تولیدات دامی
دوره ۱۶ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۵۱-۴۳

جداسازی و خالص‌کردن سلول‌های بنیادی پرتوان تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی از بافت بیضهٔ بز بالغ

علی‌رضا حسنی بافرانی[۱]، سیدضیاالدین میرحسینی[۲]* و فرید حیدری[۳]

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. استاد گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳. استادیار گروه زیست‌فناوری دامی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۴

چکیده

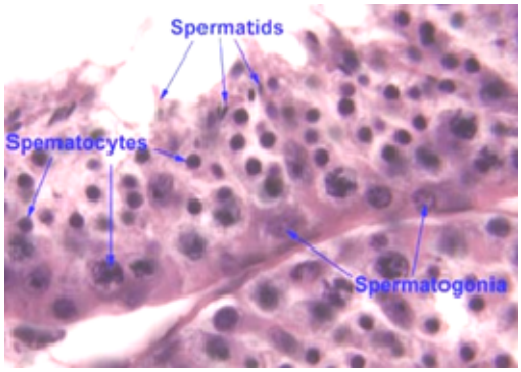
سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بنیان‌گذار و نقطهٔ شروع اسپرماتوژنز هستند و تنها سلول‌های بنیادی در بدن به‌شمار می‌آیند که می‌توانند اطلاعات ژنتیکی را از والدین به نتاج منتقل کنند. این تحقیق به‌منظور بررسی روش دسترسی به منبع قابل اطمینانی از این نوع سلول‌ها از بافت بیضهٔ بز، در طی چهار مرحلهٔ جمع‌آوری و آماده‌سازی بافت بیضه، هضم آنزیمی بافت، عبور سلول‌ها از صافی سلولی، و کاشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی روی فیبروبلاست انجام شد. نشانگرهای ژنی خاص پرتوانی چون Homeobox transcription factor(NANOG)، Sex determining region Y-box 2 (SOX2)، و Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) در سلول‌های پرتوان جداشده از بیضهٔ بز بیان شدند. تست نشانگرهای پروتئینی مانند واکنش آلکالین فسفاتاز در این سلول‌ها مثبت بود. این سلول‌ها در شرایط کشت هم‌زمان با سلول‌های فیبروبلاستی جنینی بز، برای چندین پاساژ بدون وقوع تمایز یا تغییر شکل، تکثیر شدند. افزون بر آن این سلول‌ها قابلیت نگهداری در دمای ۷۰- سانتی‌گراد را به‌مدت یک ماه با استفاده از دی‌متیل‌سولفواکساید (DMSO) داشتند. نتایج نشان داد که روش به‌کارگرفته‌شده برای جداسازی و تکثیر این سلول‌ها از بافت بیضهٔ بز مناسب است و سلول‌های حاصل افزون بر توانایی بیان ژن‌های پرتوان می‌توانند برای مدتی طولانی و در مقادیر قابل قبول و بدون تمایز در محیط کشت تکثیر شوند.

کلیدواژه‌ها: اسپرماتوگونی، اسپرماتوگونیوم، بز، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سلول‌های بنیادی بالغ.

* نویسنده مسئول
Email: mirhosin@guilan.ac.ir

مقدمه

چندین سیستم سلول بنیادی همچون پوست، فولیکول‌های مو، مغز استخوان، و بافت پوششی لوله‌های تولید اسپرم در بدن وجود دارد که کنترل جریان ردهٔ سلولی را به سمت سلول‌های تمایزیافته نهایی به عهده دارند (۸). سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بنیان‌گذار و نقطهٔ شروع اسپرماتوژنز هستند و حضورشان برای تداوم تولید اسپرماتوزوآ ضروری است (۴ و ۷). این سلول‌ها در پایهٔ اپیتلیوم لوله‌های تولید اسپرم قرار دارند و همراه با سلول‌های دختری تمایزیافتهٔ خودشان در فضایی به نام دهلیز پایه استقرار دارند (شکل ۱) (۹).



