

Mesenchymal stem cells differentiation into gamete germ cells by titanium nanotube particles and UV radiation induction

Saman Ebrahimi¹, Alireza Shams^{2*}, Parvaneh Maghami¹, Fatemeh Hekmat¹

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Anatomy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

* Corresponding author e-mail: dr.shams@abzums.ac.ir

Citation: Ebrahimi S, Shams A, Maghami P, Hekmat F. Mesenchymal stem cells differentiation into gamete germ cells by titanium nanotube particles and UV radiation induction. *Daneshvar Medicine* 2021; 29(3):1-16. doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14015.1046

Abstract

Background and Objective: Many of traditional infertility treatment methods due to lack of gamete are ineffective. Differentiation of stem cells to gamete germ cells may be a good choice for producing gametes for treatment of infertility in clinique.

Materials and Methods: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSc) were obtained from femoral bone of adult NMRI mice by flushing method. Nano tube particles of titanium (TNT), retinoic acid and UV beam 254 ± 20 nm frequencies were used for differentiation of MSc to gamete germ cells. Ultrastructure of TNT was studied with FEM SE electron microscope. Fibrin coating of Nano tubes was evaluated by SEM. Nature and character of stem cells were measured using cluster- differentiation- (CD) by flow cytometry confirmed by CD90, and CD31 markers. Finally, MVH marker was used for assessment of differentiation of MSc to gamete germ cells with immunohistochemistry assay. Statistical data was analyzed by ANOVA and Mann-Whitney tests.

Results: Electron microscopic pictures by FE SEM showed homogenous ultrastructure of titanium nanotubes in 10-15 nm diameters. Coating of TNT by fibrin was confirmed by SEM. MTT assay showed most survival rate of MSc cells in 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration of TNT. By CD90 and CD31 markers, nature of the stem cells was controlled by flow cytometry. Finally MVH marker expression showed differentiation of MSc to gamete germ cells in treated as compared to control groups and was confirmed by immunohistochemistry.

Conclusion: Application of TNT fibrin coated and UV beam can increase differentiation rate of BMMSc to gamete germ cells significantly as a clinical protocol.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Differentiation, Titanium nanotube, Ultraviolet, gamete germ cells

Received: 24 May 2021

Last revised: 11 Aug 2021

Accepted: 25 Aug 2021

تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال با القای ذرات نانو تیوب تیتانیوم و اشعه فرابنفش به سلول های جنسی

نویسندگان: سامان ابراهیمی^۱، علیرضا شمس^{۲*}، پروانه مقامی^۱، فاطمه حکمت^۱

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

Email: dr.shams@ abzums.ac.ir

*نویسنده مسئول: علیرضا شمس

چکیده

مقدمه و هدف: بسیاری از درمان های ناباروری به علت فقدان گامت های جنسی بیماران کارآمد نیستند. تمایز سلول های بنیادین به سلول های زایای جنسی می تواند گزینه مناسبی برای تولید گامت و کاربرد کلینیکی برای درمان ناباروری باشد.

مواد و روش ها: سلول های بنیادین مزانشیمال به روش فلاشینگ از استخوان ران موشهای بالغ نژاد NMRI تهیه گردید. از ذرات نانو تیوب تیتانیوم (TNT) titanium nanotube particles. پرتو UV با فرکانس $(254 \pm 20 \text{ nm})$ و رتینویک اسید برای تمایز استفاده شد. ویژگی ساختاری TNT و فیبرین با میکروسکوب FE- SEM و SEM ارزیابی شد. از مارکر های CD90, CD31 برای تایید ماهیت سلول ها و برای بیان زایایی سلولهای تمایز یافته جنسی از مارکر MVH استفاده شد. آزمون های ANOVA و Mann-Whitney برای تحلیل آماری داده ها بکار گرفته شد.

نتایج: ساختار یکنواخت TNT با ابعاد ۱۰-۱۵ نانومتر با کمک FE- SEM مشخص گردید. تصاویر SEM پوشیده شدن TNT روی فیبرین را نشان داد. در MTT بیشترین میزان بقای سلول ها در غلظت TNT 50 $\mu\text{g/ml}$ دیده شد. ماهیت سلول های بنیادین با بیان مارکر های اختصاصی با روش فلوسایتومتری مشخص گردید. رنگ آمیزی های Alizarin red رسوب کلسیوم و Oil red با تایید قطرات چربی ماهیت چند توانی سلول های بنیادی مزانشیمالی را اثبات کرد. با روش ایمنوهیستوشیمی بیان مارکر MVH در سلولهای تمایز یافته در گروه های درمانی نسبت به کنترل تایید گردید.

نتیجه گیری: کاربرد TNT و UV روی سلول های بنیادی مزانشیمال موجب افزایش معنی دار تمایز سلول های زایای جنسی می شود.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمال، تمایز، نانو تیوب تیتانیوم، پرتو فرابنفش، سلول زایای جنسی

مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳

آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۳

مقدمه

در منابع گزارش های اندکی برای تمایز خود به خود سلول های بنیادی به سلول های زایا وجود دارد. از جمله می توان به مطالعات **Danner** و همکاران در سال ۲۰۰۷ به تمایز خودبخودی سلول های بنیادی ناشی از پانکراس به سلول های تخمک مانند اشاره نمود (۱۰). **Antonucci** و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز با نمایش بیان مارکر اختصاصی این سلولها تمایز خود بخودی سلول های بنیادی ناشی مایع آمنیون به اجسام جنینی (PGCs)^۴ را گزارش نمود (۱۱). در مقابل مطالعات فراوانی در باره نقش القایی و اثر فاکتور های گوناگون شیمیایی در انجام تمایز انواع رده های سلول های بنیادی وجود دارد. **Hau** و همکاران در سال ۲۰۰۹ موفق شدند سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان **BMMSCs**^۵ را با استفاده از رتینویک اسید **RA** به سلول های زایا تمایز دهند (۱۲). برخی از محققین با استفاده ی همزمان از فاکتور های تمایزی مختلف سلول های بنیادین را به سلول های زایا تمایز داده اند. **Hajian Monfared** و همکاران با کاربرد همزمان **RA** و هم کشتی با سلول های سرتولی برای تمایز **MSCs** به سلول های زایا در محیط کشت استفاده کردند (۱۳). **RA** باعث بیان ژن های زایا مانند **Stra8** از طریق اتصال با گیرنده های هسته ای سلول می شود (۱۷-۱۴). استفاده **RA** در غلظت یک میکرو مولار موجب تمایز و در سایر مقادیر موجب مرگ سلولی در سلول های سرطانی جنینی رده **F9** می شود (۱۸). تغییر ویژگی های فیزیکی و شیمیایی در محیط کشت نیز می تواند به رشد و تمایز سلول های بنیادی کمک کند (۱۹). در خصوص نقش ویژگی های فیزیکی محیط کشت، بررسی تعدادی از تحقیقات در زمینه مهندسی بافت نشان داده که هنگام کشت رده های سلولی، شکل های متفاوت فیزیکی و یا نوع داربست های بکار رفته در تکثیر و بروز تمایز سلولها در محیط موثر است. نتایج جالبی در زمان استفاده از داربست با ساختار شبکه ای از ذرات فیبرین هیدروژل، در افزایش رشد، بقا و تمایز سلول های بنیادی در کشت های متوالی سلولی گزارش شده است (۲۰). علاوه بر تاثیر

