

# اثر محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در درمان ناباروری آزواسپرمیک القاء شده به وسیله بوسولفان در موش بالب-سی

احمد مظفر<sup>۱\*</sup>، داود مهربانی<sup>۲</sup>، اکبر وحدتی<sup>۱\*</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>۱\*</sup>، محسن فروزان فر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران، <sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، <sup>۳</sup>مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، <sup>۴</sup>گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱۰/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۹

## چکیده

**زمینه و هدف:** تجویز داروهای شیمی‌درمانی در بیماران مبتلا به سرطان می‌تواند زمینه‌ساز ناباروری باشد، لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر محیط استفاده شده در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (سیکریتا) در درمان ناباروری آزواسپرمیک القاء شده به وسیله بوسولفان در موش بالب-سی انجام گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۱۸ سر موش سوری از نژاد بالب - سی به صورت تصادفی به سه گروه کنترل، آزواسپرمی و سیکریتا تقسیم شدند. حیوانات گروه کنترل هیچ‌گونه تیمار دارویی دریافت نکردند. برای توقف اسپرماتوژنز و القای آزواسپرمی دو دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) با فاصله ۲۱ روز به موش‌های گروه آزواسپرمی و سیکریتا تزریق شد. ۲۵ روز بعد از آخرین تزریق بوسولفان، محیط استفاده شده در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به درون بیضه موش‌های گروه سیکریتا تزریق گردید. هشت هفته پس از تزریق محیط کشت، بیضه‌های تمامی حیوانات جدا گردید و تحت بررسی هیستولوژیک و هیستومورفومتریک قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** یافته‌های هیستولوژیک نشان داد، در گروه آزواسپرمی، سلول‌های اسپرماتوژنیک به شدت کاهش یافته بود و فضاهای واکوئله در اپیتلیوم زایا مشاهده گردید. پس از درمان با سیکریتا بهبود لایه اپیتلیوم زایا و فرایند اسپرماتوژنز مشاهده شد. همچنین یافته‌های هیستومورفومتریک نشان داد که ضخامت و مساحت سلولی، قطر کلی، مساحت مقطع عرضی و شاخص اسپرماتوژنز لوله‌های منی‌ساز در گروه سیکریتا نسبت به گروه آزواسپرمی افزایش داشت ( $p < 0/001$ )، اما نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ( $p < 0/05$ ). همچنین تعداد و تراکم عددی لوله‌های منی‌ساز در گروه کنترل و سیکریتا نسبت به گروه آزواسپرمی کاهش داشت ( $p < 0/001$ )، در هر سه گروه، قطر و مساحت لومنی لوله‌های منی‌ساز اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** محیط استفاده شده در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (سیکریتا) می‌تواند موجب بازگشت اسپرماتوژنز در موش‌های آزواسپرمیک القاء شده به وسیله بوسولفان شود. این یافته‌ها می‌تواند به یافته‌های پیشین در درمان ناباروری جنس نر اضافه گردند.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سیکریتا، بوسولفان، آزواسپرمی

\*نویسنده مسئول: داود مهربانی، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی

Email: mehrabad@sums.ac.ir

## مقدمه

یکی از مشکلات جامعه بشری امروز معضل ناباروری است. به طور تقریبی حدود ۱۰ الی ۱۵ درصد ناباروری ایجاد شده در مردان به دلیل آزواسپرمی<sup>(۱)</sup> انسدادی و یا غیر انسدادی می باشد (۱). امروزه تلاش‌های بسیاری برای درمان آزواسپرمی به خصوص نوع غیر انسدادی آن در حال انجام می باشد (۲). سرطان یکی از بیماری‌های شایع در سراسر جهان به حساب می آید که در بسیاری از موارد جهت درمان آن از روش شیمی‌درمانی با داروهایی نظیر بوسولفان استفاده می شود (۳). یکی از اثرات نامطلوب شیمی‌درمانی با داروی بوسولفان اختلال در روند اسپرماتوژنز و عارضه آزواسپرمی می باشد (۳).

بوسولفان (با نام تجاری Busilvex) یک داروی آلکلیله کننده دو عاملی است که با اتصال به زنجیره DNA باعث مهار تقسیم سلولی می گردد (۴). این دارو به عنوان یک عامل شیمی‌درمانی در دوز پایین به صورت طولانی مدت در درمان لوسمی میلوئید مزمن یا در دوز بالا پیش از پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان در درمان گونه‌های دیگری از سرطان مورد استفاده قرار می گیرد (۵-۸). مشخص گردیده است که تجویز بوسولفان باعث بالا رفتن میزان آپوپتوزیس و کاهش وزن بیضه ها می گردد (۹). اثرات سوء بوسولفان به عنوان یک داروی ضد سرطان بر روی فرایند اسپرماتوژنز مشخص گردیده است (۱۰ و ۱۱). عقیده بر این است که اختلال ایجاد شده در اسپرماتوژنز پس از درمان با بوسولفان به دلیل

خاصیت آلکلیله کنندگی آن و اثر بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی می باشد (۱۰).

امروزه برای درمان ناباروری مردان از روش‌های مختلفی از جمله سلول‌درمانی با استفاده از سلول‌های زایا و یا سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می شود (۱۲). در میان روش‌های مختلف سلول‌درمانی استفاده از سلول‌های بنیادی برای بازگرداندن ساختار یا عملکرد بافت آسیب دیده بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۳ و ۱۴). منابع مختلفی برای سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار می گیرد از جمله سلول‌های بنیادی جنینی یا سلول‌های بنیادی پرتوان، اما استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل سهولت در دسترسی و کار با آن مورد توجه بسیار است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی می تواند از منابع مختلفی مانند مغز استخوان، بافت چربی، پالپ دندان و خون قاعدگی که همگی توانایی بالایی برای تمایز به بافت‌های مختلف از خود نشان داده‌اند به دست آیند (۱۸-۱۴). در این میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به دلیل توانایی بالا در تمایز به انواع رده‌های سلولی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۱۹ و ۲۰).

