



## تاثیر نانوالیاف کیتوزان مشتق از پوشش کیتینی میگوی ببری خلیج فارس (*Penaeus semisulcatus*) بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های زایشی

طوبا میرزاپور<sup>۱\*</sup>، ابوالفضل بایرامی<sup>۲</sup>، تورج سهرابی لنگرودی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: دی ۹۶

تاریخ پذیرش: فروردین ۹۷

### چکیده

در این مطالعه امکان تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های زایشی مردانه در شرایط کشت سه بعدی بر روی نانوالیاف کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، نانوالیاف کیتوزان از کیتین میگوی ببری خلیج فارس با روش الکترورسی تهیه و به عنوان محیط سه بعدی با قطر منافذ مشخص برای کشت استفاده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) بر روی این داربست در حضور محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی قرار گرفتند. BMP4 نیز به عنوان عامل خارجی اضافه شد. بنیادینگی سلول‌های MSC بند ناف و تمایز آن‌ها به سلول‌های زایشی به ترتیب با بررسی بیان ژن‌های CD34، CD44 و CD105 و ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایشی (Plzf، Stra8، Oct4 و Prm1) و ۱۰ و ۱۵ روز پس از کشت در دو گروه شاهد (فاقد داربست کیتوزان) و گروه کشت سه بعدی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد در هر دو گروه، سلول‌های MSC ژن‌های CD44 و CD105 را بیان کردند، ولی برای مارکر همتوپویتیک (CD34) منفی بودند. کشت سلول‌ها بر روی بستر نانوالیاف کیتوزان بیشترین خاصیت القایی را در بیان مثبت Stra8 پس از گذشت ۱۵ روز از کشت و تولید سلول‌های زایشی از سلول‌های بنیادی بند ناف داشت. این مشاهدات می‌تواند افق‌های جدیدی را از تکوین سلول‌های زایشی با استفاده از سلول‌های بنیادی و بستر نانوالیاف روشن کند.

**واژگان کلیدی:** نانوالیاف کیتوزان، کشت سه بعدی، سلول زایشی، سلول بنیادی مزانشیمی.

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۳- استادیار بخش اطلاعات علمی، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

\* نویسنده مسئول: [dr.tooba72@gmail.com](mailto:dr.tooba72@gmail.com)

## مقدمه

ساختار آن، بار مثبت دارد. کیتین بعد از سلولز بیشترین پلی ساکارید در روی زمین است که از سخت پوستان، نرم تنان، دیاتومه ها، حشرات، دیواره سلولی جلبک ها، قارچ ها و مخمرها و نیز اسکلت خارجی زئوپلانکتون های دریایی، مرجان ها و عروس های دریایی به دست می آید. ضایعات به دست آمده از پوسته خرچنگ ها و میگوها ۷۵ درصد وزن کل سخت پوستان است. از این رو منابع خوبی برای استخراج کیتین هستند. کیتوزان در بدن انسان، پس از نه ماه به گلوکز تبدیل می شود (Yen et al., 2009). در حقیقت توسط آنزیم های مترشحه از لیزوزوم زنجیره های کیتوزان شکسته شده، پلی ساکارید به آرامی تخریب می شود. البته سرعت زیست تخریب پذیری کیتوزان وابسته به مقدار استیل موجود در ساختار آن است. در واقع کیتوزان از استیل زدایی کیتین به دست می آید که به دلیل غیرسمی بودن، خاصیت جذب بالا، امکان تجزیه در طبیعت، سازگاری با محیط زیست، مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی، توانایی حذف محدوده وسیعی از رنگ ها و فلزات، سینتیک سریع و در نهایت امکان تهیه مشتقات فراوان از آن، بسیار مورد توجه است. ژل، پودر، لایه و رشته های کیتوزان

دانش سلول های بنیادی افق جدیدی را در زمینه تحقیقات سلول های زایشی و درمان بیماری ها پیش رو قرار داده است. نخستین گام در راه استفاده از سلول های بنیادی، استفاده از یک داربست مناسب برای ایجاد محیطی قابل کنترل که شرایط رشد و تمایز این سلول ها را فراهم آورد، است. داربست، سلول و فاکتورهای رشد سه رکن اصلی کشت و مهندسی بافت هستند (Cheung et al., 2007). Liu و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که بیان ژن هایی که در رشد، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارند، در کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی افزایش قابل توجهی می یابند. معمول ترین داربست های مورد استفاده برای کشت سلول، علاوه بر پلیمرهای سنتزی مانند پلیمرهای زیست تخریب پذیر پلی گلیکولیک اسید (PGA)، پلی ال-گلیکولیک اسید (PLGA)، پلی ال-لاکتیک اسید (PLLA) و پلی کاپرولاکتون (PCL)، پلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان نیز هستند که تاریخچه طولانی در مصارف پزشکی دارند (Salimi et al., 2010). کیتوزان یک پلی آمینو ساکارید بیوسنتزی مشتق شده از کیتین داستیله شده است که به دلیل وجود گروه های آمین در

توانایی مهاجرت به بافت آسیب دیده سبب شده تا از آن‌ها در درمان بیماری‌ها و مهندسی بافت استفاده شود (Pereboeva et al., 2003; Roufosse et al., 2004).

در شرایط درون بدن، فاکتورهای رشدی که میانکنش‌های سلول-سلول را میانجی‌گری می‌کنند، مسئول تمایز سلول‌های زایشی اولیه (PGC) به سلول‌های بنیادی و اسپرم و اووسیت، پس از ورود به ستیغ تناسلی هستند. به طور مشابه، در تمایز آزمایشگاهی، PGCها، به فاکتورهای رشد نیاز دارند (Pellegrini et al., 2003). بیضه، منبع غنی از تعدادی از فاکتورهای رشدی، مانند BMP4، فاکتور سلول بنیادی (SCF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF $\beta$ )، فاکتور مهار کننده لوسمی (LIF)، فاکتور تمایزی رشد ۹ (GDF-9)، اکتیوین (Activin)، فاکتور رشد تبدیل کننده Beta (TGF $\beta$ )، فاکتور رشد تبدیل کننده Alpha (TGF $\alpha$ )، فاکتور رشد شبه انسولین (ILGF) و بسیاری دیگر است که در رشد و تمایز PGCها نقش مهمی دارند. (Takabayashi et al., 2001). یکی از فاکتورهای رشد که نقش مهمی در تشکیل رده سلول‌های زایشی در پستانداران دارد، BMP4 است که برای القای مزودرمی تعدادی از گونه‌های مهره‌داران

به صورت کپسول‌های دارویی، لنزهای تماسی و نیز در کشت سلولی و انعقاد خون استفاده می‌شوند (Ishaug-Riley et al., 1997).