ناباروری در تعریف به معنی عدم بارداری پس از یک سال آمیزش جنسی بدون جلوگیری است و این عارضه می تواند از هر شش زوج یک زوج را گرفتار کند. به عبارتی عوامل گسترده و متفاوتی مانند تاثیر فاکتورهای ناباروری مردانه و زنانه از جمله کمبود و یا فقدان گامت های جنسی می تواند منجر به ناباروری در ۱۵٪ از زوج ها گردد (۱،۲). امروزه انجام تکنیک های کمک باروری (ART)^۱ در کلینیک های ناباروری موجب کمک به درمان حدود ۸۰٪ از زوج های نابارور گردیده است (۳). در سال های اخیر تحقیقات متعددی برای درمان تمامی عوامل ناباروری و تولید سلول های زایا (GCS)^۲ با کمک تمایز سلول های بنیادی انجام شده است. سلول های **GCS** از مهمترین رده سلول های بدن می باشند زیرا تنها سلول هایی در بدن هستند که قادر به تقسیم میوزی بوده و با تشکیل گامت ها قادر به انتقال اطلاعات وراثتی هستند. بعلاوه این سلول ها قادر به بیان مارکرهای اختصاصی سلولی مانند **POU5F1/OCT4, GAGE, MAGEA4, KIT, Dppa3/Stella, Ifitm3/Fragilis Tnap/Alpl/Ap** می باشند (۴). **Hubner** و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار سلول های بنیادی جنینی را به **GCS** تمایز دادند (۵). سلول های بنیادی در واقع سلول های تمایز نیافته ای هستند که توانایی فراوانی در نوسازی، کلونی و تکثیر دارند و از بافت هایی با منشأ جنینی و یا بزرگسال مانند بافت مزانشیمی قابل استخراج هستند (۶،۷). به علت محدودیت اخلاقی در تهیه سلول های بنیادی جنینی و منابع اندک سلول ها، توجه محققین به استفاده از سلول های بنیادی بزرگسال با مبدا مزانشیمال^۳ (**MSCs**) برای القا و تمایز به **GCS** افزایش یافته است (۸). رده سلول های **MSCs** دارای قابلیت چسبندگی به ظروف کشت سلولی می باشند و از بافتهای متفاوت مانند ریشه مو، چربی و مغز استخوان قابل استخراج هستند. این سلول های بنیادی با روش های متفاوتی از جمله بیان مارکرهای خاص سطحی مانند **CD44, CD73, CD105** قابل شناسایی اند (۹).

⁴ primordial germ cells

⁵ Bone Marrow Mesenchymal stem cell

⁶ Retinoic acid

¹ Assisted Reproductive Technology

² germ cells

³ Mesenchymal stem cell

بیوتیک Pen- Strep 1%⁵، اسید های آمینه ضروری 1% و همچنین گلوتامات پیرووات 2/25 gr به ازای 2/5 g/lit در پودر محیط کشت DMEM بود. سلول های استخراج شده در فلاسک و در انکوباتور در دمای 37 درجه، 5% CO2 و رطوبت 95% انکوبه نگهداری شدند. محیط کشت سلول ها در زمان های متوالی 48 و 96 ساعت بعد تعویض گردید. سپس سلول های چسبیده به فلاسک پس از رسیدن به تراکم حدود 80% ترپسینه شدند. برای تمایز شیمیایی سلول ها از RA⁶ با غلظت 10⁻⁵ M استفاده شد. جهت بررسی نقش عوامل تمایزی در سلولها، نمونه ها به دو گروه کنترل و گروه های تیمار شامل: (1) گروه تیمار شده با RA، (2) گروه سلولی تیمار شده با RA و داربست پوشده شده فیبرین⁷ با TNTs با غلظت 50 µg/ml، (3) گروه RA و پرتو UV با شدت 365 nm بر (4) گروه RA و فیبرین کوت شده با TNTs و پرتو UV تقسیم گردید.

تعیین ماهیت بنیادین سلول های BMMSCs با تمایز به درده سلول چربی و استخوانی و فلوسایتومتتری

جهت اثبات ماهیت مزانشیمی سلول های BMMSCs استخراج شده روش فلوسایتومتتری و تمایز به دو رده سلول های چربی و استخوانی انجام گردید. برای ارزیابی توانایی تمایزی این سلول ها از کیت تمایزی سلول های بنیادی استفاده شد. به طور خلاصه پس از کشت سلول ها در محیط تمایز به سلول های تمایز یافته چربی شامل محیط کشت MEM-α، سرم 10% FBS، 0.5 µM ایزو بوتیل متیل زانتین، 10 µM ایندومتاسین و 1 µM دگزامتازون کشت شدند. برای تمایز سلولها به سلول های استخوانی از محیط کشت MEM-α، سرم 10% FBS، 10 µM بتاگلیسرول و 50 µg/ml اسکورییک فسفات به محیط اضافه گردید. سلول ها به مدت 21 روز وارد محیط کشت استئوبلاست و لیپوبلاست شدند و سپس از رنگ آمیزی های Oil Red و Alizarin Red برای بررسی خاصیت چند توان بودن⁸ سلول های استخراج شده استفاده شد.

شکل و نوع داربست ها شواهد اندکی بر نقش سایر عوامل القایی فیزیکی مانند تابش دوز های اختصاصی پرتو UV در تمایز سلول های بنیادی به سلول هایی دیگر به غیر از سلول های جنسی زایا به عنوان یک فاکتور موثر فیزیکی گزارش شده است (21). در بعضی از تحقیقات از ماده فیبرین هیدروژل به عنوان یک داربست در هنگام کشت سلولی، ذرات نانولوله ی تیتانیوم TNTs¹ و پرتو UV در کشت و تمایز سلول های بنیادی استفاده شده است (20-22). پیشرفت های صورت گرفته در نانو تکنولوژی نقش این نانو مواد در تمایز رده های مختلف سلول های بنیادی نشان میدهد (23). در مطالعه ای نقش و تاثیر TNTs در ابعاد 15 nm در بقا، تکثیر و تمایز سلول های MSCs و فرایند بروز مرگ سلولی و آپوپتوز به علت اثر ذرات TNTs با ابعاد 100 nm در مرگ سلولی و آپوپتوز گزارش شده است (23). با وجود کاربرد گسترده مواد نانو بر روی تاثیر آن بر کشت سلول های بنیادی، در تحقیقات اخیر نتایج مشخصی از میزان غلظت این نانو مواد بر تمایز سلول های بنیادی وجود ندارد (24).

در این مطالعه برای کاهش مرگ سلولی و افزایش میزان تمایز BMMSCs به سلول های زاینده جنسی اثر تمایزی فاکتور های TNTs و اشعه UV جهت دست یابی به یک پروتکل درمانی جهت درمان ناباروری های ناشی از نبود سلول های زایای جنسی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

7 عدد موش 8-6 هفته از نژاد NMRI، با شرایط استریل به وسیله ی تزریق 60 mg/kg کتامین هیدروکلراید و 10 mg/kg گزیلازین به صورت درون صفاقی تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند. سلول های BMMSCs از استخوان ران موش، با تکنیک فلاشینگ² به کمک سرنگ تزریق انسولین حاوی PBS استخراج شدند. محیط اختصاصی برای این سلول ها شامل محیط کشت DMEM high glucose³، 10% FBS⁴ آنتی

⁵ BI-1203 Bioidea COMPANY

⁶ Cat No. R2625-100mg

⁷ Fibrin coated

⁸ Multi potential capacity

¹ Titanium Nanotubes TNTs

² Flushing

³ REF:32500-035 Gibco company

⁴ Sigma-Aldrich, USA(Fetal bouvin serum)

گردید و راستی آزمایی پوشیده شدن TNTs با ذرات فیبرین توسط SEM ارزیابی شد.

Cell Viability and Proliferation Assay

فعالیت متابولیک سلول های BMMSCs کشت شده بروی داربست های حاوی فیبرین و ذرات TNTs کوت شده به وسیله dimethyl (thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium salt BMMSCs ارزیابی MTT assay بررسی شد. سلول های BMMSCs در هر یک از چاهک های پلیت های کشت به تعداد 10^4 $5 \times$ عدد در شرایط استاندارد به مدت ۳، ۱ و ۵ روز انکوبه شدند. سپس به میزان $5 \mu\text{m}$ با غلظت 40 mg/ml از محلول استوک MTT به پلیت های ۱۲ چاهک ریخته شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد پس از آن مدیوم خارج و محلول فورمازان در DMSO حل شد در نهایت نمونه ها توسط یک اسپکترومتر مدل (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) در طول موج 590 nm مطالعه شد.