این سلول‌ها برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده مورد استفاده قرار می گیرند و هم چنین قادر به تولید عواملی هستند که باعث تحریک ترمیم سلول‌های اسپرماتوگونی می شوند (۱۳). محیط کشت رویی

1- Azoospermia

داده شد که محیط کشت حاصل از سلول اجدادی اندوتلیال می‌تواند در ترمیم آسیب حاصل از سکتة در قلب مؤثر باشد (۲۵) همچنین مشخص شده است که محیط کشت رویی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (سیکریتا) می‌تواند در ترمیم و التیام ضایعات غضروفی ناشی از ساییدگی زانو مؤثر واقع شود (۲۲). در مطالعه دیگری بیان گردید که محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی باعث تخفیف آسیب ناشی از جنتامایسین بر کلیه می‌گردد (۲۶).

اگرچه در زمینه ترمیم عوارض ناشی از شیمی درمانی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی بیضه گونه‌های مختلف تحقیقاتی صورت گرفته، اما تاکنون اثر محیط کشت رویی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی ترمیم این نقیصه مورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر محیط استفاده شده در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در درمان ناباروری آزاواسپرمیک القاء شده به وسیله بوسولفان در موش بالب-سی انجام گردید.

#### روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۱۸ سر موش سوری نر بالغ نژاد بالب - سی در محدوده ی وزنی  $30 \pm 5$  گرم استفاده گردید. در طول دوره تحقیق، همه

حاصل از سلول‌های بنیادی یا سیکریتا به مایع فوقانی درون فلاسک با تراکم سلولی بالا اطلاق می‌گردد که حاوی محیط DMEM<sup>(۱)</sup>، سرم جنین گاوی<sup>(۲)</sup> و آنتی بیوتیک‌های لازم بوده و از خصوصیات دیگر آن می‌توان به وجود فاکتورهای رشد سلولی اشاره کرد (۲۰).

استفاده از سلول‌های بنیادی در فرآیند درمان در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته، در مطالعه‌هایی که بر روی عوارض ناشی از دیابت بر روی کبد انجام گردید مشخص شد استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان باعث بهبود فرایند ترمیم در کبد می‌گردد (۲۰). همچنین در پژوهشی دیگر نشان داده شد که استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌تواند عوارض ناشی از سکتة قلبی در خوک را بهبود دهد و در ترمیم بافت صدمه دیده نقش مثبتی ایفا نماید (۲۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در ترمیم ضایعات ناشی از ساییدگی در زانوی خوکچه هندی باعث بهبود عوارض بافتی گردید (۲۲).

در مطالعه‌های اخیر مشخص گردیده که استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی پرتوان می‌تواند در کاهش التهاب در ریه و بهبود فرایند ترمیم این اندام در بیماران دچار ضایعه تنفسی مؤثر باشد (۲۳). همچنین محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند در ترمیم آسیب کبدی مؤثر باشد (۲۴). در پژوهش دیگری نشان

1- Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)

2-Fetal Bovine Serum (FBS)

حیوانات از آب و غذای یکسان بدون محدودیت برخوردار بوده و در محیط کنترل شده در دمای  $22 \pm 2$  درجه سلسیوس، در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در آزمایشگاه مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز نگهداری شدند. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حمایت از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی ثبت گردید.

در این مطالعه حیوانات به طور تصادفی به سه گروه کنترل، آزواسپرمی و سیکریتا تقسیم شدند. حیوانات گروه کنترل تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. به منظور تخریب اسپرماتوزن و القای آزواسپرمی، حیوانات گروه آزواسپرمی و سیکریتا تحت تیمار ۲ تزریق درون صفاقی بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن با فاصله ۲۱ روز قرار گرفتند، ۳۵ روز بعد از آخرین تزریق بوسولفان، محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مغز استخوان به درون بیضه موش‌های گروه سیکریتا تزریق گردید و بعد از گذشت هشت هفته از تزریق محیط کشت، تمام حیوانات بعد از بیهوشی به وسیله اتر کشته شدند و نمونه گیری از آنها انجام گردید.

در این مطالعه برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان یک عدد موش سوری نر بالغ از نژاد بآلب - سی را پس القای بیهوشی عمیق با اتر و جابجایی استخوان گردن برای نمونه‌گیری آماده کرده و با رعایت شرایط استریل با ایجاد برشی در ناحیه شکمی استخوان ران را خارج نموده و پس از

تمیز کردن بافت عضله از روی استخوان‌ها، آنها را در لوله فالكون حاوی بافر فسفات سدیم و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین و ضد قارچ آمفوتریسین قرار داده شد. لوله‌های حاوی استخوان‌های درشت نی بر روی یخ به زیر هود منتقل گردید.

دو انتهای استخوان جدا گردید و با تزریق محیط DMEM فاقد سرم جنین گاوی و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرومایسین مغز استخوان خارج گردید، سپس فالكون محیط حاوی سلول‌های مغز استخوان به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از این کار فاز رویی به وسیله پیپت برداشته و محیط DMEM به رسوب تشکیل شده در کف فالكون اضافه شده و سپس سوسپانسیون سلولی به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی که حاوی محیط کشت DMEM با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین بود، منتقل گردید و فلاسک در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و رطوبت استاندارد و غلظت ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفت.

محیط کشت پس از ۲۴ ساعت اولیه و سپس هر ۷۲ ساعت با رعایت شرایط استریل تعویض گردید. پس از افزایش تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک تا ۸۰ درصد عمل پاساژ با کمک آنزیم تریپسین انجام گردید و سلول‌ها سه بار پاساژ داده شدند (۱۴). بدین ترتیب که با استفاده از تریپسین تهیه شده از شرکت گیبکو کشور آلمان در مدت سه دقیقه

منیزیم، ۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلی‌مراز تک و هم چنین بافر PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) در دستگاه ترمال سایکلر با دما و زمان دهی؛ واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه سپس واسرشتگی هرچرخه ۹۵ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به توالی هدف در cDNA ۵۷ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، امتداد و ساخت رشته جدید ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و تکرار سه مرحله آخر برای ۳۰ دوره، و سپس برای امتداد نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار گرفت.

