفات منجر به حفظ رضایت بخش ساختار و ترکیب ماتریکس‌خارج‌سلول بیضه می‌گردد. داربست تهیه شده توسط آن‌ها، برای فیبروبلاست‌ها سمی نبود، که نشان می‌دهد شستشوی فراوان قبل ازکشت قادر به از بین بردن دترجنت ها است (۱۰). در مطالعه دیگری، بافت بیضه‌ی خوکی با استفاده از پروتکل ترکیبی دترجنت‌های یونی و غیر یونی سلول‌زدایی شد و سپس سلول‌های سرتولی را بر روی داربست‌های تهیه شده کشت داده شد. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که سلول‌های سرتولی توانستند به داربست‌های بیضه‌ای بچسبند و تکثیر یابند (۱۱). هدف مطالعه حاضر تولید داربست های بیولوژیکی زیست سازگار از بافت بیضه موشی به صورت کامل و قطعه نشده با روش غوطه وری در داخل دترجنت‌ها و سپس بررسی چسبندگی و نشست سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پس از تزریق به درون لوله‌های سمی‌نفروس موجود در داربست می باشد.

روش کار

در این مطالعه از ۳۰ سر موش نر بالغ و ۳۰ سر موش نر نوزاد نژاد NMRI استفاده گردید. موش‌های مورد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

مطالعه همگی در حیوان‌خانه‌ی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط استاندارد نگه‌داری شدند. کلیه‌ی مراحل این پژوهش بر اساس مصوبه کمیته اخلاقی پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به شماره شناسه‌ی (IR.TMU.REC.1394.269) انجام گردید.

تهیه داربست‌های بیضه‌ای: ابتدا موش‌های بالغ با استفاده از کلروفرم کشته شدند، سپس بیضه‌ی آن‌ها خارج گردید و با استفاده از (Invitrogen, PBS Switzerland) شسته شد تا خون‌های اضافی حذف گردد. برای تسهیل ورود دترجنت‌ها به داخل بافت‌های بیضه، با استفاده از سرنگ انسولین تعدادی منافذ بر روی کپسول بیضه‌ها ایجاد گردید. تمام مراحل سلول‌زدایی و شست‌وشو با استفاده از روتاتور اربیتال با سرعت ۵۰rpm در دمای اتاق انجام گردید. برای تهیه داربست‌ها از روش‌های زیر استفاده گردید.

روش یک: بیضه ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول SDS (Sigma, USA) با غلظت ۰/۱ درصد قرار گرفتند.

روش دو: بیضه ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول SDS با غلظت ۰/۵ درصد قرار گرفتند.

روش سه: بیضه ها بیضه ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول SDS با غلظت ۱درصد قرار گرفتند.

روش چهار: بیضه ها به مدت ۱۸ ساعت در داخل محلول SDS ۰/۵ درصد قرار گرفتند، سپس با PBS شسته شده و در داخل محلول تریتون (Sigma, USA) با غلظت ۰/۵ درصد به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند.

برای حذف دترجنت ها، داربست‌ها، ۴ بار و هر بار به مدت ۱۲ ساعت با استفاده از PBS شسته شدند و در نهایت توسط اتانول ۷۰ درصد آلوده زدایی شده (۱۲) و مجددا سه بار و هر بار یک ساعت در PBS شسته شدند. نگه داری داربست های تهیه شده در داخل PBS حاوی پنی سیلین- استرپتومایسین و در دمای ۴Ċ و حداکثر به مدت دو هفته صورت می گرفت.

ارزیابی داربست‌های بیضه‌ای با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین: برای بررسی میکروسکوپی داربست‌های بیضه‌ای تهیه شده، قالب‌های پارافینی از آن‌ها تهیه شده و برش‌های بافتی با ضخامت ۵µm تهیه شد و بر روی لام‌های شیشه‌ای قرار گرفت. سپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین برای بررسی سلول-زدایی بافت بیضه و حذف سلول‌ها و دبری‌ها از درون لوله‌های سمی نفروس انجام گردید.

بررسی مقدار DNA باقی مانده در داربست‌های بیضه‌ای: برای ارزیابی مقدار DNA باقی مانده در داربست‌ها ، استخراج DNA با استفاده ازکیت QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس میزان DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific, Netherlands) در طول‌موج ۲۶۰ nm اندازه گیری شد (۱۳).

بررسی محتویات ماتریکس خارج سلولی داربست‌های بیضه‌ای:

رنگ آمیزی اختصاصی: به منظور تأیید حفظ کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان در داربست بیضه ای تهیه شده به ترتیب از رنگ آمیزی تری‌کروم ماسون و آلشین بلو (Sigma, USA) استفاده گردید (۱۴).