به طور کلی فراهم کردن شرایطی که تقلیدی از شرایط داخل بدن باشد برای کشت و تمایز سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی ضروری است. در مطالعه حاضر برای فراهم شدن محیط سه بعدی لازم جهت تمایز از داربست نانوالیاف کیتوزان استفاده شد تا امکان اتصال و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست نانوالیاف به عنوان محیط سه بعدی با قطر منافذ مشخص، بررسی شود.

سلول‌های بنیادی، بر اساس منشا به دو رده تقسیم می‌شوند: سلول‌های جنینی و سلول‌های بالغ (Li and Ikehara et al., 2013). سلول‌های بنیادی بالغ، در پستانداران بالغ، از مکان‌های اختصاصی شامل مغز استخوان، خون، چربی، سینه‌ویوم، پالپ دندان، بیضه، اندومتر، بند ناف و غیره، استخراج می‌شوند. امروزه، بند ناف به عنوان یک منبع مناسب، در طب ترمیمی نظر بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Marques-Mari et al., 2009). ویژگی‌های منحصر به فرد این سلول‌ها مانند قابلیت دسترس، جداسازی راحت، تکثیر سریع و

روش الکتروریسی و در نهایت ارزیابی کیفی تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط سه بعدی و مقایسه آن با گروه شاهد است. دانش فنی به دست آمده از این پژوهش برای تولید نانوالیاف زیست‌سازگار از بیوپلیمر کیتوزان پوست میگو می‌تواند باعث ایجاد شرایط بهینه‌ای برای کشت انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) و بررسی تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی مختلف شود. در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در محیط کشت سه بعدی حاوی نانوالیاف کیتوزان در حضور محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی که حاوی فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های مختلف برای تمایز سلول‌های زایشی هستند و نیز BMP4 به عنوان عامل خارجی قرار گرفتند. تمایز سلول‌های MSC به سلول‌های زایشی با بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایشی ۱۰ و ۱۵ روز پس از کشت در دو گروه شاهد و گروه کشت سه بعدی، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه کیتین از پوسته میگو

ابتدا پوسته‌های میگوی ببری خلیج فارس

مورد نیاز است. امروزه مشخص شده است که تقسیم سلول، آپوپتوز، مهاجرت سلولی و تمایز، توسط این پروتئین‌ها تنظیم می‌شود. Lawson و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نقش مسیر پیام‌رسانی BMP در تعیین سرنوشت دودمان جنسی را قویا تایید کردند. BMP4 توسط اکتودرم خارج جنینی قبل از گاسترولاسیون و در طی آن تولید شده، به گیرنده‌های R-Smad و Alk3 در سطح سلول‌های زایشی متصل شده، سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی می‌شود. این فاکتورها سبب تشدید بیان ژن *Fragilis* در پروکسیمال اپی‌بلاست می‌شوند. بیان این ژن اولین مرحله در متعهد شدن سلول زایشی است و بیان آن در سلول‌های زایشی بدوی افزایش می‌یابد (Nagano, 2007). اضافه کردن محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی و نیز افزودن Bmp4 به محیط کشت به دلیل پیشبرد تمایز سلول‌های مزانشیمی به سمت سلول‌های زایشی است.

هدف این مطالعه در گام نخست به دست آوردن کیتین از پوست میگوهای پرورشی و صید شده در سواحل آب‌های خلیج فارس و دریای عمان، در گام دوم تهیه بیوپلیمر کیتوزان و تبدیل آن به نانوالیاف، با استفاده از

آب شستشو شدند و برای خشک شدن، به مدت ۶ ساعت در آون (Butan، ایران) با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

#### تهیه نانوالیاف کیتوزان از کیتین

۱۰ گرم کیتین به دست آمده از روش بالا در محلول ۵۰ درصد هیدروکسید سدیم در دمای جوش به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس بیوپلیمر مشتق شده، برای خنثی‌سازی، با آب شستشو داده شد. در نهایت نانوالیاف از بیوپلیمر کیتوزان با غلظت ۲۰ درصد و وزن مولکولی ۱۵۰۰۰-۲۲۰۰۰ گرم بر مول به شیوه الکتروریسی (Sistana ES Lab SBS، آمریکا) با قطر کمتر از ۵۰ نانومتر تهیه شد و به عنوان بستر برای کشت سلول‌های مزانشیمی استفاده شد (Kiyak and Cakmak, 2014).

#### تهیه محیط کشت شرایطی شده از سوسپانسیون سلول‌های بیضه‌ای

برای تهیه محیط کشت شرایطی شده ابتدا موش‌های ۵-۲ روزه، توسط کلروفورم بیهوش شدند. سپس، بیضه‌های موش توسط پنس و قیچی استریل، جداسازی شد و توسط بافر فسفات (PBS، سیناژن، ایران) حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین (سیناژن، ایران)

(*Penaeus semisulcatus*) از بازار ماهی تهیه و با آب شستشو شد. سپس به مدت یک روز زیر آفتاب خشک شد. پوسته‌های خشک شده با خردکن (Philips، آلمان) آسیاب شد. پودر به دست آمده الک شد و در نهایت ۱۰۰ گرم پودر برای استخراج کیتین به روش Chang و Tsai (۱۹۹۷) به همراه بعضی تغییرات، استفاده شد. به طور خلاصه، برای جداسازی مواد معدنی ۱۰۰ گرم پوسته میگوی ببری آسیاب شده به مدت ۴ ساعت در اسید سالیسیلیک (Merk، آلمان) ۱ میلی‌مولار قرار گرفت. سپس پوسته‌ها در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک (Sigma، آمریکا) ۷ درصد در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور شدند. پس از عبور محلول از کاغذ صافی (Whatman، آلمان)، باقی مانده برای خنثی شدن با آب مقطر شستشو داده شد. برای پروتئین‌زدایی، پوسته‌ها درون ۱۰۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (Sigma، آمریکا) ۱۰ درصد در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. محلول از کاغذ صافی رد شد و برای خنثی شدن با آب شستشو داده شد. برای حذف چربی‌ها و به دست آوردن کیتین خالص، پوسته‌ها در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتیل الکل ۹۵ درصد به مدت ۶ ساعت قرار گرفتند. سپس با

پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت سلول‌های نجسبیده با تعویض محیط کشت خارج شدند و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به عنوان سلول‌های سرتولی در نظر گرفته شدند و محیط کشت تازه به آن‌ها اضافه شد. پس از آن، هر سه روز یک بار محیط کشت رویی جمع‌آوری شده، فیلتر شد و به عنوان محیط کشت شرایطی شده، استفاده شد.

#### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وار تون بند ناف

بند ناف نوزاد سالمی که به روش سزارین متولد شده بود پس از کسب رضایت از مادر در داخل نرمال سالین تحت شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شست و شوی کامل با الکل ۷۰ درصد، بند ناف به طور کامل از هم باز شد. سیاهرگ و سرخرگ‌ها توسط پنس از بافت جدا شد. بافت باقی مانده که همان ژله وار تون است به وسیله اسکالپل به قطعات کوچک‌تر در حدود ۰/۵ میلی‌متر خرد شد. تکه‌های بافتی توسط پنس درون پلیت‌های کشت قرار گرفتند و به منظور چسبیدن قطعات بافتی به کف بستر چند دقیقه به حال خود رها شدند. پس از اطمینان از چسبیدن تکه‌های بافتی با محیط کشت DMEM

شستشو داده شد. بیضه‌ها، در ظرف حاوی محیط کشت DMEM (که شامل ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین بود) توسط قیچی استریل قطعه‌قطعه شد و بعد محیط کشت تخلیه و ۲ میلی‌لیتر مخلوط آنزیمی حاوی آنزیم‌های کلاژناز، هیالورونیداز و تریپسین (Gibco، آمریکا)، با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به بیضه‌های قطعه‌قطعه شده، اضافه شد. نمونه، به مدت ۳ تا ۵ دقیقه، در انکوباتور (Memmert، آلمان) قرار گرفت. سپس، از انکوباتور خارج شد و به مدت یک دقیقه پیتاژ شد. مخلوط به دست آمده با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ (Behdad، ایران) شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب به دست آمده که حاوی لوله‌های منی‌ساز جدا شده بود، مورد هضم آنزیمی دوم قرار گرفت (با همان ترکیب آنزی مرحله اول). پس از اطمینان از هضم لوله‌های منی‌ساز و جدا شدن سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰، سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی به فلاسک‌های (Orang Scientific، بلژیک) جدید منتقل و محیط کشت تازه به آن‌ها اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به انکوباتور (Memmert، آلمان) منتقل شد.

(Biowest، آمریکا) غنی شده با ۲۰ درصد FBS (Biowest، آمریکا) کشت داده شدند.

#### آماده کردن داربست و تیمارها

ابتدا داربست نانوالیاف کیتوزان به اندازه کف پلیت ۶ خانه‌ای (۱۰-۸ میلی‌متر) برش داده شد. سپس هر قطعه به مدت ۲۴ ساعت در معرض اتانول (Merk، آلمان) ۷۰ درصد قرار گرفت. پس از خشک شدن در دمای اتاق، دو طرف داربست توسط اشعه UV استریل شد. سپس درون پلیت قرار داده شد، با PBS شستشو شد و به مدت ۳ ساعت تحت تیمار با PBS در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت زمان مورد نظر بافر تخلیه شد و داربست مجدداً تحت تیمار با محیط کشت DMEM به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط تخلیه و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف با تراکم  $2 \times 10^5$  سلول در هر میلی‌لیتر به روش چکاندن، به حجم ۱۰۰ میکرولیتر روی داربست توزیع شد و به منظور اتصال سلول به سطح داربست، به مدت ۲ ساعت بدون افزودن محیط کشت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط کشت اضافه شد.

توزیع سلول‌های مزانشیمی طبق گروه‌بندی زیر انجام گرفت:

گروه اول: کشت سلول‌های MSC در حضور

(Biowest، آمریکا) غنی شده با ۲۰ درصد FBS (Biowest، آمریکا) کشت داده شدند. پلیت‌های کشت به درون انکوباتور با ۵ درصد  $CO_2$  و دمای  $37^\circ C$  منتقل شدند. پلیت‌ها بعد از ۳ روز کشت، به لحاظ وجود یا عدم وجود آلودگی بررسی و محیط کشت آن‌ها تعویض شد. هنگامی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از قطعه بافتی جوانه زدند و تا ۸۰ درصد رشد خود رسیدند محیط کشت رویی خارج و سلول‌ها با بافر PBS استریل شستشو داده شدند. سپس به هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متری، ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین ۲۰ درصد اضافه شد. فلاسک‌ها به مدت ۳ دقیقه در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس سلول‌ها با پیپت پاستور به آرامی از فلاسک خارج و به یک لوله فالکون استریل منتقل شدند. برای از بین بردن فعالیت تریپسین، محیط کشت حاوی سرم به لوله اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محیط رویی خارج شد و به رسوب سلولی چند میلی‌لیتر محیط کشت تازه (بسته به تعداد سلول‌ها) اضافه شد تا مخلوط به صورت سوسپانسیون تک سلولی در آید. در نهایت شمارش سلولی انجام شد و سلول‌ها به تعداد  $2 \times 10^5$  در خانه‌های یک پلیت ۶ خانه‌ای

### بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایشی

برای تعیین بنیادینگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نیز تمایز آن‌ها به سلول‌های زایشی در طی کشت، بیان بعضی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی شامل CD34، CD44 و CD105 و نیز ژن‌های اختصاصی سلول‌های زایشی شامل Plzf، Oct4، Prm1 و Stra8 مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از سلول‌های گروه‌های مختلف در طی روزهای ۱۰ و ۱۵ پس از کشت، استخراج RNA صورت گرفت و بیان ژن‌ها با استفاده از PCR بررسی شد. برای طراحی آغازگرهای مورد استفاده در PCR، توالی mRNA ژن‌های مورد نظر از بانک اطلاعاتی NCBI به دست آمد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 صورت گرفت. در این بررسی‌ها ابتدا RNA کل استخراج شد و پس از تیمار با آنزیم DNase I (سیناژن، ایران)، با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس<sup>۲</sup> (سیناژن، ایران) به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل با روش PCR (Corbet Research، استرالیا) تکثیر و

۵۰ درصد محیط کشت DMEM و ۴۰ درصد محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی به همراه ۱۰ درصد سرم گوساله و BMP4 (Sigma، آمریکا) با غلظت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر (گروه شاهد).

گروه دوم: کشت سلول‌های MSC بر روی داربست نانوالیاف کیتوزان در حضور ۵۰ درصد محیط کشت DMEM و ۴۰ درصد محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های سرتولی به همراه ۱۰ درصد سرم گوساله و BMP4 با غلظت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر (گروه آزمایشی).