در مرحله بعد الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید صورت گرفته و باندهای به دست آمده مورد ارزیابی قرار گرفت.

پس از آنکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۸۰ درصد سطح فلاسک را پوشاندند برای تمایز آنها به استخوان، آنها را به مدت ۳ هفته در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰ میلی‌مولار گلیسرول فسفات، ۲۰۰ میکرومولار اسکوربیک اسید، ۱۰۰ نانومولار دکزامتازن کشت داده شدند، محیط کشت تمایز بافت استخوان دوبار در هفته عوض گردید. سپس با رنگ آمیزی آلزارین رد تمایز سلول‌ها به بافت استخوان مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که پس از تخلیه محیط رویی،

سلول از کف ظرف کشت جدا شدند. برای خنثی سازی اثر تریپسین، ۲ میلی لیتر محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد به فلاسک افزوده گردید. سلول‌های جدا شده از محیط کشت تحت عنوان پاساژ اول نامیده شد و این اعمال تا پاساژ سوم ادامه یافت. در پاساژ سوم زمانی که سلول‌های چسبیده به کف ظرف ۸۰ درصد سطح را پوشاندن محیط کشت رویی (سیکریتا) قبل از جدا کردن سلول‌ها با دقت و رعایت شرایط استریل بوسیله پیپت از فلاسک جمع‌آوری شد. برای اثبات حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط و عدم وجود سلول‌های بنیادی هماتوپیتیک (خونساز) در این مطالعه، از واکنش زنجیره پلی‌مراز با رونوشت برداری معکوس (RT-PCR)<sup>(۱)</sup> استفاده شد.

در این راستا حضور CD<sub>90</sub> که از پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است و عدم حضور CD<sub>34</sub> و CD<sub>45</sub> که از پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی خون ساز می‌باشند، در سطح mRNA مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار از سلول‌های موجود در پاساژ سوم استفاده گردید، در مرحله اول استخراج RNA به روش ستونی با کمک کیت شرکت تجهیز آزما (تهران، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. در مرحله دوم cDNA در واکنش رونویسی معکوس ساخته شد، سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترمال سایکلر با استفاده از ۲۰۰ میکرومول دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۲/۵ میکرومول cDNA، ۰/۵ میکرومول کلرید

1- Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شده و سپس سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با ۱ درصد آلزارین رد<sup>(۱)</sup> و ۱ درصد آمونیوم هیدروکساید<sup>(۲)</sup> انکوبه شد. و سپس ۴ بار هر بار با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه شستشو شده و سپس در دمای اتاق خشک گردید، در این رنگ‌آمیزی آلزارین رد با اتصال به یون‌های کلسیم حاصل از سلول‌های استئوبلاست در محیط کشت به صورت درخشان قابل تشخیص می‌باشد، کلیه مواد مورد استفاده قرار گرفته در فرایند تمایز از شرکت سیگماآلدریج، آمریکا تهیه شد.

برای تزریق محیط کشت به درون بیضه‌ی موش‌ها، پس از بیهوش نمودن آنها با کتامین و زایلازین، سطح شکمی آنها برای جراحی آماده گردید و سپس با ایجاد شکاف ۲ سانتی‌متری در ناحیه شکم دسترسی به ناحیه صفاقی فراهم شد، سپس با احتیاط بدون آسیب زدن به مجرای اپیدیدیم، بیضه را به وسیله یک سوزن از بافت چربی جدا کرده و با کمک یک پیپت محیط کشت (۱۰۰ میکرولیتر) مشخص شده با رنگ تریپان بلو (به نسبت ۱:۱) را به درون مجرای آوران<sup>(۳)</sup> تزریق گردید (شکل ۱). سپس بیضه را به محل قبلی خود بازگردانده و شکاف ایجاد شده در صفاق و پوست حیوان بخیه گردید.

پس از گذشت هشت هفته از تزریق محیط کشت، بیضه‌های همه گروه‌ها جمع‌آوری شد و پس از تثبیت با فرمالین ۱۰ درصد و طی مراحل برش بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسلین - ائوزین شمارش سلول

های اسپرما توگونی، اسپرما توسیت و اسپرما تید با استفاده از نرم افزار دینوکپچر<sup>(۴)</sup> انجام گردید و هم چنین ۹ شاخص هیستومورفومتریک لوله‌های منی‌ساز بیضه شامل قطر کلی و لومنی، مساحت لومنی، ضخامت و مساحت سلولی، مساحت مقطع عرضی، تعداد و تراکم لوله‌های منی‌ساز بر واحد سطح بیضه و شاخص اسپرما توژنز لوله‌های منی‌ساز مطابق با روش پناهی و همکاران اندازه‌گیری شدند<sup>(۲۷)</sup>. قطر کلی لوله‌های منی‌ساز از مجموع و سپس میانگین دو قطر عمود بر هم از یک طرف غشای پایه تا طرف دیگر محاسبه شد. مشابه با قطر کلی، قطر لومنی لوله‌های منی‌ساز نیز براساس اندازه‌گیری فضای لومنی به دست آمد. ضخامت سلولی از اختلاف قطر کلی و لومنی و سپس میانگین آن‌ها اندازه‌گیری شد. مساحت سلولی لوله‌های منی‌ساز از ضرب عدد  $\pi(۳.۱۴)$  در مجذور ضخامت سلولی محاسبه گردید. مساحت لومنی نیز از ضرب عدد  $\pi$  در مجذور قطر لومنی تقسیم بر عدد ۴ اندازه‌گیری شد. مساحت مقطع عرضی (Ac)<sup>(۵)</sup> براساس فرمول  $Ac = \pi D^2 / 4$  به دست آمد که D قطر کلی است. با توجه به رابطه  $Nv = NA / (D+T)$ ، تراکم عددی لوله‌های منی‌ساز محاسبه شد که در این رابطه NA تعداد لوله‌های منی‌ساز در واحد سطح بیضه، D قطر کلی و T ضخامت سطح مقطع می‌باشد. شاخص اسپرما توژنز براساس توانایی

1- Alizarin Red  
2-Ammonium Hydroxide  
3-Efferent duct  
4-Dinocapture 2  
5-Cross-sectional area

بنیادی خون‌ساز (CD34 و CD45) مشخص گردید (شکل ۲). در بررسی مورفولوژیک، سلول‌ها در پاساژ سوم، ظاهری دوکی شکل و فیروپلاستی داشتند که از خصوصیات اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است (شکل ۳.A). ۲۱ روز پس از کشت سلول‌ها در محیط استئوژنیک، حضور رسوبات معدنی به علت تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست‌ها با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد مشاهده شد (شکل ۳.B).