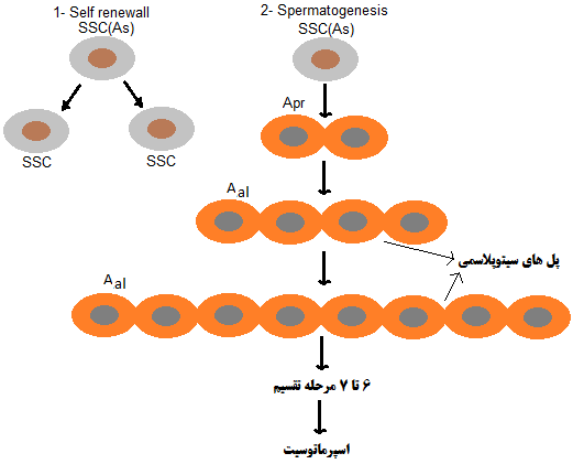
شکل ۱. مقطع لوله‌های تولید اسپرم و محل استقرار سلول‌های اسپرماتوگونی (۶)

حوزهٔ فناوری سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی (SSC)، ابزار جدید و قدرت‌مندی را برای اصلاح نژاد دام‌های اهلی، تحقیق در زمینهٔ دستکاری ژنتیکی، پیوند، بیوایمپلنت‌ها، تولید حیوانات مدل برای تحقیقات دارویی و دامپزشکی، و تحقیق در زمینهٔ تمایز سلول‌های بنیادی فراهم کرده است (۲).

سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی تنها سلول‌های بافتی هستند که بدون دستکاری ژنتیکی ویژگی پرتوانی دارند (۵ و ۱۰). این سلول‌ها منشأ سلول‌های جنسی حیوانات مذکر و تنها سلول‌هایی هستند که توانایی انتقال اطلاعات ژنتیکی به نتاج را دارند (۱).

گزارش‌های متعددی دربارهٔ استخراج سلول‌های بنیادی از بیضهٔ حیوانات مزرعه‌ای منتشر شده است. در اغلب روش‌های ارائه‌شده به‌منظور کشت این سلول‌ها از یک لایهٔ خوراک‌دهنده نیز بهره گرفته شده است (۱۲).

سن مناسب برای جداکردن سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی گوسفندی بین دو تا پنج ماه گزارش شده است (۲). سلول‌های بنیادی حاصل از سازواره‌های تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی، نشانگرهای سلول‌های بنیادی جنینی را بیان می‌کنند. سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی نوع A، زیربخشی از سلول‌های اسپرماتوگونی‌اند و با داشتن قابلیت نوسازی، در بخش پایه‌ای لوله‌های تولید اسپرم یافت می‌شوند (شکل ۲) (۱۰).



شکل ۲. سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی می‌توانند: ۱. با تشکیل دو سلول ساده، تکثیر شوند؛ و ۲. به نحوی متمایز شوند که سلول‌های خواهری ازطریق پل‌های سیتوپلاسمی به هم متصل بمانند و جفت سلول (Apr) یا زنجیرهٔ چندسلولی (Aal) را تشکیل دهند (۱۱)

در حالت طبیعی تعداد این سلول‌ها بسیار کم است، به‌طوری‌که در موش، سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی نوع A تقریباً ۰/۰۳ درصد کل سلول‌های جنسی را تشکیل می‌دهند (۱۷).

این سلول‌ها نقش اساسی در تولید اسپرماتوزوئید دارند و وجود آنها برای شروع فرایند اسپرماتوژنز و تولید پیوستهٔ اسپرماتوزوآ لازم است (۴). از این رو معرفی روشی برای جداکردن و کاشت این سلول‌ها مشروط به حفظ قابلیت پرتوانی آنها، ابزار ارزشمندی برای حفظ و ارتقای باروری در حیوانات نر، اصلاح نژاد، و تولید حیوانات تراریخت خواهد بود.

توانایی دست‌کاری ژنتیکی و انتقال این سلول‌ها، فرصت خوبی برای ایجاد حیوانات تراریخت، به‌ویژه در مواردی که استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی و یا انتقال هستهٔ سلول بدنی و برنامه‌ریزی مجدد ژنومی مشکل است، فراهم کرده است (۳).