هر گروه ۵ تکرار داشت و سلول‌ها به مدت ۱۵ روز تحت شرایط ذکر شده قرار گرفتند. هر سه روز یک‌بار نیز محیط کشت تعویض شد. پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت، در هر دو گروه سلولی، کلونی‌های مختلف ظاهر شدند. سلول‌ها به همراه کلونی‌های مذکور در معرض تریپسین قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها و انجام سانتریفوژ با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، رسوب سلولی در معرض تریزول و پروسه استخراج RNA قرار گرفت.

<sup>۱</sup> Real-Time Polymerase Chain Reaction

<sup>۲</sup> Reverse Transcription

<sup>۳</sup> Complementary DNA



مورد بررسی قرار گرفت. توالی آغازگرهای پیشرو و معکوس برای ژن‌های *Gapdh* و *Bta* اکتین به عنوان ژن‌های مرجع و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف در جدول ۱ آورده شده است.

الگوی واکنش PCR طی ۳۰ سیکل بر این اساس انجام شد: دمای باز شدن رشته‌های DNA: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه؛ دمای مربوط به اتصال آغازگر به DNA الگو: ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای *Prm1*، ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای *Oct4*، ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای *Plzf*، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای *CD44* و *CD105* و نهایتاً ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای *CD34* طی ۴۵ ثانیه و دمای طویل شدن رشته‌ها ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه.

در این مطالعه ریخت‌شناسی و نحوه اتصال سلول‌ها بر روی سطح داربست نیز به وسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده

ژن	توالی آغازگر (5'-3')
<b><math>\beta</math>-actin</b>	F: TGGAGAAATCTGGCACCACACC R: GTGGGCACAGTGTGGGTGACCC
<b>CD105</b>	F: CAGCATTGTGGCCTTCCTCGTG R: CCTTTTTCCGCTGTGGTGATGGAG
<b>CD34</b>	F: GCCTGGAGCAAAATAAGACC R: TGTTTGCTCCACCTTCTTGACTC
<b>CD44</b>	F: ARCCACCCAACTCCATCTTGT R: TGTTTGCTCCACCTTCTTGACTC
<b>Oct4</b>	F: GTTCTTCATTCACCTAAGGAAGG R: CAAGAGCATCATTGAACTTCAC
<b>Prm1</b>	F: CTACATCTCGGTCTGTACCTGGG R: CGGAGCTGCCAGACACGGA
<b>Stra8</b>	F: AGCAGCTTAGAGGAGGTCAAGA R: TACTCGGAACCTCACTTTTGTC
<b>Plzf</b>	F: GGTCGAGCTTCCTGATAACG R: CCTGTATGTGAGCGCAGGT
<b>Gapdh</b>	F: TTAGCACCCCTGGCCAAGG R: CTTACTTGGAGGCCATG

F: پیشرو؛ R: معکوس.

## روش‌های تحلیل آماری

تمامی اطلاعات کمی در این پژوهش به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه و به کمک t-Test تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری در مقایسه بین گروه‌ها نیز  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

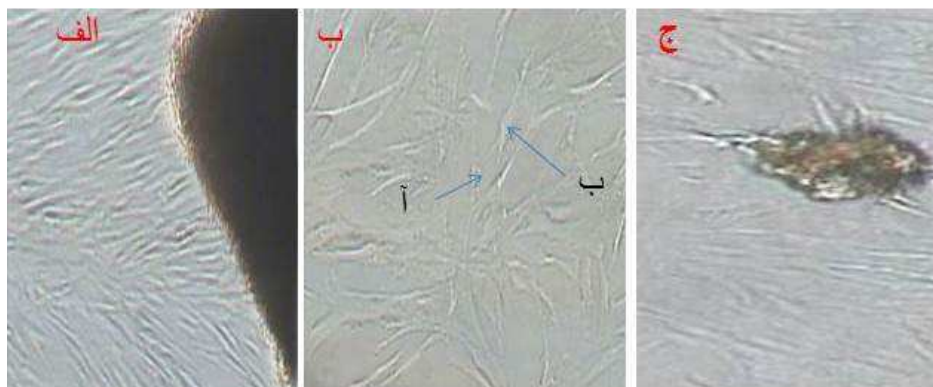
## نتایج

در این پژوهش درصد استخراج کیتوزان از پوسته میگو ۱۷ درصد بود. ۷-۵ روز پس از قرار دادن قطعات ژله وارزون در محیط کشت، جوانه‌های سلولی از کناره‌های قطعات بافتی شروع به رشد کردند (شکل ۱- الف) و یک هفته بعد کف پلیت‌ها را تا ۸۰ درصد پوشانیدند. مدت زمان کشت اولیه ۱۰ الی ۱۴ روز به طول انجامید. در این زمان سلول‌ها استخراج شده، پاساژ داده شدند و به چند پلیت تقسیم شدند. طی کشت در هر دو گروه شاهد و نانوالیاف کیتوزان، از نظر ریخت‌شناسی دو تیپ سلول چسبنده در کف پلیت مشاهده شدند (شکل ۱- ب). نوع اول سلول‌های دوکی شکلی که بیشتر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست بودند (سلول‌های آ). نوع دوم سلول‌هایی بودند که دارای زوائد سیتوپلاسمی منشعب بودند. (سلول‌های ب). این سلول‌ها هم‌زمان با افزایش

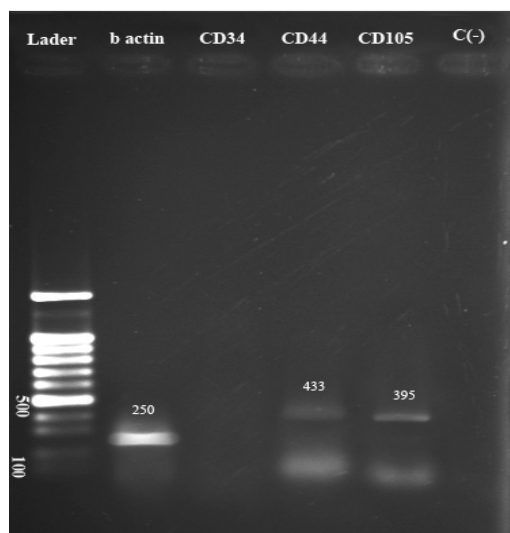
تراکم، ساختارهایی شبیه به کلنی‌های سلولی به وجود آوردند. در حالی که سلول‌های نوع اول به صورت تک لایه رشد کردند و قدرت تکثیر پایین‌تری را نسبت به سلول‌های نوع دوم داشتند. این سلول‌ها با افزایش تعداد پاساژها به تدریج حذف شدند.