یافته‌های هیستولوژیک نشان داد که در گروه کنترل، اسپرماتوژنز به صورت کامل در حال انجام بود و انواع سلول‌های اسپرماتوژنیک به همراه سلول‌های سرتولی در لوله‌های منی‌ساز مشاهده گردید. در گروه آزواسپرمی، سلول‌های اسپرماتوژنیک به شدت کاهش یافته بود و فضاهای واکوئل در اپیتلیوم زایا مشاهده شد. تعداد اندکی از سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی غشای پایه قرار داشتند و سلول‌های سرتولی قابل مشاهده بودند و اسپرماتوژنز به طور کامل تخریب شده بود. در گروه سیکریتا فضای واکوئل از بین رفته بود و در اکثر لوله‌های منی‌ساز انواع رده‌های سلولی شامل: اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم وجود داشت و ضخامت سلولی اپیتلیوم زایا نسبت به گروه آزواسپرمی افزایش زیادی داشت، اما نسبت به گروه کنترل ضخامت سلولی اپیتلیوم زایا نسبتاً کاهش یافته بود و تعداد اسپرماتید کمتری مشاهده گردید (شکل ۴).

اسپرماتوژنزی لوله‌های منی‌ساز و شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک محاسبه گردید که بر این اساس هر لوله منی‌ساز مطابق زیر با مقیاس ۰-۶ رتبه بندی شدند؛ ۰) عدم حضور سلول‌های اسپرماتوژنیک، ۱) فقط سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها، ۲) سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌ها، ۳) سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای گرد و تعداد کمتر از ۵۰ اسپرماتید دراز، ۴) سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای گرد و بیش از ۵۰ تا ۷۵ اسپرماتید دراز، ۵) سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدهای گرد و بیش از ۷۵ تا ۱۰۰ اسپرماتید دراز، و ۶) حضور تمام سلول‌های اسپرماتوژنیک و بیش از ۱۵۰ اسپرماتید دراز در هر لوله منی‌ساز بیضه (۲۷).

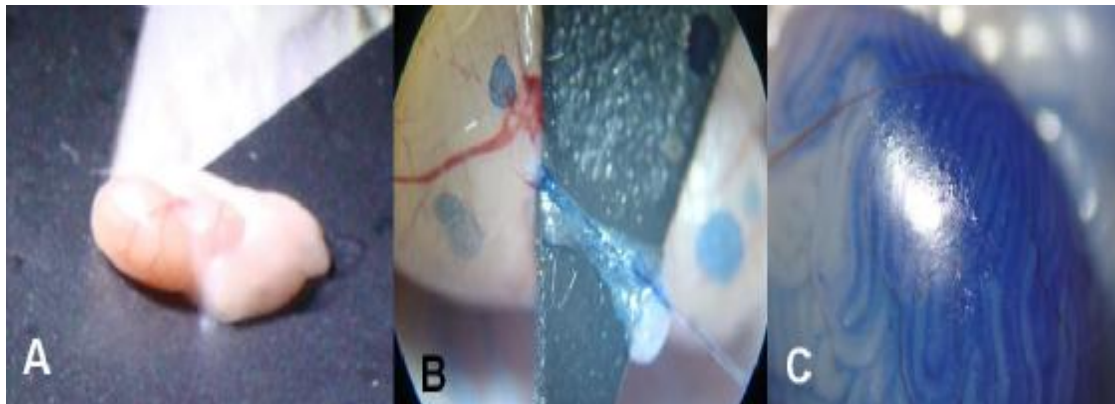
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه، توکی و من‌ویننی تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که پس از بررسی فاکتورهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به وسیله تست RT-PCR، وجود مارکر سطحی مختص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (CD90) و هم چنین عدم حضور فاکتورهای سطحی سلول‌های

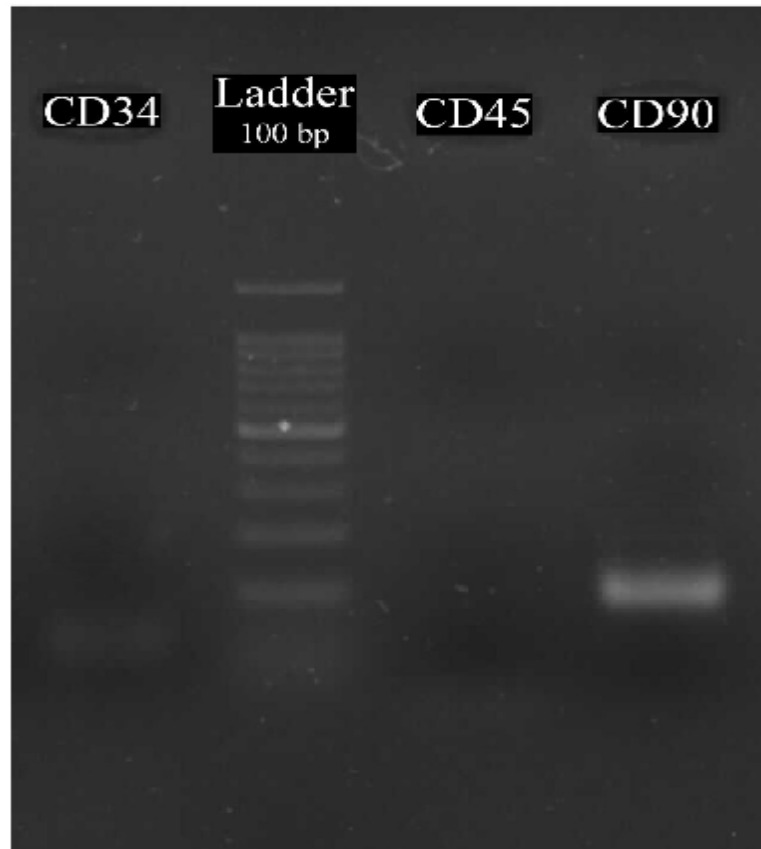
اما هر دو شاخص در گروه سیکریتا نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری ( $p > 0.05$ ) نداشت (جدول ۲). گروه کنترل بدون مداخله درمانی. گروه آزواسپرمی و محیط کشت دو دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به فاصله ۲۱ روز به صورت درون صفاقی دریافت کردند. گروه محیط کشت ۲۵ روز پس از آخرین تزریق بوسولفان، محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت مغز استخوان (سیکریتا) از طریق تزریق به درون بیضه دریافت کردند. a,b,c: حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد؛ \*نشان دهنده سطح معنی دار  $p < 0.05$ ; \*\* نشان دهنده سطح معنی دار  $p < 0.001$ .