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی مکان جداکردن و حفظ سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی از بیضهٔ بز با روشی ساده است.

مواد و روش‌ها

بیضهٔ بزهای سه تا هفت‌ماهه از کشتارگاه راک واقع در شهر کرج تهیه و روی یخ، در مدت دو ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، ابتدا بافت‌های چربی بیضه حذف شد. پس از شست‌وشو با آب و شویندهٔ معمول و ضدعفونی‌کردن سطح تونیکا توسط اتانل ۷۰ درصد، بیضه باز شد و سه تا پنج گرم از بافت بیضه جدا و پس از سه بار شست‌وشو در بافرفسفات (PBS)، به مخزن حاوی Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) منتقل شد.

بافت به‌صورت مکانیکی و با تیغ جراحی کاملاً خرد شد. برای تولید فیبروبلاست بزی، جنین‌های با سن کمتر از ۵۰ روز انتخاب و رحم حاوی آنها در کمتر از دو ساعت پس از کشتار و در شرایط دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد از کشتارگاه به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه رحم‌ها ابتدا با آب و شویندهٔ معمول شست‌وشو و سپس با الکل اتانل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. سپس رحم‌ها در زیر هود به کمک فورسپس، اسکالپل، و قیچی به گونه‌ای که کیسهٔ آمنیوتیک پاره نشود، باز شدند و کیسهٔ آمنیوتیک حاوی جنین از آن خارج شد.

در مرحلهٔ بعد، پس از ضدعفونی مجدد سطح کیسهٔ آمنیوتیک به کمک پنس و اسکالپل، کیسه پاره و جنین به پلیتی حاوی بافرفسفات مکمل‌شده با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین (سیگما-آلدریچ) منتقل شد. در این مرحله، به کمک اسکالپل بخش‌های ستون فقرات، سر، استخوان‌های قابل تشخیص، و احشای داخل بطن جدا و سایر بافت‌ها (عمدتاً پوست) پس از شست‌وشو با بافرفسفات به‌صورت مکانیکی کاملاً خرد شدند. به‌منظور جداشدن بیشتر سلول‌ها از یکدیگر، بافت خردشده به فالکون حاوی DMEM و ۰/۲۵ درصد تریپسین-اتیلن دی‌آمید تترااستیک‌استید (EDTA) منتقل شد و به مدت پنج دقیقه همراه با هم‌زدن ملایم در دمای ۳۴ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. به سوسپانسیون حاصل به نسبت یک به یک DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم جنینی گاو اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل برای ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد.

پس از حذف فاز بالایی، پلیت در DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و یک درصد اسیدآمینه‌های غیر ضروری و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین سوسپانسیون شد و سپس به تعدادی فلاسک کاشت سلول (سل استار) و پلیت کشت سلول منتقل، و در دمای ۳۸ درجه و پنج درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. هر ۴۸ ساعت یک بار محیط کشت تعویض شد. پس از شش الی هفت روز لایه‌ای سلولی در کف پلیت تشکیل شد. برای غیر فعال‌کردن سلول‌های فیبروبلاست، از میتومایسین C استفاده شد. برای این منظور هنگامی‌که پوشش تک‌لایه‌ای

سلول فیبروبلاستی بیش از ۸۰ درصد کف پلیت را محصور کرد، به محیط کشت میتومایسین C، با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. فلاسک‌ها برای سه ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی پنج درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. در مرحلهٔ بعد، محیط کشت حاوی میتومایسین C به‌دقت برداشته شد. سپس پلیت‌ها سه بار با بافرفسفات شست‌وشو داده شدند و در مرحلهٔ آخر، به آنها DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و یک درصد اسیدآمینه‌های غیر ضروری (NEAA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین اضافه شد.