روش ارزیابی تمایز سلولهای BMMSCs با روش ایمنوهیستوشیمی IHC^۲

برای بررسی تمایز سلولهای GCs بیان مارکر زایای-Ab Anti-DDX4 / MVH (antibody - Primordial Germ Cell Marker) با روش IHC انجام شد که یک بلوک کننده پپتیدی برای رشته های پپتیدی DDX4 / MVH^۳ ژن DDX4 است که در تکامل سلول های زایای ژرم سل و نیز در تحرک اسپرم ها نقش دارد. این پپتید در سیتو پلاسم و ناحیه دور هسته قرار دارد. ابتدا سلول های BMMSCs با تعویض محیط و پاساژ وارد محیط های تمایزی شیمیایی و فیزیکی شدند. پس از دو هفته از هر گروه تیمار شده 10^5 سلول برداشته وارد چاهک های پلیت ۲۴ خانه شد. نمونه های سلولی ابتدا با کمک محلول پارا فرم آلدئید ۴% به مدت ۲۰ دقیقه در دمای یخچال فیکس شدند و نمونه ها با PBS سه بار شستشو شد. سپس HCL دو نرمال به مدت ۲۰ دقیقه اضافه شد. برای خارج کردن HCL از محیط نمونه ها سه بار با PBS شسته شد. نمونه ها با ۵% BSA^۴ و ۱۰% Goat serum محلول

در روش فلوسایتومتری آنتی ژن های سطحی CD90 به عنوان مارکر مثبت و CD31 به عنوان مارکر منفی در نمونه ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Cyflow Space از شرکت Partec آلمان آنالیز شدند. بدین صورت که ابتدا سلول ها توسط محلول ۴% پارافرم آلدئید فیکس شدند. برای بازیابی آنتی ژن به نمونه ها محلول اسید کلریدریک دو نرمال اضافه شد و برای افزایش نفوذ پذیری غشای سلولها Triton X 0.3 % (Invitrogen) به نمونه ضروری از ۱۰% Goat serum استفاده گردید. در مرحله بعد آنتی بادی های (CD31 (AB28364 و CD90 (AB92574) رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ با PBS در محیط مرطوب در دمای ۲-۸ درجه به نمونه ها اضافه گردید. سپس شستشو با PBS صورت گرفت و آنتی بادی ثانویه (AB6717 و AB6785) با غلظت ۱ به ۱۰۰ با PBS به نمونه ها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. در آخر پس از شستشو با PBS با دستگاه فلوسایتومتری مشاهده و تصویر برداری شد.

جهت ارزیابی تمایزی سلولها به GCs از RA با غلظت M 10^{-5} ، فیبرین کوت شده با TNTs و پرتو UV با شدت 20 ± 254 استفاده گردید. در نهایت داده ها با نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳).

تعیین مشخصات ساختاری TNT coated by fibrin

مشخصات ساختاری TNTs به وسیله یک میکروسکوپ FE-SEM مدل TESCAN با دتکتور EDS و Mapping از شرکت Oxford Instrument انگلستان بررسی شد. جهت انجام این کار برای ثابت کردن نمونه شامل داربست ها و ذرات TNTs با ایجاد برقراری رسانایی الکتریکی با پوشش طلا پوشش داده شدند. در تصاویر تهیه شده ذرات TNTs دارای اندازه $15-10 \text{ nm}$ بودند که جهت استفاده به عنوان فاکتور تمایزی ابتدا بالاترین میان بقا BMMSCs در غلظت های مختلف این نانوتیوب با روش MTT اندازه گیری شد. سپس $30 \mu\text{g}$ از محلول TNTs با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ به ژل فیبرین تهیه شده از فیبرینوژن انسانی و ترومبین با نسبت ۱ به ۱ اضافه

² Immunohistochemical analysis

³ Cat No. ab13840, Abcam company

⁴ bovine serum albumin

¹ Sigma-Aldrich company, USA

نتایج

سلول های BMMSCs بعد از استخراج در محیط کشت مناسب DMEM کشت شدند اولین مرحله تعویض محیط ۴۸ ساعت بعد از کشت و مراحل بعدی تعویض محیط ۹۶ ساعت بعد صورت گرفت و پس از رسیدن به تراکم سلولی^۵ حدود ۸۰٪ سلول ها برای پاساژهای بعدی تریپسینه شدند. بررسی آنالیز فلوسایتومتریک ماهیت بنیادین سلول های کشت شده BMMSCs و وجود مارکرهای سطحی، CD90 و مربوط به سلول های بنیادی را تایید کرد. بعلاوه منفی شدن نشانگرهای سطحی و CD31 مربوط به رده سلولهای خونی نشان داد که سلول های پاساژ داده شده فقط سلول های بنیادی هستند. افزایش تعداد و تجمع سلول های BMMSCs در پاساژهای متفاوت کشتی و همچنین تشکیل ساختار دوکی سلول ها قبل از انجام تیمار دیده شد پس از ۲۱ روز بعد از کشت در محیط تمایز اختصاصی سلول های استخوانی تمایز یافته به علت تجمع و رسوب اکسالات کلسیوم با رنگ آمیزی Alizarin Red به رنگ قرمز در آمدند. همچنین سلول های بنیادی برای تایید تمایز آدیپوژنیک به سلول چربی پس از ۷ تا ۱۴ روز با Oil Red رنگ آمیزی شدند. تری گلیسرید های درون سلول های تمایز یافته به رنگ قرمز درآمد و با میکروسکوپ نوری قابل تشخیص بودند. این یافته ها خاصیت چند توان بودن^۶ سلول های بنیادی استخراج شده را تایید کرد (شکل و نمودار ۱).

در PBS^۱ همراه با Triton_X 0.1% در دمای اتاق برای آنالیز های ایمنونوهیستوشیمی به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند. در ادامه نمونه ها شستشو با PBS شستشو گردید. در مرحله بعد 10% goat serum اضافه شد. بعد از ۳۰ تا ۴۵ دقیقه با شستشو سرم از محیط خارج شد و آنتی بادی اولیه DDX4 antibody, (1 µg/ml) MVH با نسبت (۱:۱۰۰) اضافه و در طول شب در محیط مرطوب و دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس دو بار شستشو با محلول PBS صورت گرفت. اتصال آنتی بادی اولیه به سلول ها با استفاده آنتی بادی ثانویه کانژوکه^۲ شناسایی شد. محلول آنتی بادی ثانویه با نسبت (۱:۱۰۰۰) به مدت ۲ ساعت اضافه گردید. هسته سلولهای با استفاده از DAPI^۳ رنگ آمیزی مضاعف به رنگ آبی شد. برای رنگ آمیزی به میزان ۱ mg پودر رنگ آمیزی هسته سلول DAPI در دمای محیط در 1000 µl بوفر PBS حل شد. سپس ۵۰ µl از محلول فوق را با PBS 1000 µl به حجم رسانده و محلول رنگ اضافه شد. در آخر پس از رنگ آمیزی سیتوپلاسم سلولها اسلاید های تهیه شده با کاور اسلیپ gold Anti fade^۴ پوشانیده شده و در تاریکی نگهداری شدند. در نهایت با میکروسکوپ فلورسنس تصاویر ایمنونوهیستوشیمی تهیه شد (۲۴).