یافته‌های هیستومورفومتریک نشان داد که که اختلاف معنی داری ( $p > 0.05$ ) در قطر و مساحت لومنی لوله‌های منی‌ساز در هر سه گروه وجود ندارد. قطر کلی، ضخامت و مساحت سلولی، مساحت مقطع عرضی و شاخص اسپرما توژنز لوله‌های منی‌ساز در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل و سیکریتا کاهش معنی داری ( $p < 0.001$ ) داشت. قطر کلی، ضخامت و مساحت سلولی، مساحت مقطع عرضی و شاخص اسپرما توژنز لوله‌های منی‌ساز در گروه سیکریتا نیز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ( $p < 0.05$ ) نشان داد. تعداد لوله‌های منی‌ساز در واحد سطح و تراکم عددی لوله‌های منی‌ساز در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل و محیط کشت دارای افزایش معنی داری ( $p < 0.001$ ) بود.

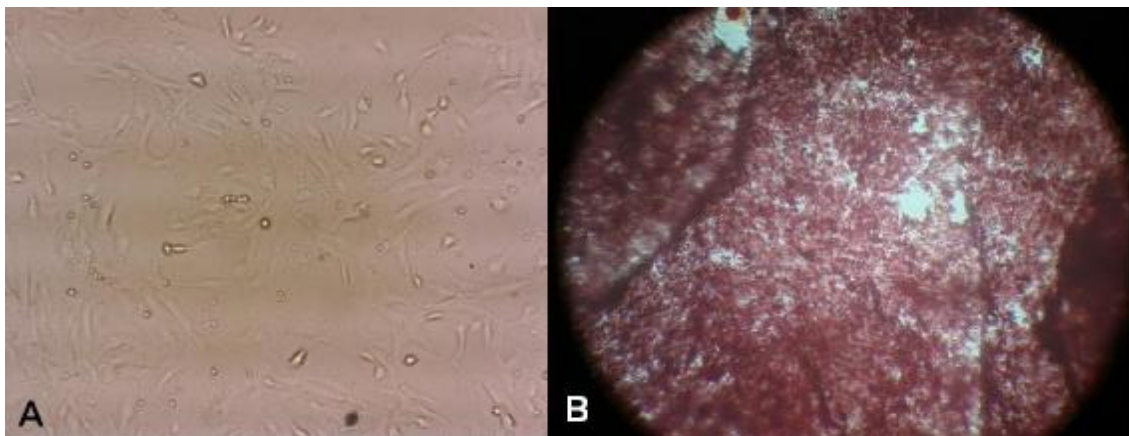


شکل ۱: مراحل تزریق محیط سیکریتا به بیضه موش بالب-سی؛ تثبیت بیضه (A)، تثبیت مجرای آوران برای سهولت تزریق (B)، تزریق محیط کشت مشخص شده با رنگ تریپان بلو به درون لوله‌های منی‌ساز (C)

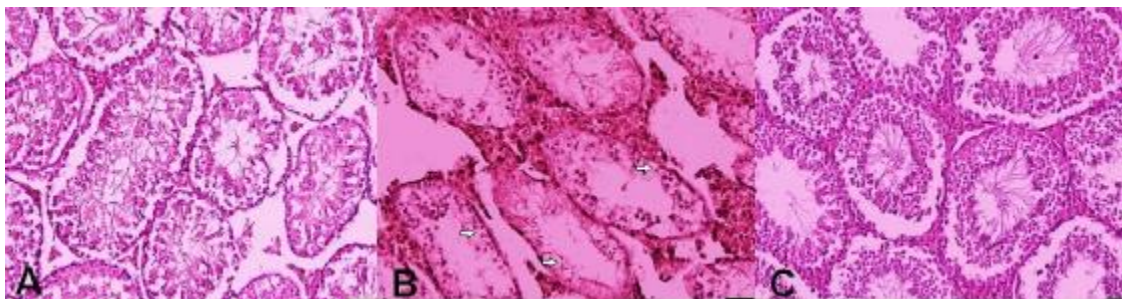




شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR بیان مارکر CD90 و عدم بیان مارکهای هماتوپویتیک CD45 و CD34



شکل ۳: ظاهر دوکی شکل سلولهای کشت داده شده (A)، تمایز سلولهای کشت داده شده به بافت استخوان (B) بیانگر ماهیت مزانشیمی سلولهای بنیادی استفاده شده در تحقیق می‌باشند.