برای جداکردن سلول‌ها از هم، از روش هضم آنزیمی با ایجاد تغییراتی در آن استفاده شد (۱۹). ابتدا بافت‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در DMEM حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز (سیگما-آلدریچ) و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیالورونیداز (سیگما-آلدریچ) انکوبه شدند. در انتهای زمان لازم، لوله‌های تولید اسپرم، بافت‌ها، و سلول‌های حاصل برای مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. حبهٔ حاصل، مجدداً در پنج میلی‌لیتر DMEM حاوی ۲/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم دی اِن آز (DNase I؛ سیگما-آلدریچ) و چهار میلی‌گرم در میلی‌لیتر تریپسین-EDTA (گیبکو) سوسپانسیون شد. ترکیب حاصل برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به‌منظور متوقف‌کردن عمل آنزیم‌ها، به سوسپانسیون حاصل، ۲/۵ برابر حجم DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و یک درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین (گیبکو) اضافه شد. برای حذف سلول‌های بدنی، لایدیگ و سرتولی، سوسپانسیون به‌ترتیب از دو فیلتر (فالکون) ۷۰ و ۴۰ میکرومتر عبور داده شد (۱۰).

برای بهره‌گیری از روش تعلیق سلولی، سوسپانسیون عبوری از فیلترها، برای حدود ۱۲ ساعت در محیط کشت DMEM غنی‌شده با ۲۰ درصد سرم جنینی گاو، یک میلی‌مول ال-گلوتامین (سیگما-آلدریچ)، ۰/۱ میلی‌مول اسیدآمینه‌های غیر ضروری (گیبکو)، و ۰/۱ میلی‌مول پنیسیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. طی این مدت، اغلب سلول‌های بیضه‌ای همچون سلول‌های فیبروبلاستی، سرتولی، و لایدیگ به کف پلیت می‌چسبند و یا رسوب می‌کنند، ولی سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی به‌صورت معلق باقی می‌مانند. با جمع‌آوری فاز بالایی تودهٔ سلولی خالص‌تری از سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی جدا و به مخزن حاوی فیبروبلاست بزی منتقل شد. در این تحقیق، از فیبروبلاست‌های جنینی بزی غیرفعال‌شده با میتومایسین C (سیگما-آلدریچ) به‌عنوان لایهٔ خوراک‌دهنده استفاده شد.

به این ترتیب که پس از گذشت پنج تا هفت روز از انتقال سلول‌های جمع‌آوری‌شده از سطح کشت اولیه به مخازن حاوی فیبروبلاست جنینی بز، چندین کلنی کوچک در بالای سطح تک‌لایه‌ای سلول‌های فیبروبلاست مشاهده شدند. وضعیت این کلنی‌ها از نظر قطر و تعداد، طی هفتهٔ دوم با میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد.

برای گسترش کلنی‌ها، آنها به‌صورت مکانیکی جدا و به پلیت‌های جدید حاوی فیبروبلاست‌های غیرفعال‌شدهٔ بز و در محیط کشت DMEM که با ۲۰ درصد سرم جنینی گاو، یک میلی‌مول ال-گلوتامین، ۰/۱ میلی‌مول اسیدهای آمینه غیرضروری، و ۰/۱ میلی‌مول پنیسیلین-استرپتومایسین مکمل شده بود، منتقل شدند.

برای ممانعت از تمایز، سلول‌های بنیادی بعد از پنج روز پاساژ داده شدند. برای این کار، ابتدا سلول‌ها به‌مدت دو دقیقه تحت تأثیر محلول ۰/۲۵ درصد آنزیم تریپسین-EDTA و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای توقف عمل آنزیم، DMEM مکمل‌شده

با ۲۰ درصد سرم جنینی گاو به محیط اضافه شد. پس از دستیابی به تعداد مناسبی از کلنی‌های سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی، کل محتوی RNA سلول‌های جنسی و سلول‌های فیبروبلاست جنینی بز به کمک کیت استخراج RNA (کیاژن) و مطابق با راهنمای شرکت سازنده، جداسازی شد. سپس با RNA استخراج و کیت ترانس کریپتاز معکوس (این‌ویتروژن) و براساس راهنمای آن، نسبت به سنتز cDNA اقدام شد.