بررسی آماری

آنالیز آماری نتایج و اطلاعات بدست آمده در تحقیق حاضر شامل بیان درصد مارکر های سطحی در سلول های بنیادی مزانشیمال و در صد مارکر های سلول های زایا، میزان زنده ماندن و بقا سلولها توسط آزمون آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) و Tukey test و همچنین آزمون نان پارامتریک Mann-Whitney برای سنجش تفاوت میان نمونه ها و انجام رتبه بندی و آزمون Kruskal-Wallis test جهت توانایی مقایسه ی دو گروه نمونه با کمک نرم افزار SPSS version 23 انجام شد و سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

¹ phosphate buffered solution

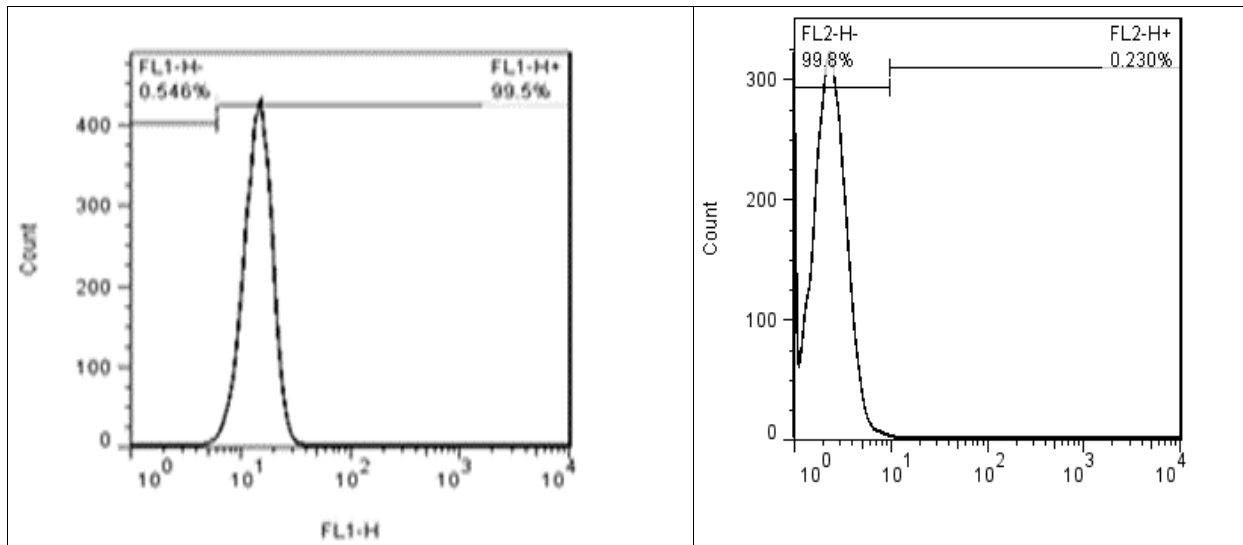
² secondary antibodies conjugated to Alexa donkey anti-rabbit IgG red, A11055

Invitrogen

³ 4,6-diamidino-2-phenylindole

⁴ Cat No. P36934, Invitrogen

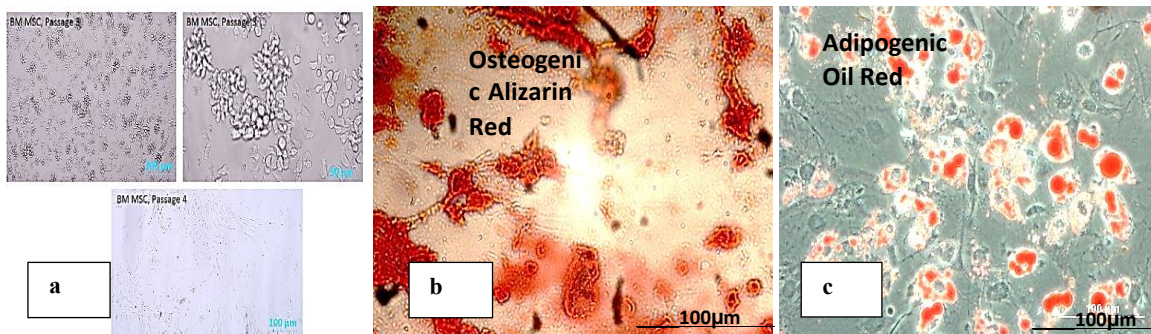
⁵ confluency



CD90

CD31

نمودار ۱. سنجش سلول های ورودی تک کانال فلوروکروم (FL1-H) در نمودار هیستوگرام فلوسایتومتری مبنی بر بنیادی بودن سلول های استخراج شده نشان میدهد که بیان مارکر سطحی منفی CD31 با مقدار % ۰.۲۳۰۰، کمترین و بنیادی بودن سلول های استخراج شده با مارکر مثبت سلولهای بنیادی CD90 با مقدار % ۹۹.۵ بیشترین بیان را داشته است.

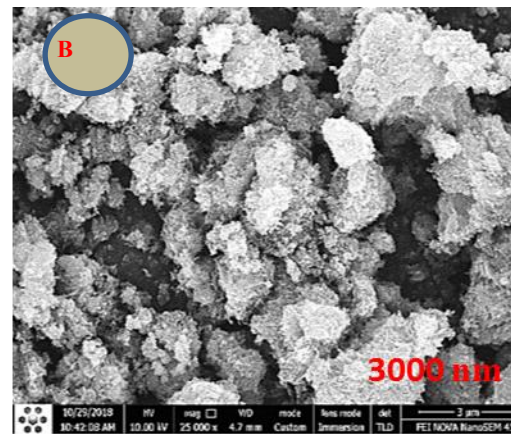
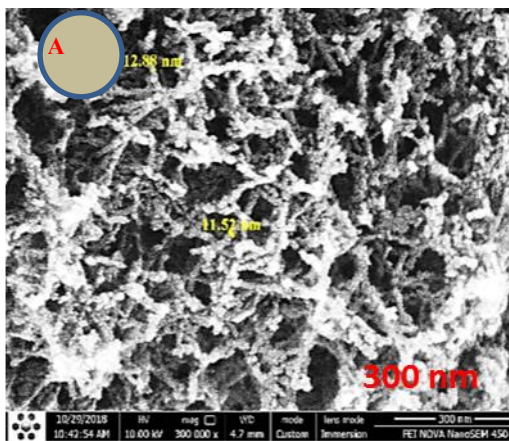


شکل ۱. تصویر افزایش تجمع و تعداد سلول های بنیادی در پاساژ های ۳ و ۴ و پیدایش ساختار دوکی سلول ها قبل از تیمار (a). سلول های تمایز یافته به سلول های استخوانی به علت تجمع و رسوب اکسالات کلسیم با رنگ Alizarin Red به رنگ قرمز در آمده بودند (b). سلول های بنیادی برای تایید تمایز آدیپوژنیک به سلول چربی پس از ۷ تا ۱۴ روز با Oil Red رنگ آمیزی شدند. تری گلیسرید های درون سلول های تمایز یافته به رنگ قرمز درآمده و با میکروسکوپ نوری قابل تشخیص بودند (c).

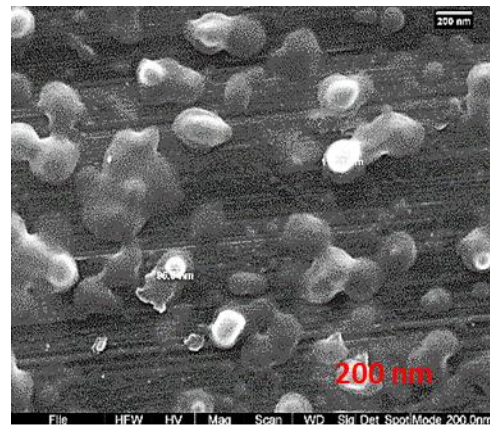
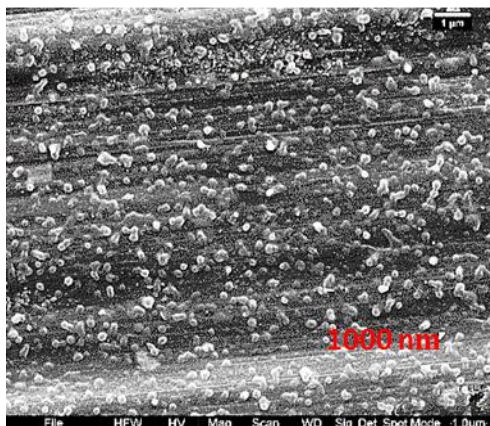
ویژگی های ساختاری ذرات TNTs

مطالعه نتایج حاصل از مطالعه تصاویر SEM پوشیده شدن یکنواخت و پراکنده TNTs ذرات بر روی بستر فیبرینی را تائید کرد (شکل ۳، ۲).