**شکل ۴: میکروگراف بافت بیضه در گروه های مختلف با بزرگ نمایی 100x و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین: در گروه کنترل فعالیت اسپرماتوژنز به صورت کامل می باشد و تمام رده های اسپرماتوژنیک حضور دارند (A)، در گروه آزواسپرمی فضای لومنی وسیع شده و فضاهای واکوئل در اپیتلیوم زایا قابل مشاهده است (نوک پیکان ها)، اسپرماتوژنز به صورت کامل تخریب شده است (B)، در گروه سیکریتا اسپرماتوژنز فعال قابل مشاهده است. فضای واکوئلی از بین رفته و رده های سلولی اسپرماتوژنیک دیده می شوند. (C) نوار سیاه پایین عکس معادل ۵۰ میکرومتر است.**

**جدول ۱: توالی پرایمر های استفاده شده جهت شناسایی مارکرهای سلولی**

نام ژن	توالی الیگونوکلوئیدی
CD34 - F	AATGAGTCTGTTGAGGAA
CD34- R	CTGTCTGAAGTAGTAGGC
CD45- F	AAGTGGATGCTATGGTTA
CD45- R	GAAGGAAGTCTCTGGTAT
CD90- F	GAAGACAAGGAGCCAGAAC
CD90- R	GCAAGGGAAAGAATAAAGG

توالی پیشرو (F) و پیرو (R) پرایمر های مورد استفاده در آزمایش

**جدول ۲: مقایسه یافته های هیستومورفومتریک در گروه های مورد آزمایش**

متغیر	گروه های آزمایش	کنترل	آزواسپرمی	محیط کشت (سیکریتا)
قطر لومن (میکرومتر)	۹۲/۱۴±۲/۶۲ <sup>a</sup>	۹۷/۲۲±۱/۷۴ <sup>a</sup>	۹۱/۹۱±۸۶/۸۹ <sup>a</sup>	
مساحت لومن (میکرومتر مربع)	۷۱۵۲/۹۷±۴۳۳/۱۳ <sup>a</sup>	۷۶۳۹/۸۷±۲۵۷/۵۲ <sup>a</sup>	۷۰۸۲/۷۸±۴۱۶/۷۴ <sup>a</sup>	
قطر کلی (میکرومتر)	۲۲۹/۸۶±۳/۹ <sup>a</sup>	۱۲۱/۹۲±۱/۴۵ <sup>b**</sup>	۲۱۵/۴۱±۲/۹۸ <sup>c*</sup>	
ضخامت سلولی (میکرومتر)	۶۸/۸۶±۱/۶۵ <sup>a</sup>	۱۲/۳۴±۰/۵۶ <sup>b**</sup>	۶۱/۷۵±۱/۳۰ <sup>c*</sup>	
مساحت سلولی (μm <sup>2</sup> )	۱۵۶۶۲/۷۶±۷۰۸/۴۰ <sup>a</sup>	۵۶۷/۴۵±۵۹/۵۲ <sup>b**</sup>	۱۲۴۶۰/۴۹±۵۰۱/۳۶ <sup>c*</sup>	
مساحت مقطع عرضی بر واحد سطح (میکرومتر مربع)	۴۲۵۷۱/۴۴±۱۴۵۳/۵۲ <sup>a</sup>	۱۱۸۲۴/۴۰±۲۸۴/۵۹ <sup>b**</sup>	۳۷۰۷۵/۵۶±۱۰۲۵/۲۵ <sup>c*</sup>	
تعداد لوله های منی ساز (میلی متر مربع)	۷/۵۵±۰/۰۶ <sup>a</sup>	۱۴/۷۸±۰/۴۱ <sup>b**</sup>	۷/۲۷±۰/۱۵ <sup>a</sup>	
تراکم عددی لوله های منی ساز	۰/۰۳±۰/۰۰۶ <sup>a</sup>	۰/۱۱±۰/۰۰۳۵ <sup>b**</sup>	۰/۰۳±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	
شاخص اسپرماتوژنز	۶/۱۷±۰/۰۹ <sup>a</sup>	۱/۷۳±۰/۰۴ <sup>b**</sup>	۵/۹۲±۰/۰۲ <sup>a</sup>	

## بحث

نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر بهبود قابل توجه فرایند اسپرماتوزنز و شاخص‌های بافتی بیضه در نمونه‌های تحت درمان با محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نسبت به گروه آزو اسپرمیک القاء شده با بوسولفان می‌باشد. در این پژوهش از دو دوز بوسولفان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به فاصله ۲۱ روز استفاده شد که در مطالعه‌های قبلی در موش صحرایی و همستر نشان داده است که می‌تواند باعث از بین رفتن اپیتلیوم زایا و تخریب اسپرماتوزنز شود (۲۷).

در زمینه درمان عوارض ناشی از بوسولفان بر روی فرایند اسپرماتوزنز به وسیله سلول‌های بنیادی تحقیقات مختلفی انجام گردیده است. به عنوان مثال در بررسی اثر درمانی تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در درمان آزو اسپرمی ناشی از بوسولفان در حیواناتی نظیر همستر و موش صحرایی بیانگر بهبود قابل ملاحظه فرآیند اسپرماتوزنز در این حیوانات بود (۲۸ و ۲۹) در تحقیق‌های دیگری اثر تزریق سلول‌های بافت چربی در آزو اسپرمی ناشی از بوسولفان در موش صحرایی نتایج مشابه از بهبود را نشان داد (۳۰). همچنین سلول‌های بنیادی در بسیاری از موارد برای کاهش التهاب و عوارض ناشی از آن استفاده می‌شوند و به همین دلیل استفاده از این سلول‌ها برای مقابله با بیماری‌های خود ایمنی رو به افزایش است (۳۱). از آن جا که سوالات زیادی مطرح است که آیا خود سلول‌های

بنیادی قابلیت ترمیم و تبدیل به بافت صدمه دیده را دارند و یا این که محیطی مناسب برای ترمیم این بافت‌ها را فراهم می‌کنند، محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی به بررسی اثرات درمانی آن بپردازند.

مطالعه‌های پیشین نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی فاکتورهای گوناگونی را در محیط کشت رها می‌کنند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای رشد استحال‌های بتا<sup>(۱)</sup>، هپاتوسیتی<sup>(۲)</sup>، کراتینوسیتی<sup>(۳)</sup>، فیبروبلاستی پایه<sup>(۴)</sup>، اندوتلیال عروقی<sup>(۵)</sup> و سیتوکین‌ها اشاره نمود (۳۲). در تحقیقی که بر روی اثر درمانی محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان ساییدگی زانو در خوکچه هندی ترمیم قابل توجه آسیب بافتی مشاهده گردید (۲۲) در یک مطالعه در رابطه با اثر درمانی محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در درمان آسیب حاد کلیوی ناشی از جنتامایسین در موش صحرایی نشان داده شد که این محیط بر روی بافت کلیه دارای اثرات محافظتی است (۳۳).