در این تحقیق، از ۱۰ نانوگرم از cDNA استخراج‌شده به‌عنوان نمونه استفاده شد و از مسترمیکس (این‌ویتروژن)، برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به‌منظور تکثیر ژن‌های نشانگر پرتوانی OCT4، NANOG، SOX-2، و ژن هاوس کیپینگ H2A (Histone 2A) استفاده شد. پروتئین H2A در بسته‌بندی DNA در کروماتین دخالت دارد. پرایمرهای استفاده‌شده در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. چرخهٔ PCR نیز به‌صورت ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و در انتها ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه تعیین شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای طراحی‌شده

ژن	آغازگر	توالی (5'->3')	طول	دمای ذوب	CG درصد	طول قطعه
H2A	F	GTCGTGGCAAGCAAGGAG	۱۸	۵۸/۷	۶۱/۱۱	۱۸۲
	R	GATCTCGGCCGTTAGGTACTC	۲۱	۵۹/۷	۵۷/۱۴	
SOX2	F	TCCATGACCAGCTCGCAG	۱۸	۵۹/۴۲	۶۱/۱۱	۱۳۷
	R	GCCTCGGACTTGACCACAGA	۲۰	۶۱/۸۲	۶۰	
Nanog	F	TGCGGAGGAGAGCACAGAG	۱۹	۶۲	۶۱/۲	۴۰۷
	R	GCTCCAAGACTGACTGTTCC	۲۰	۶۲	۵۸	
Oct-4	F	AGAAGAGGATCACCCTAGG	۱۹	۵۸	۵۶/۶	۲۴۱
	R	TCCGCTTTCTCTTTCGGG	۱۹	۶۰	۵۷/۹	

برای تأیید وجود سلول‌های اولیه، از واکنش آلکالین فسفاتاز در سلول‌های جنسی حاصل از بافت بیضه استفاده شد (۱۸). رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز به کمک کیت رنگ‌آمیزی (سیگما-آلدریچ) انجام شد.

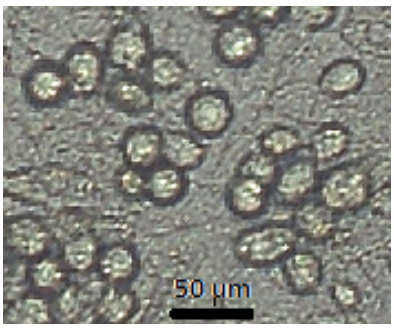
پس از رنگ‌آمیزی، پلیت حاوی سلول، با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. وجود رنگ در سطح سلول‌ها بیانگر واکنش آلکالین فسفاتاز بود. برای بررسی اثر انجماد بر توانایی زنده‌مانی و حفظ پرتوانی در سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی از DMSO با غلظت ۰/۷ مول بر لیتر که با سوکروز (۰/۱ مول بر لیتر) و سرم جنینی گاو (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مکمل شده بود، به‌عنوان محافظ سرما استفاده شد (۲۰). در ابتدا سوسپانسیون سلولی برای مدت پنج دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف محیط کشت، پلیت سلولی در ترکیب محافظ سرما حل شد و به ویال‌های مخصوص انجماد دو میلی‌لیتری منتقل شد. بلافاصله ویال‌ها به یخچال با دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد انتقال داده و برای مدت دو ساعت در آن محیط نگهداری شدند. سپس ویال‌ها به‌سرعت به

یخچال ۲۰- برده شدند و پس از دو ساعت به فریزر ۷۰- سانتی‌گراد انتقال داده و مدت یک ماه در شرایط ثابت نگهداری شدند. سپس ویال‌ها از فریزر خارج و برای مدت دو دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از یخ‌گشایی، بلافاصله ویال‌ها برای مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از برداشت فاز رویی، پلیت سلولی در دو میلی‌لیتر DMEM محلول شد و دوباره سانتریفیوژ شدند.