ایمونوهیستوشیمی: برای بررسی حفظ پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله فیبرونکتین، کلاژن IV و لامینین پس از فرآیند سلول-زدایی از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده گردید. برش‌های تهیه شده از داربست بیضه‌ای به مدت ۳۰ دقیقه در داخل فور با دمای C° ۶۰ قرار گرفت تا پارافین زدایی شود، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در گزیلل قرار گرفت تا شفاف سازی صورت گیرد. آب‌دهی با استفاده از الکل‌های با درجات نزولی صورت گرفت. برای بازیابی آنتی ژن‌ها از بافر سیترات استفاده گردید و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بافر سیترات با دمای C° ۹۷ انکوبه شدند. در مرحله بعد جهت نفوذپذیری غشاء سلولی، تریتون X-100 ٪۳ به مدت ۲۰ دقیقه روی نمونه ها قرار گرفت و سپس سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شسته شد. جهت بلوک کردن واکنش غیر اختصاصی، سرم بز ۱۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه روی نمونه ها قرار داده شد، سپس نمونه ها به مدت یک شب در داخل یخچال و در اتاقک مرطوب با آنتی‌بادی اولیه فیبرونکتین (Mouse monoclonal IgG, E-AB-22077, Elabscience Biotechnology Inc)، کلاژن نوع ۴ (monoclonal IgG, E-AB-22150, Mouse Elabscience Biotechnology Inc)، لامینین (Rabbit polyclonal IgG, ab11575, Abcam) انکوبه شدند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

پس از آن برش‌های بافتی، سه بار با PBS شستشو داده شدند. پس از شست و شو، نمونه ها توسط آنتی بادی ثانویه (Alexa Fluor 488, goat anti-mouse IgG, A1100, Invitrogen) یا (Texas Red, Goat anti-ab6719, Abcam rabbit IgG,) به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در حالت تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد نمونه ها ۳ مرتبه شستشو داده شدند و رنگ DAPI به نمونه ها جهت رنگ آمیزی هسته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. سپس نمونه ها دوباره شستشو داده شدند و توسط میکروسکوپ Olympus microscope (BX51, Japan) بررسی شدند.

بررسی کمی کلاژن توتال و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها: بررسی میزان کلاژن توتال و گلیکوزآمینوگلیکان‌های موجود در داربست‌های بیضه‌ای تهیه شده به ترتیب با استفاده از کیت‌های Sicrol assay (Tebu-blegium) و Blyscan assy (Tebu-Bio, Belgium) طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

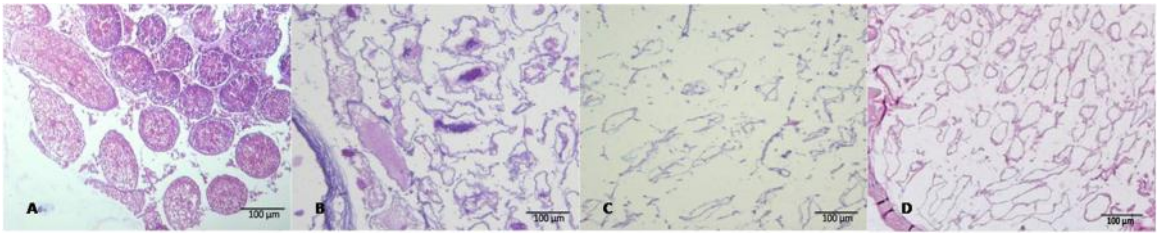
ارزیابی زیست‌سازگاری داربست بیضه‌ای: برای ارزیابی زیست‌سازگاری داربست بیضه‌ای از تست MTT استفاده شد. بدین منظور سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی بر روی داربست بیضه‌ای به مدت ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت کشت داده شد. پس از اتمام دوره کشت، محیط رویی سلول‌ها حذف شده و ۲۰۰ میکرولیتر معرف MTT (Carl Roth, Germany) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در دمای $37\ C^{\circ}$ انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. در نهایت نمونه‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و برای خوانش جذب نوری در دستگاه الایزا قرارگرفت (۱۵).

جداسازی و تزریق سلول‌های اسپرماتوگونی به داربست های بیضه‌ای: سلول‌های اسپرماتوگونی با روش هضم آنزیمی دو مرحله ای از بیضه های نوزاد موش جدا شدند (۱۶) و با استفاده از سوزن شیشه‌ای به انتهای مجرای وابران و ابتدای رت داربست بیضه‌ای تزریق شدند (۱۷) و بر روی ژل آگار ۱/۵٪ به مدت دو هفته در داخل انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. در پایان هفته دوم، قطعات بافتی برای بررسی جمع‌آوری شدند و برای بررسی بافت‌شناسی در داخل محلول فرمالین قرارگرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای بررسی نرمال بودن داده ها، از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف استفاده گردید. نتایج آزمون حاکی از توزیع نرمال داده ها بود، بنابراین برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و T-test و آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد. سطح معنی داری در مقایسه بین گروه ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تمامی اطلاعات کمی در این پژوهش به شکل میانگین ± انحراف معیار ارائه شد.