ژو و همکاران با بررسی اثر درمانی محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در التیام زخم دریافتند که استفاده از سیکریتا باعث بیان mRNA کلژن نوع ۳ تا ۲/۶ برابر بیشتر از گروه کنترل

- 1- Transforming growth factor beta (TGF-β)
- 2- Hepatocyte growth factor (HGF)
- 3- Keratinocyte growth factor (KGF)
- 4- Basic fibroblast growth factor (bFGF)
- 1- Vascular endothelial growth factor (VEGF)

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تزریق محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (سیکریتا) می‌تواند موجب بهبود و ترمیم فرآیند اسپرما توژنز در موش‌های آزواسپرمیک القاء شده به وسیله بوسولفان گردد. امید است که در آینده با انجام مطالعه‌های بیشتر در این زمینه، بتوان از این روش در جهت درمان بیماران آزواسپرمی استفاده کرد.

### تقدیر و تشکر

این پژوهش حاصل از رساله دکترای دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز است که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است.

می‌گردد که این امر خود باعث بهبود سریع تر زخم در گروه درمان نسبت به گروه کنترل می‌گردد (۲۹) و در مورد دیگر استفاده از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان عارضه‌های قلبی پس از سکته مفید واقع شده است (۳۴).

فوکوآکا و همکاران با بررسی اثر محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی چربی بر روی فولیکول‌های مو نشان دادند که این کار باعث بهبود فرآیند ترمیم می‌شود (۳۵). تحقیق‌های متعددی نشان داده است که محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی حاوی فاکتورهای رشد و هم‌چنین سیتوکین‌های مختلفی است که در فرآیند ترمیم می‌تواند مؤثر باشد (۳۶-۴۰). استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی به دلیل سهولت در نگهداری، ذخیره و جا به جایی نسبت به سلول‌های بنیادی و هم‌چنین احتمال کمتر ایجاد واکنش‌های ایمنی می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده در ترمیم‌های بافتی باشد، به همین دلیل امروزه استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی در ترمیم عوارض مختلف مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۴۱).

از جمله محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به کوتاه بودن دوره درمان و عدم بررسی پارامترهای اسپرمی اشاره نمود، لذا پیشنهاد می‌گردد در مطالعه‌های بعدی جهت حصول نتایج بهتر دوره درمان طولانی‌تر انتخاب شود و پارامترهای مختلف اسپرم مورد ارزیابی قرار گیرد.

## REFERENCE

1. Gudeloglu A, Parekattil SJ. Update in the evaluation of the azoospermic male. *Clinics Sao Paulo* 2013; 68(1): 27-34.
2. Zhang D, Liu X, Peng J, He D, Lin T, Zhu J, et al. Potential spermatogenesis recovery with bone marrow mesenchymal stem cells in an azoospermic rat model. *Int J Mol Sci* 2014; 15(8): 13151-65.
3. Vassilakopoulou M, Boostandoost E, Papaxoinis G, de La Motte Rouge T, Khayat D, Psyrrri A. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. *Crit Rev OncolHematol* 2016; 97(1): 328-34.
4. Iwamoto T, Hiraku Y, Oikawa S, Mizutani H, Kojima M, Kawanishi S. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3 sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Sci* 2004; 95(5): 454-58.
5. Suttrop M, Millot F. Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. *ASH Education Program Book* 2010: 368-76.
6. Krivoy N, Hoffer E, Lurie Y, Bentur Y, Rowe JM. Busulfan use in hematopoietic stem cell transplantation: pharmacology, dose adjustment, safety and efficacy in adults and children. *Curr Drug Saf* 2008; 3(1): 60-6.
7. Le Bourgeois A, Lestang E, Guillaume T, Delaunay J, Ayari S, Blin N, et al. Prognostic impact of immune status and hematopoietic recovery before and after fludarabine, IV busulfan, and antithymocyte globulins (FB2 regimen) reduced-intensity conditioning regimen (RIC) allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). *Eur J Haematol* 2013; 90(3): 177-86.
8. Nieto Y, Thall P, Valdez B, Andersson B, Popat U, Anderlini P, et al. High-dose infusional gemcitabine combined with busulfan and melphalan with autologous stem-cell transplantation in patients with refractory lymphoid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18(11): 1677-86.
9. Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL-and p53-independent manner. *FEBS Lett* 2004; 575(1-3): 41-51.
10. Jansz GF, Pomerantz DK. The effect of prenatal treatment with busulfan on in vitro androgen production by testes from rats of various ages. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63(9): 1155-8.
11. Grigg A.P, McLachlan R, Zaja J, Szer J. Reproductive status in long-term bone marrow transplant survivors receiving busulfan-cyclophosphamide (120mg/kg), *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(10): 1089-95.
12. O'Brien KLF, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 1-12.
13. Leatherman J. Stem cells supporting other stem cells. *Front Genet* 2013; 4(12): 257-62.
14. Asadi-Yousefabad SL, Khodakaram-Tafti A, Dianatpour M, Mehrabani D, Zare S, Tamadon A, et al. Genetic evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by a modified karyotyping method. *Comp Clin Pathol* 2015; 24(11): 1361-6.
15. Shaterzadeh-Yazdi H, Mehrabani D, Khodakaram-Tafti A, Dianatpour M, Zare SH, Tamadon A, et al. Osteogenic potential of subcutaneous adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Online J Vet Res* 2015; 19(6): 436-45.
16. Lin F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a fat chance of curing kidney disease?. *Kidney Int* 2012; 82(7): 731-3.
17. Mehrabani D, BahramiNazarabadi R, Dianatpour M, Vahdati A, Tamadon A, Kasraeian M, et al. Growth kinetics, characterization and plasticity of human menstrual blood stem cells. *Iran J Med Sci* 2016; 41(2): 132-9.
18. Mahdiyar P, Zare S, Robati R, Dianatpour M, Torabi K, Tamadon A, et al. Isolation, culture, and characterization of human dental pulp mesenchymal stem cells. *Int J Pediatr* 2014; 2: 44.
19. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 2011; 208(3): 421-8.
20. Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134(7): 2111-21.
21. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(32): 11474-9.