پس از اتمام مراحل فوق پلیت حاصل در DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و یک درصد اسیدآمینه‌های غیر ضروری حل شد و سپس به پلیت‌های کشت منتقل شد. پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی پنج درصد دی‌اکسید کربن انتقال داده شد.

نتایج و بحث

کلنی سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی، به‌صورت لایه‌ای در سطح بالایی سلول‌های فیبروبلاست تشکیل شد (شکل ۳). سلول‌های کلنی شکل کروی دارند و حدود سلولی آنها قابل تشخیص و دارای هستهٔ متراکم و مشخص هستند. هستهٔ این سلول‌ها متمایل به سمت دیوارهٔ سلولی است (شکل ۴).

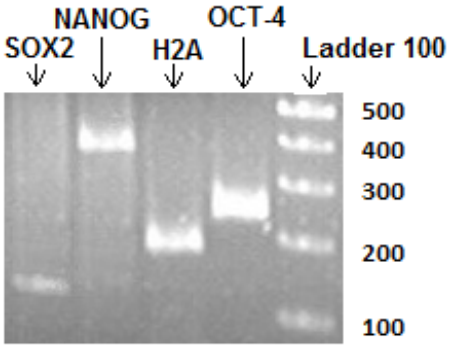


شکل ۳. کلنی‌های سلول بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی تشکیل‌شده روی سلول‌های فیبروبلاست جنینی

شکل ۴. سلول بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی و سلول‌های فیبروبلاست جنینی

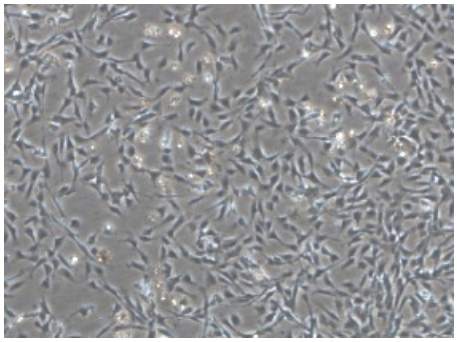
نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های اسپرماتوگونی جداشده از بافت بیضه، نشانگرهای OCT4 و NANOG را به‌صورت بارز و نشانگر SOX-2 را به‌صورت ضعیف‌تر بیان کردند (شکل ۵).

ژن هیستون-2A نیز به‌خوبی در این سلول‌ها بیان شد که نشانهٔ صحیح‌بودن اجرای مراحل آزمایش است.



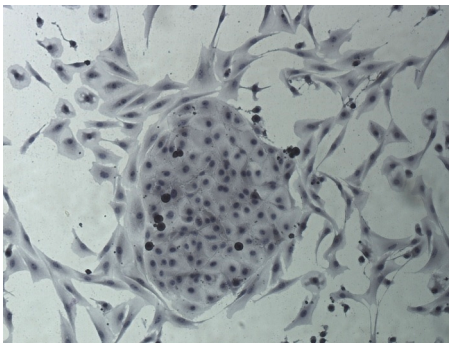
شکل ۵. باندهای مربوط به محصولات PCR

ارزیابی میکروسکوپی سلول‌های فیبروبلاست تولیدشده، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی آنها را تأیید کرد. این سلول‌ها پس از چسبیدن به کف پلیت، شکل کروی خود را از دست دادند و به‌صورت بی‌قاعده و نامنظم توزیع شدند و دارای حاشیه‌های نوک‌تیز بودند (شکل ۶).



شکل ۶. فیبروبلاست‌های جنینی بز

نفوذ رنگ بنفش در همهٔ سلول‌های کلنی نشانهٔ اولیه‌بودن این سلول‌هاست (شکل ۷). افزن بر آن وجود رنگ بنفش در سلول‌های فیبروبلاستی لایهٔ خوراک‌دهنده نیز به‌دلیل جنینی‌بودن این سلول‌ها است.