قبل از کشت سلول‌های MSC، برای اثبات بنیادی بودن سلول‌ها، ژن‌های بیانی CD105 و CD44 و نیز CD34 به عنوان ژن غیربیانی و اکتین به عنوان ژن کنترل مورد PCR قرار گرفتند. مطابق شکل ۲، باند ۲۵۰ جفت بازی مربوط به بیان ژن اکتین، باند ۳۹۵ جفت بازی مربوط به بیان ژن CD105 و باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به بیان ژن CD44 است. ژن CD34 در ژل بیان نشد (شکل ۲).

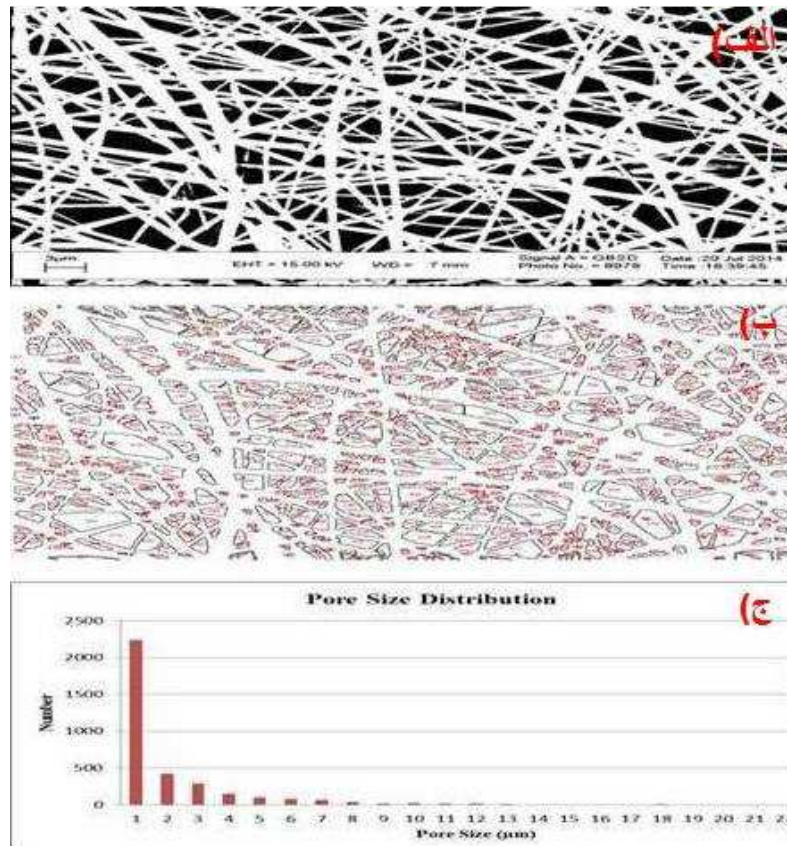
چگونگی توزیع منافذ در سطح داربست کیتوزان، با استفاده از نرم‌افزار Image J مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد منافذ حدود ۳۳ درصد از سطح داربست را اشغال کرده‌اند. اندازه بزرگ‌ترین منافذ در حدود ۵۲ میکرومتر و کوچک‌ترین آن‌ها کمتر از ۰/۰۰۱ میکرومتر بود. همچنین میانگین اندازه قطر منافذ روی داربست  $1.2 \pm 2$  میکرومتر بود (شکل ۳).



شکل ۱: ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسان. الف) خروج جوانه‌های سلولی از کناره قطعات بافت ژله وارتون پس از گذشت ۷-۵ روز پس از کشت را نشان می‌دهد. ب) دو نوع سلول در پاساژ اول قابل تشخیص هستند: سلول‌های نوع اول «آ» و سلول‌های نوع دوم «ب». ج) ساختار کلنی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون که در پاساژ دوم قرار دارند.



شکل ۲: تایید بنیادینگی سلول‌های مزانشیمی با بررسی بیان ژن‌های اکتین، CD105، CD44 و CD34



شکل ۳: چگونگی توزیع منافذ داربست کیتوزان (بزرگنمایی  $\times 5000$ ). الف) تصویر SEM. ب) تصویر گرافیکی از موقعیت منافذ. ج) نمودار توزیع منافذ

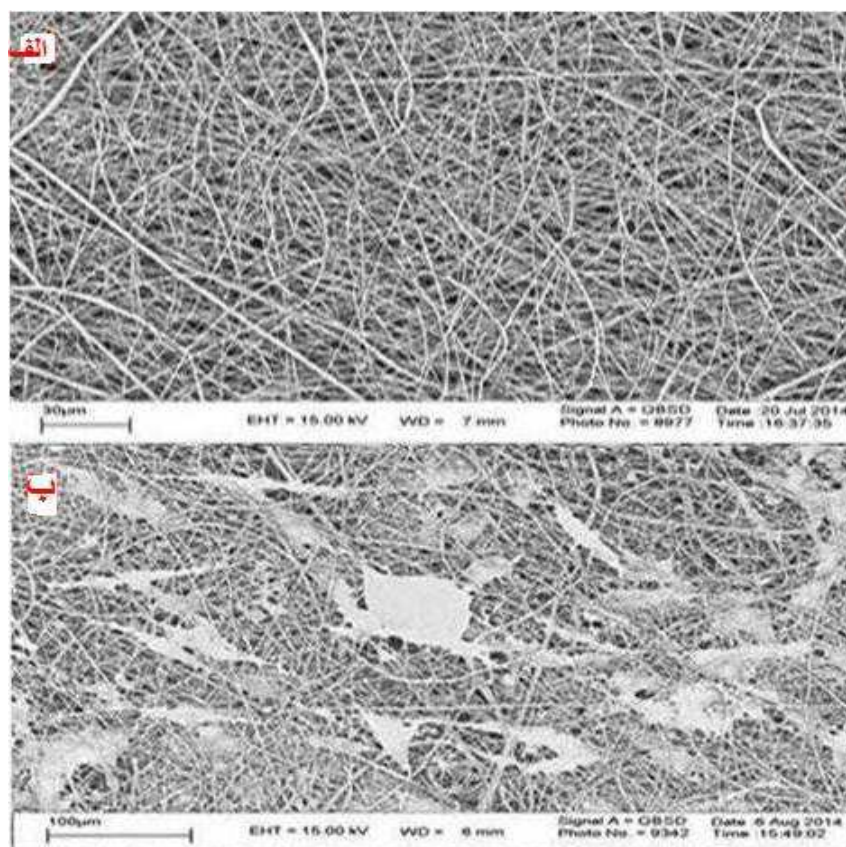
بیان ژن‌های تمایزی در طی روزهای مختلف کشت در گروه شاهد بر اساس نتایج، بیان ژن Oct4 در روزهای ۱۰ و ۱۵ پس از کشت مشاهده شد. با این توضیح که بیان آن در روزهای ۱۰ و ۱۵ تقریباً یکسان بود. ژن Plzf در روز ۱۵ پس از کشت بیان شد. ژن Stra8 و نیز ژن Prm1 در

نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی، نشان‌دهنده اتصال موفق سلول‌ها بر روی داربست بود (شکل ۴). به طور کلی بررسی میکروسکوپ الکترونی داربست نانوالیاف کیتوزان نشان می‌دهد که این داربست دارای ساختمانی متخلخل است و منافذ آن تقریباً به صورت یکنواخت پخش شده‌اند.