- 22.Sadraie MR, Mehrabani D, Vahdari A. Comparison of therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells and liquid culture environment (secretaria) in the treatment of induced knee abrasion created in Guinea Pigs. *YUMSJ* 2016; 20(8): 651-65.
- 23.Li LF, Liu YY, Yang CT, Chien Y, Twu NF, Wang ML, et al. Improvement of ventilator-induced lung injury by IPS cell-derived conditioned medium via inhibition of PI3K/Akt pathway and IP-10-dependent paracrine regulation. *Biomaterials* 2013; 34(1): 78-91.
- 24.Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 26; 2(9): e941.
- 25.Hynes B, Kumar AH, O'Sullivan J, Klein Buneker C, Leblond AL, Weiss S, et al. Potent endothelial progenitor cell-conditioned media-related anti-apoptotic, cardioprotective, and pro-angiogenic effects post-myocardial infarction are mediated by insulin-like growth factor-1. *Eur Heart J* 2013; 34(10): 782-9.
- 26.Abedi A, Azarnia M, Jamali Zahvarehy M, Foroutan T, Golestani S. Effect of different times of intraperitoneal injections of human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on gentamicin-induced acute kidney injury. *Urol J* 2016; 13(3): 2707-16.
- 27.Panahi M, Keshavarz S, Rahmanifar F, Tamadon A, Mehrabani D, Karimaghani N, et al. Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. *Vet Res Forum* 2015; 6(4): 273-8.
- 28.Rahmanifar F, Tamadon A, Mehrabani D, ZareSh, Abasi S, Keshavarz S, et al. Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoospermic seminiferous tubules by allotransplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(5): 653-61.
- 29.Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, RaayatJahromi A, Panahi M, Zare S, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamster. *Int J Stem Cells* 2015; 8(2): 134-45.
- 30.Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Bio Med Res Int* 2013; 2013: 529589.
- 31.Kamardi MT, Pourgholaminejad A, Eslaminejad MB, Sotoodehnejadnematalahi F. Mesenchymal stem cells and their application in autoimmune disease treatment: review article. *T U M J* 2014; 72(6): 341-51.
- 32.Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, et al. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 519126.
- 33.Abedi A, Azarnia M, Jamali M, Moayer F. Effect of conditioned media from human mesenchymal stem cells on acute kidney injury induced by gentamicin in rat. *Journal of Cell & Tissue (JCT)* 2014; 5(1): 39-52.
- 34.Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, et al. human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2011; 6(3): 206-14.
- 35.Fukuoka H, Suga H, Narita K, Watanabe R, Shintani S. The latest advance in hair regeneration therapy using proteins secreted by adipose-derived stem cells. *American Journal of Cosmetic Surgery* 2012; 29(4): 273-82.
- 36.Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, Fukuoka H. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res* 2010; 31(1): 27-34.
- 37.Ho JC, Lai WH, Li MF, Au KW, Yip MC, Wong NL, et al. Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28(5): 462-73.
- 38.Mirabella T, Cilli M, Carlone S, Cancedda R, Gentili C. Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials* 2011; 32(15): 3689-99.
- 39.Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 2009 21; 4(5): e5643.

40. See F, Seki T, Psaltis PJ, Sondermeijer HP, Gronthos S, Zannettino AC, et al. Therapeutic effects of human STRO-3-selected mesenchymal precursor cells and their soluble factors in experimental myocardial ischemia. *J Cell Mol Med* 2011; 15(10): 2117-29.

41. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 965849.

# The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Culture in the Treatment of Azoospermic Infertility induced by Busulfan Balb / C mice

Mozafar A<sup>1,2</sup>, Mehranani D<sup>3\*</sup>, Vahdati A<sup>1,2</sup>, Hosseini SE<sup>1,2</sup>, Forouzanfar M<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Islamic Azad University, Fars, Iran, <sup>2</sup> Department of Biology, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, <sup>3</sup> Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, <sup>4</sup> Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Received: 26 Dec 2016 Accepted: 30 Jun 2017

## Abstract

**Background & aim:** Prescribing chemotherapy drugs in patients with cancer can be the mainstay of infertility. Therefore, the aim of this study was to investigate The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Culture in the Treatment of Azoospermic Infertility induced by Busulfan Balb / C mice

**Methods:** In this experimental study, 18 mice of Balb-C race were randomly divided into control, azoospermic and secreta groups. The animals in the control group did not receive any drug treatment. To stop spermatogenesis and induction of azospermide, a dose of busulfan (10 mg / kg body weight) was injected to azoospermic and cyclic rats at intervals of 21 days. 35 days after the last injection of busulfan, the medium used for the culture of mesenchymal stem cells of the bone marrow was injected into the testis of the rat secreta group. Eight weeks after inoculation, the testicles of all animals were separated and histologically and histomorphologically examined. Data were analyzed by one-way ANOVA.

**Results:** Histologic findings showed that in the azoospermic group, the spermatogenic cells were significantly reduced, and the vacuoles were observed in the germinal epithelium. After treatment with secreta, the epithelium and spermatogenesis were observed. Also, histomorphometric findings showed that cell thickness and area, total diameter, cross-sectional area and spermatogenesis index of seminal tubes were increased in the secreta group compared to the azoospermic group ( $p < 0.001$ ), but decreased compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Also, the number and density of seminal tube in control group and secreta decreased compared to Azospermic group ( $p < 0.001$ ). There was no significant difference between lumen diameter and area of menises in all three groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The media used in the cultivation of bone marrow mesenchymal stem cells (Secreta) can cause spermatogenesis back in busulfan-induced azoospermic mice. These findings can be attributed to previous findings in male infertility treatment.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cells, Secreta, Busulfan, Azoospermia

---

**Corresponding author:** Mehrabani D, Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

**Email:** [mehrabad@sums.ac.ir](mailto:mehrabad@sums.ac.ir)

## Please cite this article as follows:

Mozafar A, Mehranani D, Vahdati A, Hosseini SE, Forouzanfar M. The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Culture in the Treatment of Azoospermic Infertility induced by Busulfan Balb / C mice. *Armaghane-danesh* 2017; 22 (3): 295-310.