نتایج به دست آمده از تصویر برداری FE-SEM برای TNTs ساختار لوله ای آن را اثبات کرد و همچنین میانگین قطر این ذرات را در محدوده ۱۰-۱۵ nm نشان داد.



شکل ۲. بررسی ویژگی ساختاری TNT به وسیله ی میکروسکوپ الکترونی FE-SEM: نتایج ساختاریکناخت لوله ای با ابعاد ۱۰-۱۵ nm در نانو لوله های تیتانیوم با بزرگ نمایی و ۳۰۰ nm scale bar (A) و ساختار کریستالی TNT با بزرگ نمایی 3000nm را نشان داد (B).

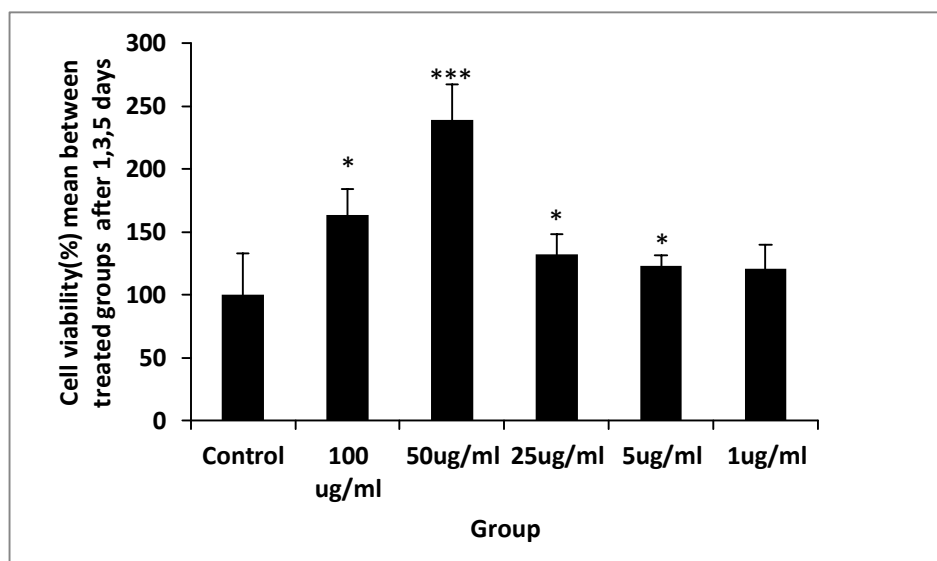


شکل ۳. مشاهده گسترش یکنواخت و پوشیده شدن ذرات نانو لوله های تیتانیوم بر روی شبکه ی فیبرین به وسیله ی میکروسکوپ الکترونی SEM با بزرگ نمایی و ۲۰۰ nm scale bar (A) و میکرو گراف با بزرگ نمایی و 1000nm scale bar (B).

گروه $50 \mu\text{g/ml}$ بود که با میانگین تعداد $239/4832$ و انحراف معیار 28.29449 Std نسبت به بقیه گروه ها با تفاوت معنی دار $P < 0.0001$ دیده شد. سایر گروه ها هم دارای تفاوت معنی دار $P < 0.01$ در تمام روز ها نسبت به گروه کنترل و گروه $1 \mu\text{g/ml}$ بودند. افزایش معنی داری در میانگین درصد بقا ی سلول ها در گروه کنترل با میانگین 100 و انحراف معیار 18.73392 Std گروه $1 \mu\text{g/ml}$ با میانگین $121/0356$ و 18.73392 Std در روزهای مختلف کشت دیده نشد (نمودار ۲).

بررسی میزان بقا سلول ها و مقدار سمیت مواد باکمک روش MTT

میزان بقا در سلولهای BMMSCs تیمار شده با TNTs به وسیله سنجش MTT ارزیابی گردید. بدین ترتیب که میزان بقا سلول های بنیادی مزانشیمال استخراج شده در غلظت های متفاوت TNTs $1, 5, 25, 50, 100 \mu\text{g/ml}$ با سه تکرار در هر گروه سنجیده شد. برای هر غلظت از TNTs، سه گروه در روزهای ۱ و ۳ و ۵ در نظر گرفته شد. سپس میانگین درصد بقا سلول ها در غلظت های مختلف مقایسه گردید. بیشترین میزان بقا سلولها پس از ۵ روز در

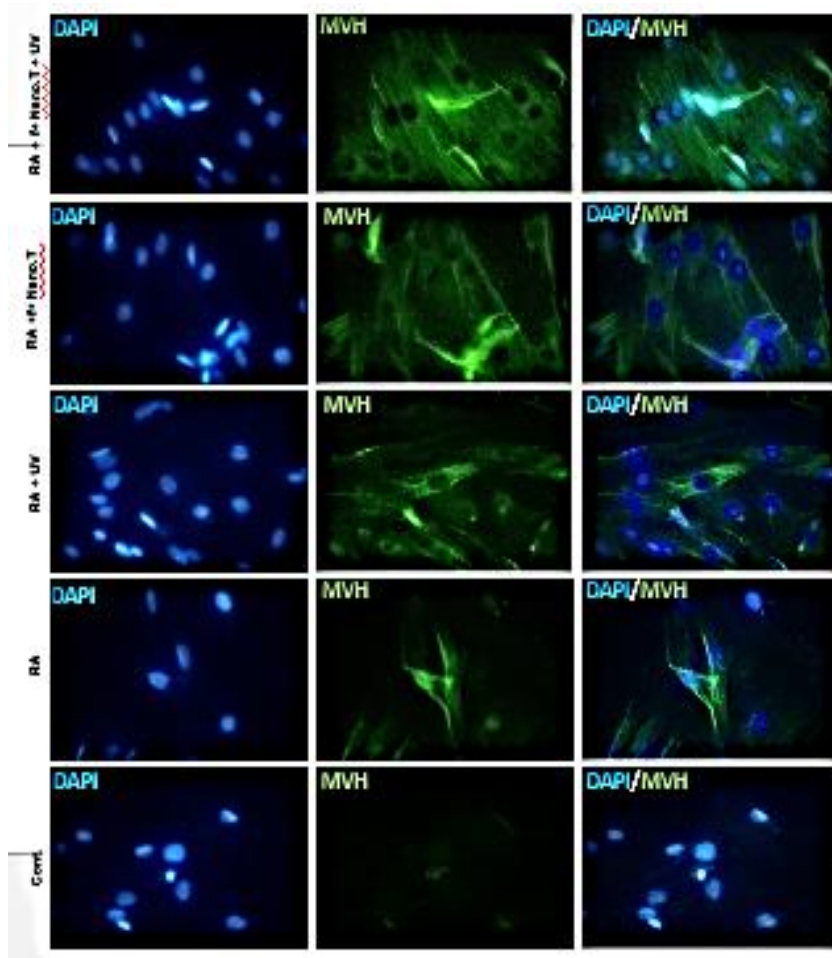


نمودار ۲. مقایسه میانگین درصد زنده ماندن سلول ها بین گروه ها در روزهای ۱ و ۳ و ۵. با غلظت های مختلف نانو ذره تیتانیوم: بیشترین میزان بقا پس از ۵ روز در گروه 50 µg/ml بود که نسبت به بقیه گروه ها با تفاوت معنی دار $P < 0.0001$ (***) دیده شد. سایر گروه های تیمار در تمام روز ها دارای تفاوت معنی دار $P < 0.01$ (*) در مقایسه با کنترل و گروه 1µg/ml بودند. افزایشی در میانگین درصد بقای سلول ها در بین روزهای مختلف کشت در گروه های کنترل و گروه 1 µg/ml دیده نشد.