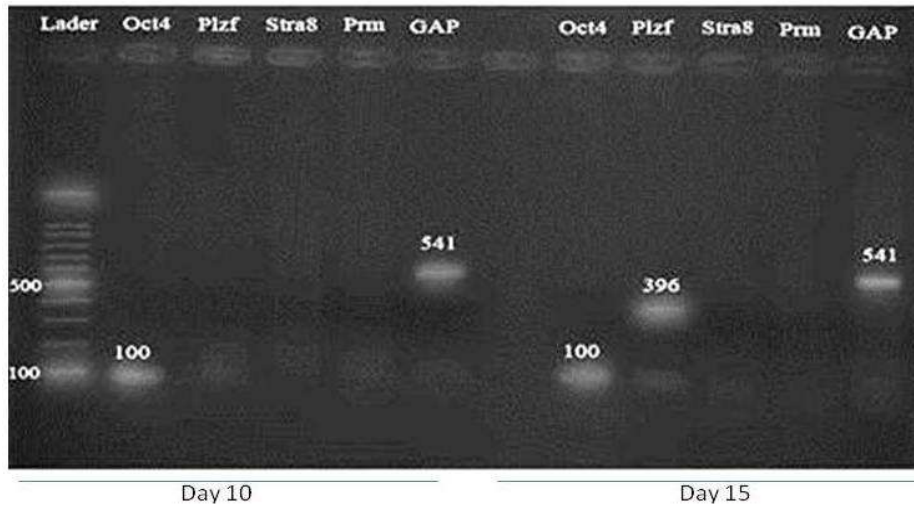
هیچ کدام از روزهای پس از کشت بیان نشد در روز ۱۰ واضح‌تر بود. ژن Plzf نیز در هر دو روز مورد مطالعه بیان شد. بیان ژن Stra8 در (شکل ۵).

بیان ژن‌های تمایزی در طی روزهای مختلف کشت بر روی داربست نانوالیاف کیتوزان روز ۱۵ پس از کشت مشاهده شد. ژن Prm1 در هیچ کدام از روزهای پس از کشت بیان نشد (شکل ۶).

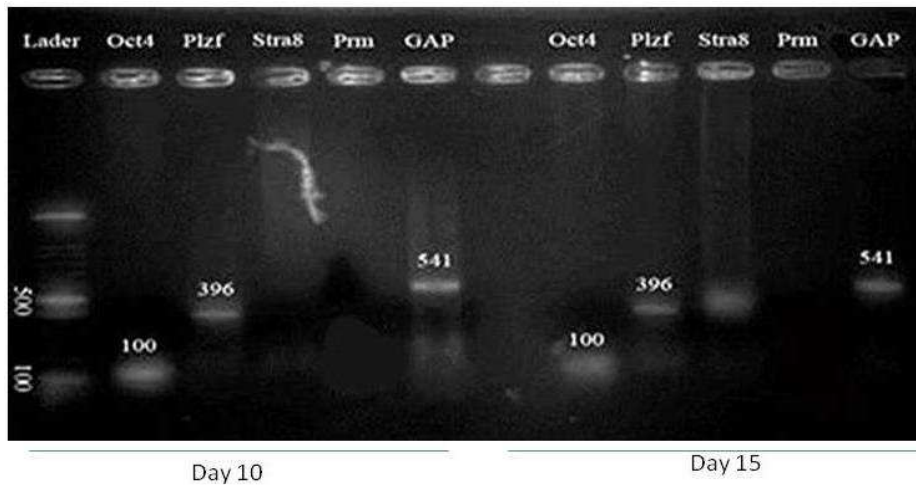
بیان ژن Oct4 در روزهای ۱۰ و ۱۵ پس از کشت مشاهده شد. با این توضیح که بیان آن



شکل ۴: تصویر SEM از رشته‌های نانوالیاف داربست. الف) قبل از کشت سلول‌ها. ب) پس از کشت سلول‌ها و تشکیل کلونی‌های فیبروبلاستی بر روی داربست



شکل ۵: مقایسه بیان ژن‌های تمایزی در گروه شاهد در روزهای ۱۰ و ۱۵ پس از کشت



شکل ۶: مقایسه بیان ژن‌های تمایزی در گروه کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف بر روی محیط سه بعدی کیتوزان در روزهای ۱۰ و ۱۵ پس از کشت

## بحث

دانشمندان معتقد هستند عوامل مختلفی در متعهد شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن‌ها به رده سلولی خاص دخیل هستند. یکی از این عوامل ماتریکس خارج سلولی است که از مواد آلی و غیرآلی از قبیل کلاژن نوع I و نمک‌های کلسیم به فرم هیدروکسی آپاتیت، نمک‌های منیزیم فلورید، فسفات و سترات تشکیل یافته است و نقش مهمی در فعال کردن فاکتورهای رشد دارد (Helmich et al., 2004). ترکیب سرم، نوع ظرف مورد استفاده در کشت سلول و تیمارهای مختلف، عوامل دیگر موثر به حساب می‌آیند. با فراهم شدن شرایط مناسب سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر هستند به انواعی از سلول‌ها شامل استخوان، نورون، غضروف و غیره تبدیل شوند (Dudley et al., 2007).