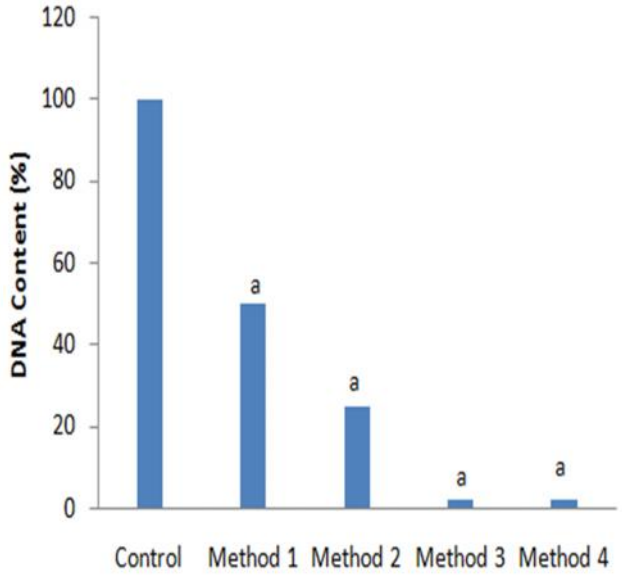
یافته‌ها

نتایج رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین نشان داد که استفاده از غلظت‌های پایین SDS شامل ۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد قادر به سلول‌زدایی کامل داربست‌ها نبود و از طرفی استفاده از غلظت ۱ درصدی SDS منجر به تخریب غشای پایه لوله‌ها گردید. در حالیکه استفاده از تریتون ۰/۵ درصد بعد از SDS منجر به سلول‌زدایی کامل بیضه‌ها بدون تخریب شدید لوله‌های سمی نفروس گردید، به‌طوریکه لوله‌ها کاملا خالی از سلول بودند (شکل 1A تا 1D). به منظور ارزیابی بیشتر

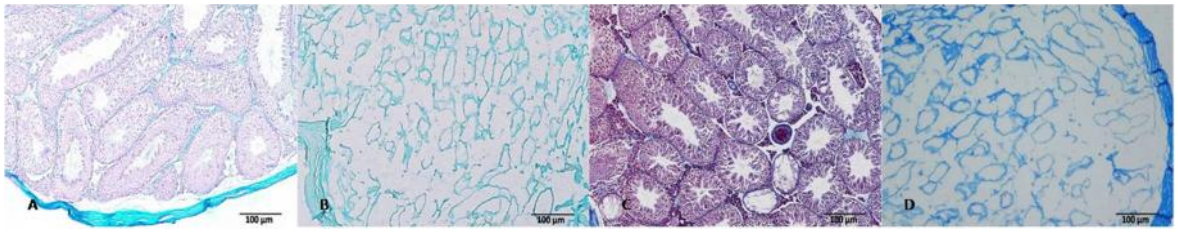


شکل ۱- ارزیابی بافت شناسی داربست‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسلین- ائوزین. A. داربست بیضه‌ای تهیه شده با SDS ۰/۱ درصد که لوله‌ها خالی نشده است، B. داربست بیضه‌ای تهیه شده با SDS ۰/۵ درصد که تعدادی از لوله ها دارای سلول و دبری است، C. داربست بیضه‌ای تهیه شده با SDS ۱ درصد که لوله ها تخریب شده است، D. داربست بیضه‌ای تهیه شده با SDS ۰/۵ درصد و تریتون ۰/۵ درصد که لوله‌های سمی‌نفروس خالی از سلول هستند. غشای پایه‌ی لوله‌ها حفظ شده است، اما لوله‌ها کمی کلاپس شده‌اند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



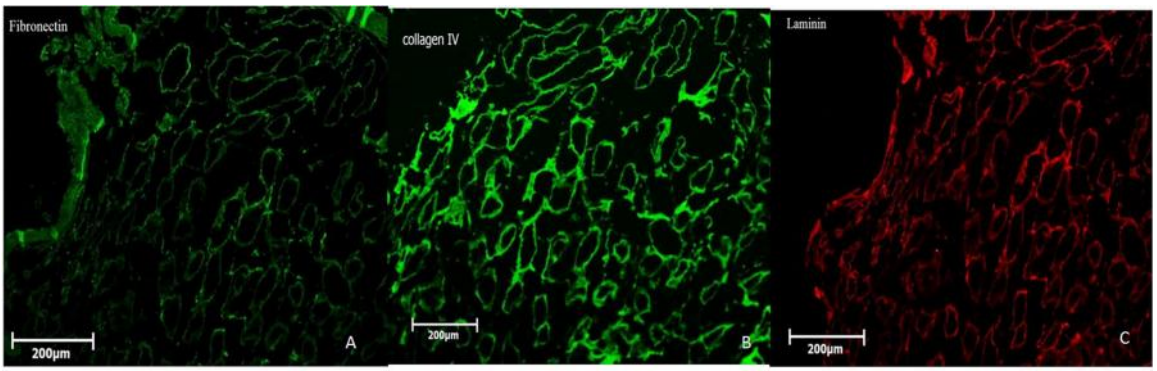
شکل ۲- ارزیابی مقدار DNA باقی مانده در داربست‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA . نتایج آنالیز اسپکتروفتومتریک نشان داد کـه در روش یـک و دو بـه ترتیب ۵۰ و ۷۵ درصد DNA حذف شده است، درحالیکه در روش سه و چهار ۹۸ درصد DNA حذف شده است. a: اختلاف معنی داری بـا بیضـه کنتـرل وجـود داشت ($p<۰/۰۵$).