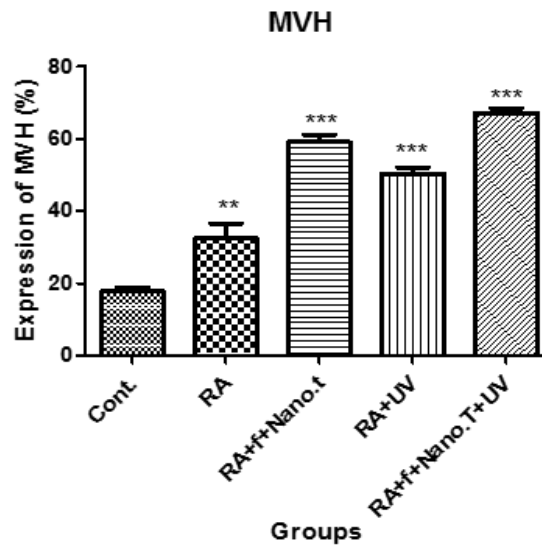
میانگین تعداد سلول های شمارش شده گروه کنترل با میانگین ۱۷/۷۳ و انحراف معیار Std. Deviation ۱/۸۷۲، گروه RA با میانگین ۳۲/۴۳ و Std ۶/۹۹۲، گروه RA+TNT با میانگین ۵۹/۱۳ و Std ۳/۸۵۰، گروه RA+UV با میانگین ۵۰/۴۰ و Std. ۲/۸۶۲ و در گروه RA+UV+TNT میانگین ۶۷/۲۳ و Std ۲/۲۵۰ بود. درصد میانگین سلول ها لیبیل شده با MVH در گروه های تیمار با تفاوت معنی داری با (***) $P < 0.0001$ در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد (نمودار ۳). در گروه RA در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار $P < 0.05$ (***) با Mean Diff برابر ۱۴/۷۰ و همچنین confidence interval for difference در دامنه 4.070 تا ۳۳/۲۵ با تست Tukey's Multiple Comparison Test بود.

نتایج تمایز و القا BMMSCs سلول های بنیادی به GCs

در مطالعه کیفی MVH سیتوپلاسم سلول های زایای GCs را نشاندار کرده بود و هسته سلول ها با رنگ آمیزی مضاعف DAPI به رنگ آبی قابل مشاهده بودند (شکل ۴) پیشروی و بیرون زدگی های سلول های GCs توسط MVH مشخص و رنگ آمیزی شده بود. زواید سیتوپلاسمی سلول ها به محیط اطراف گسترده شده و قابل مشاهده بود. وجود حفرات تیره داخل سلول ها قبل از رنگ آمیزی مضاعف با DAPI نشان دهنده موقعیت هسته سلول ها بود. تعدادی از سلول ها که بیان MVH منفی داشتند از طریق مقایسه با تصاویری که فقط با رنگ شده DAPI قابل مشاهده بود. بدین طریق نسبت تعداد سلول های که نسبت به MVH مثبت بود را به تعداد کل سلول ها در نمونه ها شمرده و میانگین تعداد آنها مشخص گردید. در بررسی سه سری از اسلاید های IHC



شکل ۴. ارزیابی کیفی ایمنوهستوشیمی در گروه های مختلف تیمار و کنترل برای بررسی میزان بیان مارکر **MVH**: نقاط آبی رنگ هسته سلولها با رنگ آمیزی مضاعف **DAPI** و نقاط سبزرنگ بیان **MVH** بر سیتوپلاسم سلولی را در نمونه های ایمونوبافتی در گروه های مختلف نمایش می دهد. بیان مارکر **MVH** بر روی سلولهای رنگ شده مثبت و وجود سلول های زایا و سلولهای منفی به صورت معنی عدم وجود رنگ و نیز رنگ آمیزی مضاعف با **DAPI** بود.



نمودار ۳. نتیجه ی شمارش میانگین سلول ها در نمونه های بافتی ایمنوهستوشیمی: افزایش معنی دار درصد میانگین سلول های نشان دار شده با **MVH** در گروه های تیمار با تفاوت معنی دار با $P < 0.0001$ (***) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. گروه **RA** هم به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار $P < 0.05$ (**)

بحث

علت در این تحقیق نیز از رده های سلولی بنیادی بالغ و تمایز آن به سلول های جنسی زایای گامت مانند استفاده شد. Task و همکاران در مطالعه ای برای تمایز BMMSCs به سلول های چندتوان در لایه زاینده غدد جنسی از فیبرین با نسبت های ۱۰،۵،۲،۱/۲۵ mg استفاده کردند. بیان ژن های *sox17*، *brachyury T*، *nestin*، *rex1* به روش RT-PCR نشان داد که بیشترین تمایز در محیط کشت حاوی فیبرین های دارای بیشترین قطر و طول و رشته صورت گرفته است (۲۰). در این مطالعه برای تمایز BMMSCs به طور همزمان از فیبرین ساخته شده از فیبرینوژن و ترومین با نسبت ۱:۱ و TNTs و پرتو UV استفاده شد که موجب بیشترین تمایز و تولید سلول های GCS نسبت به گروه کنترل بود. نتایج تحقیق حاضر بر اثر تمایزی و القایی TNTs و پرتو UV و پوشش فیبرین مشابه نتایج Task و همکاران است اما مقادیر دوز القا تمایز BMMSCs به سلول های زایای گامت مانند متفاوت می باشد.

مرور مقالات نشان میدهد انواع مختلفی از سلول های بنیادی بالغ میتوانند به سلول های GCS در شرایط مناسب تبدیل شوند. آنها میتوانند مارکر های اختصاصی در سطوح mRNA و یا پروتئین را بیان نمایند. اما هیچ کدام تا به حال قادر به تولید GCS عملی و فعال در درمان ناباروری نبوده اند. هنوز فاکتور های مهمی که نقش اساسی در تولید GCS دارند و یا عوامل هدایت کننده GCS و یا چگونگی ورود به تقسیمات میوز معلوم نیست.

در تحقیق حاضر بیان مارکر اختصاصی زایایی سلول MVH و میزان این پروتئین در گروه آزمایشی استفاده همزمان RA و فیبرین کوت شده با TNTs و پرتو مرئی UV نسبت به گروه کنترل، گروه تیمار با RA و گروه تیمار با RA و UV افزایش معنی دار را نشان داد. تا کنون مطالعه ای مکانیسم مولکولی اثر TNTs را در تمایز سلول های بنیادی به سلول های زایا نشان نداده است. تحقیقات Lv. L و همکاران نشان دادند که TNTs تمایز سلول های بنیادی مشتق شده از بافت چربی به سلول های استخوان ساز را به وسیله ی بالا بردن متیلاسیون هیستون H3 در لیزین شماره ۴ در ناحیه ی پروموتور ژن Runx 2 و

روش های معمول ART که برای درمان ناباروری استفاده می شود شامل IVF^۱، تزریق درون سیتوپلاسمیک اسپرم ICSI^۲ و تلقیح درون رحمی IUI^۳ است (۲۵). این روش های درمانی بیشتر برای بهبود توانایی گامت ها و براساس درمان فاکتور های زنانه و مردانه در ناباروری است. اما این متد های کلینیکال نمی توانند درمان ناباروری ناشی از عواملی همچون آژواسپرمی یا نبود تخمک را شامل شوند (۲۶).