با توجه به موقعیت فضایی پیچیده اطراف سلول‌های زایشی اولیه (PGC) در شرایط درون بدن موجود زنده، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های زایشی در شرایط آزمایشگاهی، نیاز به برهم‌کنش‌های سه بعدی دارد. داربست‌ها با ایجاد ساختار سه بعدی باعث افزایش سطح می‌شوند و در نتیجه، نقش عمده‌ای در تمایز سلول‌های بنیادی ایفا می‌کنند. Liu و همکارانش در سال ۲۰۰۶

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بند ناف برای بررسی اثرات محیط کشت سه بعدی نانوالیاف کیتوزان بر تکوین و تمایز اولیه سلول‌های زایشی استفاده شد. سلول‌های بنیادی، سلول‌های پرتوانی هستند که توانایی تبدیل شدن به سلول‌های تخصصی با کارکرد ویژه را دارند و همچنین می‌توانند مثل خود را تولید کنند، یعنی خودنوسازی انجام دهند (Hass et al., 2011). این سلول‌ها، در شرایط آزمایشگاهی، برای بیش از ۱۰ پاساژ، می‌توانند به صورت تمایز نیافته، باقی بمانند. یکی از مهم‌ترین معیارها در تشخیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) حضور نشانگرهای مربوط به سلول‌های مزانشیمی و عدم حضور نشانگرهای سلول‌های بنیادی خون‌ساز است. این سلول‌ها، با حجم زیاد جداسازی می‌شوند و نسبت به CD34 و CD45 منفی هستند. تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های نورون، استخوان، غضروف، سلول‌های اندوتلیال، جزایر پانکراسی و ماهیچه‌ای، با موفقیت گزارش شده است (Pontikoglou et al., 2012).

پدیده تمایز سلول‌های بنیادی یک فرآیند پیچیده با مکانیسم مولکولی ناشناخته است.

داد که این داربست دارای ساختمانی متخلخل بود و منافذ آن تقریباً به صورت یکنواخت پخش شده بودند. یکنواختی منافذ و تخلخل بالای داربست به سلول‌ها اجازه می‌دهد تا همانند محیط طبیعی داخل بدن به طور یکنواخت در سراسر داربست پخش شده و شروع به رشد و تکثیر کنند. خواص الکترواستاتیک ذاتی کیتوزان خواص منحصر به فردی به آن می‌بخشد، به طوری که در استحکام یونی پایین زنجیره‌های کیتوزان به دلیل واکنش الکترواستاتیک بین گروه‌های آمین، کشیده می‌شود و جهت‌مندی منظمی را ایجاد می‌کند. در حالی که در استحکام یونی بالا فضای بین زنجیره‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه با افزایش منطقه اتصال و سختی ماتریکس، میانگین اندازه تخلخل نیز افزایش می‌یابد (Ishaug-Riley et al., 1997). روش‌های مختلفی برای تشکیل داربست‌ها وجود دارد. From Hall در سال ۱۹۳۴، جزو اولین کسانی است که روش الکتروریسی را اختراع کرد (Wojasinski et al., 2013). الکتروریسی پروسه‌ای است که قابلیت تولید الیاف نانوذره، به وسیله شارش الکتریکی قطرات معلق پلیمر مذاب یا محلول را دارد (Ma et al., 2005).

نشان دادند که بیان ژن‌هایی که در رشد، تکثیر و تمایز نقش دارند، در کشت سه بعدی نسبت به دو بعدی افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند. مطالعات انجام گرفته توسط Eslahi و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که تعداد کلنی‌های سلول‌های بنیادی اسپرما توگونی (SSCs) پس از کشت بر روی نانوالیاف PLLA به همراه فاکتور رشد GDNF افزایش می‌یابد. در این مطالعه، تعداد کلونی‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای در طول سه هفته اول کشت افزایش یافته بود. همچنین بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی اسپرما توگونیال در سلول‌های کشت شده روی PLLA کاهش یافت و در مقایسه، بیان ژن تمایزی (C-kit) در سیستم کشت پس از استفاده از PLLA افزایش یافت (Eslahi et al., 2013).

یکی از ویژگی‌های داربست‌ها، زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر بودن آن‌ها است (Dutta and Dutta, 2009). در این پژوهش ۱۷ درصد کیتوزان از پوسته میگو استخراج شد و به عنوان داربست مورد استفاده قرار گرفت که این مقدار با درصد استخراج شده توسط Chang و Tsai (۱۹۹۷) مطابقت داشت. بررسی میکروسکوپ الکترونی داربست نانوالیاف کیتوزان به دست آمده در این مطالعه نشان



برای تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف استفاده شد. همان طوری که نتایج نشان داد به واسطه وجود فاکتورهای رشدی مناسب در این محیط تکثیر و تمایز این سلول‌ها افزایش چشمگیری را نشان داد.

بر طبق مطالعات گذشته BMP4 قبل از هفته دوم در بیشتر بافت بیضه با غلظت‌های پایین حضور دارد (Hu et al., 2004) و نیز بیان غلظت‌های مختلف BMP4 در مرحله پاک‌تن اسپرماتوسیت، هنگامی که این سلول‌ها بعد از هفته دوم در بیضه ظاهر شدند، قابل مشاهده است و علاوه بر این، BMP4 در مراحل مختلف تکوین، در همه جای اپی‌دیدیم دیده می‌شود (Nagano, 2003). Mazaheri و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که اضافه کردن ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 بهترین اثر را روی تکثیر و سرعت زیستایی سلول‌های بنیادی جنین موش دارد. همچنین Dudley و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اثر سیگنال‌های BMP4 بر تعداد سلول‌های PGC در روش وابسته به غلظت با استفاده از غلظت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4، در محیط کشت افزایش می‌یابد. از این رو، در مطالعه حاضر غلظت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 برای تمایز سلول‌های مشابه

در مطالعه حاضر، مقایسه بیان ژن‌های تمایزی در گروه‌های شاهد و تیمار (محیط کشت سه بعدی) نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت سه بعدی به سمت تمایز رفته به طوری که بیان ژن Stra8، ۱۵ روز پس از کشت در این گروه مشاهده می‌شود. Stra8 ژن هدف رتینوئیک اسید است. بر طبق مطالعات گذشته بیان آن در مرحله قبل از میوز در سلول‌های زایشی مشاهده می‌شود (West et al., 2006). بیان ژن Stra8 در مطالعه حاضر احتمالاً بیانگر این موضوع است که این سلول‌ها درست در مرحله قبل از میوز هستند. بنابراین در گروه کشت سه بعدی پیشرفت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های زایشی در حضور نانوالیاف کیتوزان مشاهده می‌شود.

Lue و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که سلول‌های بنیادی در یک ماتریکس ویژه مشتق از بیضه، ممکن است به خطوط سلولی زایشی و سوماتیک متمایز شوند. در واقع سلول‌های موجود در محیط بیضه می‌توانند تمایز سلول‌های بنیادی به سمت خطوط سلولی زایشی را کنترل کنند (Lue et al., 2007). در مطالعه حاضر از محیط کشت شرایطی شده حاصل از سلول‌های بیضه‌ای

مختلف و در نهایت درمان بیماری‌ها با استفاده از سلول‌های بنیادی و محیط کشت‌های سه بعدی غنی شده را روشن کند. شناخت این مسیر نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

#### تشکر و قدردانی

از زحمات مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی سپاسگزاری می‌شود.

جرم از سلول‌های مزانشیمی به هر دو محیط اضافه شد.