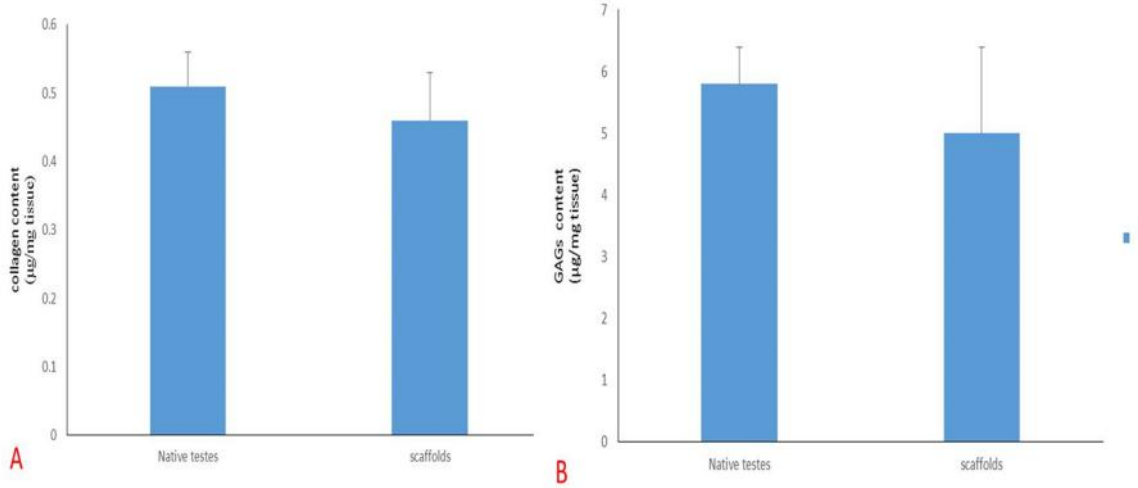
شکل ۳- ارزیابی حضور گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و کلاژن در داربست بیضه‌ای با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی. رنـگ‌آمیـزی آلشـین‌بلـو نشـان داد کـه گلیکـوز-آمینوگلیکان‌ها با الگوی مشابه در بیضه کنترل (A) و داربست بیضه‌ای (B) حضور دارند. رنگ آمیزی تری‌کروم‌ماسون حضور رشته‌های کلاژن در بیضه کنترل (C) و داربست بیضه‌ای (D) را تایید کرد. فقدان نقاط قرمز رنگ در داربست‌های بیضه‌ای حاکی از آن است که لوله‌های سمی‌نفروس عاری از سلول هستند.

کارایی روش های سلول‌زدایی مورد استفاده بـرای تهیـه داربسـت‌هـا، میـزان محتویـات DNA بـاقی مانـده در داربست‌ها، با استفاده ازکیت استخراج و توسط نانودراپ بررسی گردید. آنالیز اسپکتروفتومتریک نشان داد که در روش یک و دو به ترتیب ۵۰ و ۷۰ درصد DNA حـذف شده است در حالیکه در روش سه و چهـار بـیش از ۹۸ درصد DNA از داربست‌های بیضه‌ای حذف شـده اسـت (شکل ۲)، لذا برای ادامه مطالعه روش هـای یـک و دو به دلیل عدم کارایی در حذف DNA از بیضه‌هـا و روش ۳ به دلیل تخریب غشای پایه لوله‌ها کنار گذاشته شد و داربست های تهیه شده با روش ۴ برای ارزیابی بیشتر و بررسی سازگاری سلولی انتخاب گردیـد. جهـت بررسـی کیفی حضور گلیکوزآمینـوگلیکـان‌هـا در داربسـت‌هـای بیضه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصـی آلشـین بلـو اسـتفاده گردیـد. نتـایج رنـگ‌آمیـزی نشـان‌دهنـده‌ی حفـظ گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در داربست‌هـای بیضـه‌ای اسـت. شـکل ۳A مربـوط بـه داربسـت بیضـه‌ای و شـکل ۳B مربوط به بیضه کنترل می باشد. بـرای بررسـی کیفـی حفظ رشته‌های کلاژن در داربست‌های بیضه‌ای از رنـگ آمیزی تری‌کروم‌ماسون استفاده گردید. وجود رشته‌های آبـی رنـگ در داربسـت بیضـه‌ای (نمایـانگر رشـته‌هـای کـلاژن) و فقـدان نقـاط قرمـز رنـگ (نمایـانگر هسـته سلول‌ها)، حاکی از آن است که داربسـت‌هـای بیضـه‌ای تهیه شده عاری از هسـته سـلول هسـتند و رشـته‌هـای کلاژن به خوبی حفظ شده‌اند. شکل ۳C مربوط به بیضه کنترل و شکل ۳D مربوط به داربست بیضه‌ای می باشد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