در این مطالعه پس از کشت سلول های BMMSCs، نتایج مثبتی بر بروز تمایز به سلول های زایای جنسی با پیدایش و مثبت شدن مارکر های اختصاصی دیده شد. در یک تحقیق Latifpour M و همکاران، تمایز سلولهای MSCs بند ناف انسانی را به سلول های زایا مانند را گزارش کردند. آنها ماهیت بنیادی سلول های استخراج شده را با ارزیابی با کمک روش فلوسایتومتری برای مارکرهای سطحی بنیادی CD90، CD105، CD73 و مارکرهای سطحی سلول های رده خونی CD34، CD45 انجام دادند و خاصیت چندتوانی سلول های MSCs را از طریق تمایز به سلول های غضروفی و یا استخوانی با رنگ آمیزی Oil red و Alizarin red گزارش کردند (۲۷). در مطالعه حاضر نیز از مارکر های سلولی های CD31 و CD90 جهت تعیین تمایز سلول ها صورت گرفت و بیان مارکرهای BMMSCs در سلولهای استخراج شده در این تحقیق مشابه یافته های Latifpour M و همکاران است.

تعدادی دیگر از محققین از جمله Jung D و همکاران و Shah SM و همکاران، مطالعاتی در زمینه تمایز و تولید سلول های زایای جنسی از سلول های بنیادی انجام دادند. Geijsen N و همکاران نیز تمایز سلول های بنیادی جنینی را به سلول های زایا مانند و گامت های جنسی را گزارش کردند (۲۸-۳۰). به دلیل مسائل اخلاقی و احتمال سرطان زایی سلول های بنیادی جنینی تعدادی از پژوهشگران روی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال به سلول های جنسی متمرکز شده اند (۳۱،۳۲). به همین

¹ In vitro fertilization

² Intra cytoplasmic spermatic injection

³ Intra Uterine Insemination

رادیکال های فعال در محیط کشت سلول های بنیادی و آسیب به DNA این سلول ها به واسطه ی این رادیکال ها و فعال شدن مکانیسم مولکولی P53 و عدم تمایز این سلول ها را نشان داده است. در مقابل Wong و همکاران اظهار کردند که کاربرد دوز پایین UV نقشی در تغییر بیان ژنی BMMSCs ندارد و هیدروژل ها موجب کاهش آسیب به سلول های BMMSCs به علت کاهش رادیکال های آزاد باعث تمایز سلول های بنیادی می شود (۳۷). در مطالعه ای تاثیر اشعه 320-280UVC (nm) or 400-320 UVA(nm) بر روی تحرک و حلالیت نانوذرات نقره با ابعاد 11nm صورت گرفت و نشان داد UV میتواند موجب افزایش نگهداری و انحلال بیشتر نانوذرات در محیط گردد (۳۸).

در تحقیقی که توسط Shbahangfar M R و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام دادند نقش فوتو فانکشنال^۱ اشعه UV بر روی تیتانیوم و تاثیر بیوراکتیو^۲ را بر روی افزایش و تمایز پس از ۲۴ ساعت در کشت سلول های بنیادی انسانی MSCs بر روی سطوح تیتانیوم را گزارش کردند. آنها تغییر رفتار سلولی و عملکرد این سلولها را نشان دادند و اظهار داشتند که تاثیر اشعه UV بر روی تیتانیوم می تواند موجب افزایش تمایز سلولی بر اساس بیان روش افزایش فعالیت آنزیم های آلکالین فسفاتاز شود. همچنین UV می تواند بر روی فعالیت بیوراکتیو و هدایت سلول های استخوانی تاثیر زیادی بگذارد (۳۹). مطالعات Aita H و همکاران (۴۰) و سایر مطالعات در این زمینه نشان می دهد که تاثیر اشعه UV بر روی سطوح تیتانیوم می تواند بر روی مهاجرت سلولی اتصال سلولها بر روی سطوح تیتانیوم و گسترش سلولهای بنیادی نقش داشته باشد. Minamikawa H و همکاران نیز گزارش کردند که در کشت سلول های انسانی MSCs افزایش خاصی در تعداد سلول ها بر روی سطوح عادی روی نمی دهد. اما تعداد سلول هایی که بر روی سطوح تیتانیومی و تحت اثر اشعه UVC قرار دارند به ۸ برابر افزایش یافته است (۴۱). در تحقیق حاضر نیز مطابق یافته های محققین فوق، نقش فوتو فانکشنال اشعه UVC می تواند بر این نانوذرات موثر

osteocalcin با مهار demethylase retinoblastoma binding protein 2 افزایش می دهد (۳۳). Braydich-Stolle و همکاران در مطالعه ای اثر نانو مواد آلومینیوم و مولیبدوم و نقره با غلظت های 1, 5, 25, 50, 100 g/ml TNTs تهیه شده از PBS را بر روی سلول های بنیادی جنسی رده ی C18-4 بررسی کردند. این محققین برای مقایسه، اثر نانوهای محلول مانند کربنات نقره، مولیبد سدیم و کلرید آلومینیوم بر روی این رده ی سلولی را به کار گرفتند. نتایج نشان داد که بالاترین میزان آپوپتوز در غلظت های 10-50 μ g/ml صورت گرفته است و در غلظت های بالا میزان آپوپتوز کاهش یافته است (۳۴). علی رغم به کار گیری نانو مواد به عنوان یک ابزار جدید در نانو بیوتکنولوژی و علم زیست شناسی به علت نبود اطلاعات کافی در مورد غلظت این نانو مواد و اثر آن بر سلامت انسان سمیت وابسته به غلظت برای همه ی انواع نانو ذرات باید بررسی شود. آنها گزارشی مبتنی بر تکثیر و یا تمایز و تکامل این سلول ها بر اثر القای نانوذرات ارایه نکردند (۳۵، ۳۴). در مطالعه حاضر ویژگی اختصاصی TNTs استفاده شده، اندازه ی ذرات با ابعاد 10-15 nm و غلظت 50 μ g/ml بود که مشابه با دامنه ی غلظت نانو ذرات به کار رفته در مطالعات Braydich-Stolle و همکاران است. همچنین برای رسیدن به کم ترین سمیت و بالاترین میزان بقا سلولی و تمایز متعاقب از این بقا، سنجش MTT در غلظت های مختلف TNTs بر روی BMMSCs انجام شد و سپس از این غلظت دارای بیشترین بقا به عنوان فاکتور تمایزی استفاده شد. تحقیق Wu و همکاران تیمار TNTs با پرتو UV خاصیت زیست سازگاری این نانو تیوب را با کاهش دفع الکترواستاتیک بین مواد زیستی و بیو مولکول ها افزایش می دهد و باعث افزایش فعالیت های زیستی مثل تکثیر سلولی می شود (۳۶). این موضوع میتواند در تحقیق حاضر افزایش نقش تمایزی TNTs همراه با تابش UV در سلول های زایای جنسی را توضیح دهد.

تاکنون مطالعه ای در مورد نقش تمایزی UV در تولید سلول های زایای GCS وجود ندارد. در مطالعه ای تمایز سلول های بنیادی به ملانوسیت تحت اثر UV بررسی شد (۲۱). همچنین در مطالعاتی نقش پرتو UV را در ایجاد

¹ Photo functional

² Bio reactivity

تقدیر و تشکر

این طرح تحقیقاتی توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، ایران تایید شده است و با نام کاربری ۴۱۹۹۸۲۲۹۸۴ از سامانه ی ثبت پروپوزال دانشگاه قابل پیگیری می باشد. همچنین دارای شماره کد ۶۳۳۶۰ ارسالی معاونت پژوهشی و فناوری و کمیته اخلاق دانشگاه مورخ ۱۳۹۸/۰۸/۲۸ می باشد. بدین وسیله نهایت تشکر و قدر دانی از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشکده علوم پایه واحد علوم تحقیقات و دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز اعلام می گردد. از خانم دکتر زهره مظاهری نیز جهت کمک به تهیه مواد و تجهیزات تشکر می گردد.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

باشد و تاثیر اشعه UV بر افزایش فعالیت بیوراکتیو نانوذرات تیتانیوم را در محیط محلول کشت سلول های بنیادی را بیان نماید که می تواند احتمالا افزایش نقش تمایزی TNTs در سلولهای بنیادی همراه با تابش UV به بیان بعضی از ویژگی های سلول های زایای جنسی را توضیح دهد.