تاکنون مطالعه‌ای برای استفاده از نانوالیاف کیتوزان ساخته شده از پوسته کیتینی میگو به شیوه الکتروریسی برای کشت طولانی مدت سلول‌ها و بررسی روند تمایز آن‌ها انجام نگرفته است. این اولین بررسی تولید نانوالیاف از بیوپلیمر کیتوزان پوست میگو با استفاده از دانش فنی به دست آمده در کشور برای تولید بسترهای سه بعدی کشت است. این مشاهدات می‌تواند افق‌های جدیدی از تکوین سلول‌های

## منابع

- Chang K.L. and Tsai G. 1997.** Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp shell waste. *Journal of Agriculture Food Chemical*, 45: 1900–1904.
- Cheung H.Y. Lau K.T. and Lu T.P. 2007.** A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites B*, 38(3): 291–300.
- Dudley B.M., Runyan C. and Takeuchi Y. 2007.** BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mechanisms of Development*, 124(1): 68–77.
- Dutta R.C. and Dutta A.K. 2009.** Cell-interactive 3D-scaffold; Advances and applications. *Biotechnology Advances*, 27: 334–339.
- Eslahi N., Hadjighassem M.R. and Joghataei M.T. 2013.** The effects of poly L-lactic acid nanofiber scaffold on mouse spermatogonial stem cell culture. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 4563–4576.
- Hass R., Kasper C. and Bohm S. 2011.** Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1): 1–14.
- Hellmich C., Barthelemy J.F. and Dormieux L. 2004.** Mineral–collagen interactions in elasticity of bone ultrastructure- a continuum micromechanics approach. *European Journal of Mechanics A*, 23(5):783–810.
- Hu J., Chen Y.X., Wang D., Qi X., Li T.G., Hao J., Mishina Y., Garbers D.L. and Zhao G.Q. 2004.** Developmental expression and function of Bmp4 in spermatogenesis and in maintaining epididymal integrity. *Developmental Biology*, 276(1): 158–171.
- Ishaug-Riley S.L., Crane G.M., Gurlek A., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J. and McIntire L.V. 1997.** Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36(1): 1–8.
- Kiyak Y.E. and Cakmak E. 2014.** Nanofiber production methods. *Electronic Journal of Textile Technologies*, 8(3): 49–60.
- Lawson K.A., Dunn N.R. and Roelen B.A. 1999.** Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes and Development*, 13: 424–436.

- Li M. and Ikehara S. 2013.** Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells International*, 2013: 1–8 (132642).
- Liu H. and Lin J. Roy K. 2006.** Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27: 5978–5989.
- Lue Y., Erkkila K. and Liu P.Y. 2007.** Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: Potential implication for men with testicular failure. *The American Journal of Pathology*, 170(3): 899–908.
- Ma Z., Kotaki M. and Inai R. 2005.** Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Engineering*, 11(1-2): 101–109.
- Marques-Mari A., Lacham-Kaplan O. and Medrano J. 2009.** Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Human Reproduction Update*, 15(3): 379–390.
- Mazaheri Z., Movahedin M. and Rahbarizadeh F. 2011.** Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 47(8): 521–525.
- Nagano M.C. 2003.** Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biology of Reproduction*, 69(2): 701–707.
- Nagano M.C. 2007.** In vitro gamete derivation from pluripotent stem cells: Progress and perspective. *Biology of Reproduction*, 76(4): 546–551.
- Pellegrini M., Grimaldi P. and Rossi P. 2003.** Developmental expression of BMP4/ALK3/SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: A potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *Journal of Cell Science*, 116: 3363–3372.
- Pereboeva L., Komarova S., Mikheeva G., Krasnykh V. and Curiel D.T. 2003.** Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. *Stem cells*, 21: 389–404.
- Pontikoglou C., Kastrinaki M.C. and Klaus M. 2012.** Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Stem Cells and Development*, 22(9): 1329–1341.
- Roufosse C.A., Direkze N.C., Otto W.R., and Wright N.A. 2004.** Circulating mesenchymal stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 585–597.

- Salimi A. Ghollasi M. and Saki N. 2010.** Application of nanoscaffolds and mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Iranian Journal of Blood and Cancer*, 3(1): 15–20.
- Takabayashi S., Sasaoka Y. and Yamashita M. 2001.** Novel growth factor supporting survival of murine primordial germ cells: Evidence from conditioned medium of ter fetal gonadal somatic cells. *Molecular Reproduction and Development*, 60(3): 384–396.
- West J.A., Park I.H. and Daley G.Q. 2006.** In vitro generation of germ cells from murine embryonic stem cells. *Nature Protocols*, 1(4): 2026–2036.
- Wojasinski M., Faliszewski K. and Ciach T. 2013.** Electrospinning production of PLLA fibrous scaffolds for tissue engineering. *Challenges of Modern Technology*, 4(1): 9–15.
- Yen M., Yang J. and Mau J. 2009.** Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 75(1): 15–21.



## The effects of chitosan nanofiber scaffold derived from Persian Gulf shrimp (*Penaeus semisulcatus*) shell on differentiation of mesenchymal stem cells to germ cells

Tooba Mirzapour<sup>1\*</sup>, Abolfazl Bayrami<sup>2</sup>, Tooraj Sohrabi Langaroudi<sup>3</sup>

Received: January 2018

Accepted: April 2018

### Abstract

In this study, differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to male germ cells was investigated on three-dimensional chitosan nanofibers. For this purpose, the chitosan nanofibers were prepared from chitin from a shell of *Penaeus semisulcatus* existing in the Persian Gulf by an electrostatic method and used as a three-dimensional environment with a specific pore diameter for culturing. The bone marrow MSCs were exposed to Sertoli cell condition medium and BMP4 was also added as an external factor. The stemness and differentiation of umbilical cord MSCs to germ cells was evaluated by expression of CD34, CD44, CD105 and some germ cell specific genes (Plzf, Stra8, Oct4 and Prm1) in control (without chitosan nanofiber) and experimental (3D culture system with chitosan nanofiber) groups 10 and 15 days after culture. The results showed that mesenchymal stem cells expressed CD105 and CD44 genes but were negative for CD34 as the hematopoietic marker. Chitosan scaffold seeded MSCs had the highest Stra8 induction. These observations can illuminate new horizons to development of germ cells using stem cells and nanofiber scaffold.

**Key words:** *Chitosan Nanofiber, 3 Dimensional Culture System, Germ Cell, Mesenchymal Stem Cell.*

1- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil Iran.

3- Assistant Professor in International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

\*Corresponding Author: [dr.tooba72@gmail.com](mailto:dr.tooba72@gmail.com)