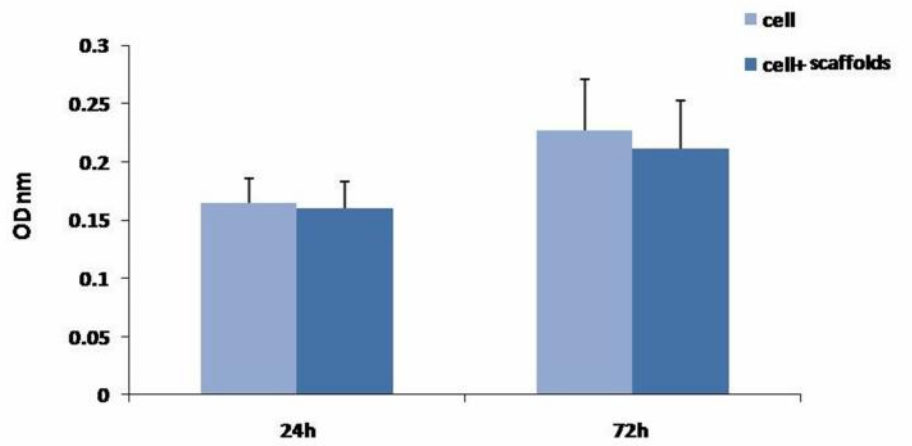
شکل ٤- بررسی پروتئین های ماتریکس خارج سلولی با استفاده از ایمونوهیستوشیمی. بررسی تصاویر از ایمونوهیستوشیمی وجود فیبرونکتین، کلاژن۴ و لامینین را در داربست ها و بیضه کنترل تایید کرد.



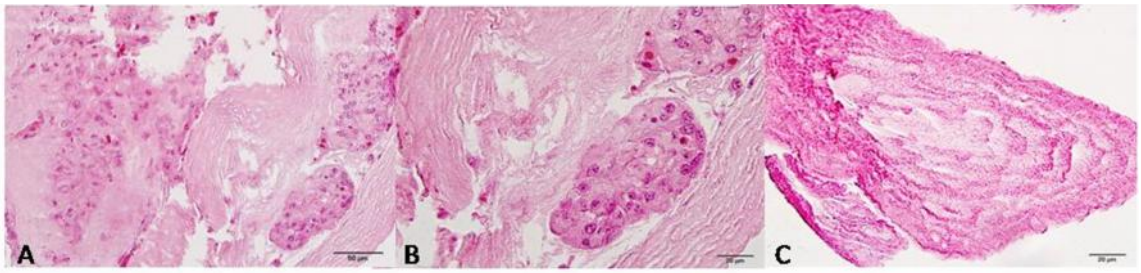
شکل ٥- ارزیابی میزان کلاژن توتال و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در داربست های بیضه ای با استفاده از کیت. نتایج ارزیابی کمی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان کلاژن توتال (A) و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (B) در داربست و بیضه کنترل وجود ندارد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

همچنین بررسی تصاویر میکروسکوپ فلوروسنتی نشان داد که پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی بیضه شامل فیبرونکتین (۴A)، کلاژن نوع ۴ (۴B) و لامینین (۴C) در داربست‌های بیضه‌ای بیان شده‌اند که نشان‌دهنده‌ی حفظ این پروتئین‌ها در داربست‌های بیضه‌ای است. اندازه گیری کمی میزان گلیکوز آمینوگلیکان ها و کلاژن باقی مانده با استفاده ازکیت نشان داد که کاهش معنی داری در سطح کلاژن و گلیکوز آمینوگلیکان در داربست‌های بیضه ای نسبت به بیضه‌های کنترل وجود ندارد (شکل ۵). برای بررسی سمیت داربست‌های بیضه‌ای با استفاده از تست MTT از سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی استفاده گردید. نتایج تست MTT نشان داد که میزان بقای سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی بعد از ۲۴ و ۷۲ ساعت کشت در حضور داربست‌های بیضه‌ای تفاوت معنی‌داری را با میزان بقای سلول‌ها بدون حضور داربست‌ها نداشت، بنابراین داربستهای تهیه شده زیست سازگار بوده و تاثیر منفی بر میزان بقای سلول‌ها نداشتند. سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی در حضور داربست‌ها، توانستند ماده MTT را متابولیزه کنند، لذا میتوکندری سلول‌ها در حضور داربست‌ها فعال بوده و منجر به بقا و تکثیر سلول‌ها گردید. (شکل ۶). مطالعات کیفی ارزیابی بعد از تزریق سلول‌ها با تهیه برش‌های بافتی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. بررسی تصاویر هماتوکسیلین-ائوزین نشان داد که سلول‌های تزریق شده هم در داخل لوله‌های سمی‌نفروس و هم در فضای بینابینی قرار دارند و کلونی هایی را ایجاد کرده اند که شبیه ساختارهای ارگانوئید هستند. همچنین در اکثریت مقاطع بافتی، سلول‌ها در زیر تونیکا آلوژنیزه قرار دارند و در قسمت‌های مرکزی کلونی‌های کمتری

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]



شکل ٦- ارزیابی سازگاری بافتی داربست‌های بیضه‌ای با استفاده از تست MTT. نتایج تست نشان داد که میزان بقای سلول‌های فیبروبلاست جنین موشی در حضور داربست‌های بیضه‌ای تفاوت معنی‌داری را با میزان بقای سلول‌ها بدون حضور داربست‌ها نداشت ($p>0/05$)، بنابراین داربست‌ها زیست سازگار بوده و تاثیر منفی بر میزان بقای سلول‌ها نداشتند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.