نتیجه گیری

امروزه استفاده از سلول های بنیادی به عنوان یک درمان بالقوه برای بسیاری از بیماری ها استفاده می شود. هر چند که نتایج استفاده از چنین روش هایی در درمان به علت عدم تمایز یا وقوع مرگ سلولی چندان موثر نیست، استفاده ی همزمان از عوامل فیزیکی و شیمیایی برای تمایز بیشتر سلول های بنیادی به سلول های زایا به عنوان یک متد پیشنهادی می تواند در تولید سلول های زایا در درمان ناباروری های ناشی از فقدان گامت ها معرفی گردد.

منابع

1. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction* 2007;22(6):1506-12.
2. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *British Medical Journal* 1985;291(6510):1693-7.
3. Schlegel PN. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecologica* 2009;61(4):261-83.
4. Stukenborg J-B, Kjartansdóttir KR, Reda A, Colon E, Albersmeier JP, Söder O. Male germ cell development in humans. *Hormone Research in Paediatrics* 2014;81(1):2-12.
5. Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003;300(5623):1251-6.
6. Volarevic V, Ljujic B, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N, Stojkovic M. Human stem cell research and regenerative medicine—present and future. *British Medical Bulletin* 2011;99(1):155-158.
7. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* 2013;85(1):3-10.
8. Segers S, Mertes H, de Wert G, Dondorp W, Pennings G. Balancing ethical pros and cons of stem cell derived gametes. *Annals of Biomedical Engineering* 2017;45(7):1620-32.
9. Mahmoudian Sani MR, Mehri-Ghahfarrokhi A, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Saidijam M, Jami M-S. Comparison of three types of mesenchymal stem cells (bone marrow, adipose tissue, and umbilical

- cord-derived) as potential sources for inner ear regeneration. *The International Tinnitus Journal* 2017;21(2).
10. Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Molecular Human Reproduction* 2007;13(1):11-20.
 11. Antonucci I, Di Pietro R, Alfonsi M, Centurione MA, Centurione L, Sancilio S, et al. Human second trimester amniotic fluid cells are able to create embryoid body-like structures in vitro and to show typical expression profiles of embryonic and primordial germ cells. *Cell Transplantation* 2014;23(12):1501-15.
 12. Hua J, Pan S, Yang C, Dong W, Dou Z, Sidhu KS. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reproductive Biomedicine Online* 2009;19(1):99-105.
 13. Monfared MH, Minaee B, Rastegar T, Khrazinejad E, Barbarestani M. Sertoli cell condition medium can induce germ like cells from bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2016;19(11):1186.
 14. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006;312(5773):596-600.
 15. Koshimizu U, Watanabe M, Nakatsuji N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. *Developmental Biology* 1995;168(2):683-5.
 16. Evans TRJ, Kaye SB. Retinoids: present role and future potential. *British Journal of Cancer* 1999;80(1):1-8.
 17. Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, et al. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biology of Reproduction* 2008;78(3):537-45.
 18. Tanaka T, Satoh T, Onozawa Y, Kohroki J, Itoh N, Ishidate Jr M, et al. Apoptosis during iron chelator-induced differentiation in F9 embryonal carcinoma cells. *Cell Biology International* 1999;23(8):541-50.
 19. Pozio A, Palmieri A, Girardi A, Cura F, Carinci F. Titanium nanotubes stimulate osteoblast differentiation of stem cells from pulp and adipose tissue. *Dental Research Journal* 2012;9(Suppl 2):S169.
 20. Task K, D'Amore A, Singh S, Candiello J, Jaramillo M, Wagner WR, et al. Systems level approach reveals the correlation of endoderm differentiation of mouse embryonic stem cells with specific microstructural cues of fibrin gels. *Journal of The Royal Society Interface* 2014;11(95):20140009.
 21. Birlea SA, Costin GE, Roop DR, Norris DA. Trends in regenerative medicine: repigmentation in vitiligo through melanocyte stem cell mobilization. *Medicinal Research Reviews* 2017;37(4):907-35.
 22. Ilie I, Ilie R, Mocan T, Bartos D, Mocan L. Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface. *International Journal of Nanomedicine* 2012;7:2211. doi:10.2147/IJN.S29975
 23. Zhao C, Tan A, Pastorin G, Ho HK. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology Advances* 2013;31(5):654-68.

24. Li P, Hu H, Yang S, Tian R, Zhang Z, Zhang W, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro through embryoid body formation and retinoic acid or testosterone induction. *BioMed Research International* 2013;10):608728.
25. Secretariat MA. In vitro fertilization and multiple pregnancies: an evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series* 2006;6(18):1.
26. Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K. Human male infertility and its genetic causes. *Reproductive Medicine and Biology* 2017;16(2):81-8.
27. Latifpour M, Shakiba Y, Amidi F, Mazaheri Z, Sobhani A. Differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2014;6(4):218.
28. Jung D, Xiong J, Ye M, Qin X, Li L, Cheng S, et al. In vitro differentiation of human embryonic stem cells into ovarian follicle-like cells. *Nature Communications* 2017;8(1):1-13.
29. Shah SM, Singla SK, Palta P, Manik RS, Chauhan MS. Retinoic acid induces differentiation of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cells into germ cells. *Gene* 2017;631:54-67.
30. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004;427(6970):148-54.
31. Rao M, Condic ML. Alternative sources of pluripotent stem cells: scientific solutions to an ethical dilemma. *Stem Cells and Development* 2008;17(1):1-10.
32. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 2009;8(23):3822-30.
33. Lv L, Liu Y, Zhang P, Bai X, Ma X, Wang Y, et al. The epigenetic mechanisms of nanotopography-guided osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via high-throughput transcriptome sequencing. *International Journal of Nanomedicine* 2018;13:5605.
34. Kerativitayanan P, Carrow JK, Gaharwar AK. Nanomaterials for engineering stem cell responses. *Advanced Healthcare Materials* 2015;4(11):1600-27.
35. Wu J, Zhou L, Ding X, Gao Y, Liu X. Biological effect of ultraviolet photocatalysis on nanoscale titanium with a focus on physicochemical mechanism. *Langmuir* 2015;31(36):10037-46.
36. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* 2005;88(2):412-9.
37. Wong DY, Ranganath T, Kasko AM. Low-dose, long-wave UV light does not affect gene expression of human mesenchymal stem cells. *PloS One* 2015;10(9):e0139307.
38. Mittelman AM, Fortner JD, Pennell KD. Effects of ultraviolet light on silver nanoparticle mobility and dissolution. *Environmental Science: Nano* 2015;2(6):683-91.
39. Shbahangfar MR, Jafari E, Tarashohi A, Olyaei P, Bitaraf T. Effect of UV-Photofunctionalization on Bioactivity of Titanium to Promote Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Research in Dental and*

Maxillofacial Sciences 2019;4(1):7-11.
DOI: 10.29252/jrdms.4.2.7

40. Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, et al. Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation. *Acta Biomaterialia* 2009;5(8):3247-57.
41. Minamikawa H, Ikeda T, Att W, Hagiwara Y, Hirota M, Tabuchi M, et al. Photofunctionalization increases the bioactivity and osteoconductivity of the titanium alloy Ti6Al4V. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2014; 102(10):3618-30.