شکل ۷- رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین داربست‌های بیضه‌ای پس از تزریق سلول‌های اسپرماتوگونی (A و B). سلول‌های تزریق شده به داربست، کلونی‌هایی شبیه به ساختارهای ارگانوئید را در داربست ایجاد کرده‌اند که بیشتر در زیر تونیکا آلبوژنیزه تجمع یافته‌اند. تصاویر (C) مربوط به گروه کنترل بدون تزریق است که سلولی مشاهده نمی‌گردد.

دیده می‌شود. در گروه کنترل بدون پیوند، لوله ها کاملا کلاپس شده اند و سلولی در داربست دیده نمی‌شود (شکل ۷).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیضه موش بالغ را می‌توان با استفاده از دترجنت‌های SDS و تریتون X-۱۰۰ با غلظت ۰/۵ درصد به طور کامل سلول‌زدایی کرد، به‌طوریکه رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین حاکی از حذف کامل سلول‌ها و بقایای هسته‌ای از داربست‌های بیضه‌ای بود که نشان‌دهنده‌ی موثر بودن روش مورد استفاده است. برای تایید کارایی روش مورد استفاده از کیت استخراج DNA استفاده گردید. نتایج بررسی اسپکتوفومتری محتویات DNA نشان داد که با استفاده از روش مورد نظر بیش از ۹۸ درصد DNA از داربست‌ها حذف شده است که حاکی از آن است که دترجنت‌های مورد استفاده با غلظت مورد نظر به طور کامل اجزاء سلول‌های بیضه‌ای را از داربست حذف کرده اند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Baert و همکاران انجام شد، استفاده از SDS یک درصد به مدت ۲۴ ساعت به عنوان موثرترین روش برای سلول‌زدایی بافت بیضه‌ی انسانی گزارش گردید (۱۰). اما در مطالعه حاضر استفاده از SDS یک درصد به مدت ۲۴ ساعت منجر به تخریب شدید غشای پایه لوله‌های سمی نفروس گردید که می‌تواند به علت تفاوت درگونه مورد مطالعه باشد. لذا به منظور حفظ غشای پایه‌ی لوله‌های سمی‌نفروس، درصد SDS و مدت زمان سلول‌زدایی کاهش یافت که منجر به حفظ غشای پایه ی لوله‌ها گردید، اما بقایای زیادی از سلول‌ها و دبری باقی ماند که احتمالا به علت استفاده از بیضه کامل و دارای

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

کپسول برای سلول‌زدایی بود. برای حذف دبری‌ها و بقایای سلولی از داربست‌ها، از تریتون ۰/۵ درصد به مدت ۱۸ ساعت استفاده گردید و مدت زمان شست‌وشوی داربست‌ها با استفاده از PBS افزایش یافت که منجر به حذف دبری‌ها ار داربست‌ها گردید.

Baertو همکارانش، قبل از آغاز سلول‌زدایی، کپسول بیضه‌ها را جدا کرده و آن‌ها را قطعه قطعه کرده بودند که احتمالا خروج دبری‌ها و بقایای سلول‌ها از داخل لوله‌های سمی‌نفروس را تسهیل نموده بود. هدف مطالعه حاضر تهیه داربست از بیضه موشی به صورت کامل بود تا در مرحله‌ی بعدی سلول ها از طریق مجرای وابران به داخل لوله‌ها تزریق شود. در فرآیند سلول‌زدایی، هدف نهایی حذف سلول‌های بافت با استفاده از دترجنت‌ها و آنزیم‌ها از بافت مورد نظر و حفظ اجزاء و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی است. این پروتئین‌ها حمایت ساختاری و بیوشیمیایی را برای حمایت از چسبندگی سلولی، تکثیر و برهم‌کنش سلول به سلول و مهاجرت سلولی را فراهم می‌کنند (۱۸). حفظ اجزاء و ساختار ماتریکس خارج سلولی برای ایجاد برهم‌کنش مناسب بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی بسیار مهم و ضروری است (۱۹). اجزاء اصلی ماتریکس خارج سلولی بیضه شامل گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، لامینین، فیبرونکتین، کلاژن‌ها هستند (۱۰). لامینین اجازه‌ی چسبیدن سلول‌ها به غشای‌پایه را می‌دهد. لامینین به همراه کلاژن نوع ۴ در تشکیل طناب‌های بیضه‌ای دخیل هستند. کلاژن‌ها برای حفظ ساختار بافت ضروری هستند (۱۱). فیبرونکتین چسبندگی سلولی را حمایت می‌کند (۲۰). در این مطالعه، برای ارزیابی حفظ اجزاء ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های بیضه‌ای از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی، ایمونوهیستوشیمی و کیت استفاده گردید. رنگ‌آمیزی تری‌کروم‌ماسون و آلشین بلو، به ترتیب حفظ کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها را تایید کردند. تصاویر میکروسکوپ فلوروسنتی، حفظ فیبرونکتین، کلاژن نوع ۴، و لامینین در داربست‌ها را تایید کرد. نتایج بررسی با کیت حاکی از نبود تفاوت معنی دار در میزان کلاژن توتال و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در داربست ها نسبت به بیضه کنترل بود. حفظ اجزا و پروتئین های ماتریکس خارج سلولی پس از فرآیند سلول‌زدایی، حاکی از آن است که روش مورد استفاده مناسب است. برای بررسی سمیت داربست‌های تهیه شده از تست MTT استفاده گردید. نتایج تست سمیت نشان داد که داربست‌های بیضه‌ای اثر سوئی بر میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی در طی ۲۴ و ۷۲ ساعت کشت ندارند. بنابراین داربست‌ها زیست سازگار بوده و می‌توانند برای تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی مورد استفاده قرار گیرند. نتایج مطالعات Hadley و همکاران نشان داد که استفاده از سطوح پوشیده با ماتریکس خارج سلولی موجب القا تمایز در سلول های ژرم می‌گردد (۲۱). نتایج مطالعات Cheng و همکاران نشان داد که ماتریکس خارج سلولی در اسپرماتوژنز دخیل است (۲۲). تغییرات لامینین و کلاژن در بیماری‌هایی مانند سندروم سرتولی تنها، کریپتورکیدیسم و آتروفی بیضه بیانگر اهمیت ماتریکس خارج سلولی در عمکرد نرمال بیضه است (۲۳ و ۲۴). تهیه داربست بیضه‌ای مشتق از ماتریکس‌های خارج سلولی که قادر به حمایت از سلول‌های بیضه‌ای باشد، می‌تواند اهمیت برهم‌کنش سلول و ماتریکس در طی اسپرماتوژنز را نشان دهد. از طرفی داربست‌های بیضه‌ای می‌تواند برای مطالعه تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و غربال‌گری داروها مورد استفاده قرار گیرند (۲۵). این مطالعه، استفاده از داربست‌های بیضه‌ای برای حمایت از تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی جداشده از بافت بیضه ای را بررسی می‌کند. در مطالعه حاضر سلول‌های اسپرماتوگونی از طریق مجرای وابران به داخل لوله‌های سمی‌نفروس داربست تزریق گردید تا نشست و چسبندگی سلول‌ها به غشای پایه و تکثیر و تمایز آن‌ها تسهیل گردد. نتایج رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین نشان داد که سلول‌های تزریق شده هم در داخل لوله های سمی‌نفروس و هم در فضای بینابینی قرار دارند که احتمالا به علت پارگی لوله‌ها در حین تزریق سلول‌ها یا فرآیند سلول‌زدایی، سلول‌ها وارد فضای بینابینی نیز شده‌اند و کلونی‌هایی را تشکیل داده اند. لوله‌های سمی‌نفروز در حین فرآیند سلول‌زدایی، دچار کلاپس می‌شدند که تزریق سلول‌ها به درون لوله‌ها را دشوار می‌ساخت لذا در اکثریت مقاطع بافتی، سلول‌ها در زیر تونیکا آلوژنیزه قرار دارند و در قسمت های مرکزی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

جمعیت سلولی کمتر دیده می‌شود. Baert و همکاران در سال ۲۰۱۷ از داربست های بیضه ای، دیسک هایی تهیه کرده و سپس سلول‌های جداشده از بافت بیضه‌ای را بر روی سطح آپیکال دیسک‌ها کشت دادند (۱۰). نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که داربست های بیضه، خود تجمعی سلول های بیضه ای به ساختارهای ارگانوئید را حمایت کردند ولی ساختار یک بیضه تیپیک بازسازی نشد و داربست‌های بیضه ای در طی زمان به وسیله‌ی سلول‌ها بازآزایی شدند. در مطالعه حاضر هم سلول‌ها توانستند کلونی‌هایی را ایجاد نمایند که شبیه ساختارهای ارگانوئید بودند و قادر به تشکیل اپی تلیوم مطبق کاذب سمی‌نفروس توبول‌ها نبودند و یک ساختار بیضه تیپیک بازسازی نشد. در حقیقت کشت سلول‌ها بر روی سطح اپیکال داربست‌های بیضه ای یا تزریق آن‌ها به درون لوله‌های سمی‌نفروس و بافت بینابینی نتایج مشابهی را داشت و باعث تکثیر سلول‌ها و ایجاد ساختارهای ارگانوئیدی در داربست بیضه‌ای گردید. سلول‌های در حال تکثیر با ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک باعث تجزیه غشای پایه سمی نفروس توبول‌ها شده و سپس با ترشح پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی جدید در اطراف خود باعث بازآرایی داربست‌ها شدند.

از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به پایین بودن درصد پرشدگی لوله ها پس از تزریق به علت کلاپس لوله ها، عدم امکان کشت سه بعدی بیضه به صورت قطعه نشده به علت نکروز قسمت های داخلی می باشد. توصیه می شود در مطالعات بعدی استفاده از کشت دینامیک با استفاده از بیوراکتورها یا تهیه هیدروژل از داربست بیضه ای مد نظر قرار گیرد.

برای تهیه داربست‌های بیضه‌ای می‌توان از روش غوطه وری با استفاده از SDS با غلظت ۰/۵ درصد و تریتون با غلظت ۰/۵ درصد استفاده کرد. روش مذکور به طور موثر سلول‌زدایی را از بافت‌های بیضه‌ای انجام داد و در عین حال پروتئین‌های مهم ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه مانند کلاژن نوع ۴، لامی‌نین و فیبرونکتین و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها را حفظ نمود. داربست‌های ایجاد شده، زیست‌سازگار بوده و تاثیر سوئی بر میزان بقا و تکثیر سلول‌های فیروبلاست جنین موشی نداشتند، همچنین این داربست‌ها توانستند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی را بعد از تزریق و در طی دو هفته کشت حمایت کنند.

تقدیر و تشکر

این مقاله با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. محققین بر خود لازم می‌دانند تا از زحمات جناب آقای شهرام پوربیرانوند و خانم ابراهیمی به دلیل مساعدت در بخش مولکولی تشکر نمایند.

References

1. Oatley JM, Reeves JJ, McLean DJ. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. Biol Reprod. 2004;71(3):942-7.

2. Kojima Y, Kominami K, Dohmae K, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, Nishimune Y, Okabe M. Cessation of Spermatogenesis in Juvenile Spermatogonia. Int J Urol. 1997;4(5):5-7.

3. Laurie G, Leblond C, Martin G. Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. J of cell Biol. 1982;95(1):340-4.

4. Ungefroren H, Ergün S, Krull NB, Holstein AF. Expression of the small proteoglycans biglycan and decorin in the adult human testis. Biol of Reprod 1995; 52 (5): 1095-105.

5. Gulkesen K, Erdogru T, Sargin CF, Karpuzoglu G. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. Asian J Androl. 2002;4(1):55-60.

6. Siu MK, Cheng CY. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. Bioessays. 2004;26(9):978-92.

7. Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. Translat Res. 2014;163(4):268-85.

8. Badylack SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. Transplant Immunology. 2002;13:377-383.

9. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006;27:3675-3683.

10. Baert Y, Stukenborg J-B, Landreh M, De Kock J, Jörnvall H, Söder O, Goossens E. Derivation and characterization of a cytocompatible scaffold from human testis. Hum Reprod. 2014;30(2):256-67.

11. Vermeulen M, Del Vento F, de Michele F, Poels J, Wyns C. Development of a cytocompatible scaffold from pig immature testicular tissue allowing

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]

12. human sertoli cell attachment, proliferation and functionality. Int J Mol Sci. 201819(1):227.
13. Jain P, Shahi A, Singh A, Swamy M, Vaish R. Preparation of acellular diaphragmatic scaffold of bubaline origin. J Entomol Zool Stud. 2018;6(4):1759-63.
14. Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, Jungebluth P, Korkmaz S, Li S, Veres G, Soos P, Ishtok R, Chaimow N. Bioartificial heart: a human-sized porcine model–the way ahead. PloS One. 2014;9(11):e111591.
15. Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. Tissue Engin Part A. 2009;15(9):2665-76.
16. Fang NT, Xie SZ, Wang SM, Gao HY, Wu CG, Pan LF. Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells. Chin Med J (Engl). 2007;120(8):696.
17. 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(s1):41-55.
18. Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Ogawa T. In vitro sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. Nat Prot. 2013;8(11):2098.
19. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006;27(19):3675-83.
20. Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. Translat Res. 2014;163(4):268-85.
21. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. J Cell Sci. 2003;116(16):3269-76.
22. Hadley MA, Byers SW, Suárez-Quian CA, Kleinman HK, Dym M. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. J Cell Biol. 1985;101(4):1511-22.
23. Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. Mol Cell Endocrinol. 2010;315(1-2):49-56.
24. Pöllänen PP, Kallajoki M, Risteli L, Risteli J, Suominen JJ. Laminin and type IV collagen in the human testis. Int J Androl. 1985;8(5):337-47.
25. Santamaria L, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Nistal M. Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. Int J Androl. 1990;13(2):135-46.
26. Hussein KH, Park KM, Kang KS, Woo HM. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. Mater Sci Eng C. 2016;67:766-78.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-05-17]