شکل ۷. کلنی‌های سلول بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی روی سطح سلول‌های فیبروبلاستی پس از رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز

واکنش سلول‌های یخ‌گشایی‌شده با تریپان بلو چهار درصد نشان داد که حدود ۶۰ درصد از سلول‌ها طی فرایند انجماد سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی با استفاده از DMSO و پس از یخ‌گشایی، از بین رفتند. این امر در حالی است که طبق دیگر گزارش‌ها، استفاده از روش انجماد ذکرشده در بالا می‌تواند تقریباً ۵۰ درصد از سلول‌ها را حفظ کند (۶).

براساس نتایج پژوهش حاصل، استفاده از سلول‌های فیبروبلاست غیرفعال‌شدهٔ بزی می‌تواند زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی را تضمین کند و تعداد آنها را افزایش دهد. این نتیجه با گزارش‌های قبلی دربارهٔ کشت سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی گاو روی یک لایه از سلول‌های خوراک‌دهنده و همچنین امکان کشت سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی روی سطح سلول‌های خوراک‌دهنده مطابقت دارد (۱۴ و ۲۱).

سلول‌های بنیادی تولیدکنندهٔ اسپرماتوگونی به‌دست‌آمده در این تحقیق از نظر صفات ریخت‌شناسی مانند شکل هسته، وجود و حالت هتروکروماتین، دانه‌دانه‌بودن یوکروماتین، و میزان فشردگی، مشابه گزارش محققان دیگر است (شکل ۳) (۴). در این تحقیق، سوسپانسون سلول‌های کشت‌داده‌شده و خوراک‌دهنده در دمای ۷۰- به‌مدت یک ماه منجمد شد و پس از طی این مدت از حالت انجماد خارج و به محیط کشت انتقال داده شد.

تشکیل کلنی از این سلول‌ها، زنده‌بودن این سلول‌ها را تأیید کرده و بیانگر عملیاتی‌بودن این روش برای نگهداری کوتاه‌مدت این سلول‌ها برای مقاصدی همچون حمل‌ونقل است. بدیهی است که به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت می‌بایست از انجماد در نیتروژن مایع استفاده کرد (۱۳ و ۲۰). انجماد طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی انسان و موش با تکنیک مشابه قبلاً گزارش شده است (۱۶).

نتایج نشان داد که روش به‌کارگرفته‌شده در این تحقیق برای جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی مناسب است و سلول‌های به‌دست‌آمده توانایی بیان ژن‌های SOX-2، Nanog، و Oct-4 که در کنترل فرایند رونویسی نقش بازی می‌کنند، را دارند (۱۵).

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه گیلان، گروه دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی و مدیریت کشتارگاه راک واقع در شهر کرج و همچنین همکاری سایر مؤسسات قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Apont PM and DG De Rooij (2008) Biomanipulation of bovine spermatogonial stem cells. Animal Reprodution. 5(1/2): 16-22.
2. Borjigin Uynbilig, Ting Yun, Muren Herrid and Shorgan Bou (2012) Characterization and Isolation of Ovine Spermatogonial Stem Cells. Animal and Veterinary Advances. 11(8): 1242-1245.
3. Dobrinski I and JR Hill (2006) Male germ cell transplantation in livestock. Reproduction, Fertility and Development 18: 13-18.
4. Guilherme MJ Costa, Gleide F Avelar, Jose V Rezende-Neto, Paulo Henrique A Campos-Junior, Samyra MSN Lacerda, Bruno SC Andrade, Ralph Gruppi Thome, Marie-Claude Hofmann and Luiz R Franca (2012) Spermatogonial Stem Cell Markers and Niche in Equids. PLOS ONE. 7(8): 1-13.
5. Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K and DG De Rooij (2002) Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction. 124: 85-94.
6. Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, Krista Den Ouden, LB Creemrs, H Woelders and DG Rooij (2002) Development of a Cryopreservation Protocol for Type A Spermatogonia. Andrology. 23(4): 537-545.
7. Kolsa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M and Wiszniewska B (2012) The generating of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. Reproductive Biology. 12(1): 5-23.
8. Alison MR, Poulsom R, Forbes S and Wright NA (2002) An introduction to stem cells. Pathology 194(4): 419-23.
9. Lonnie D Russell, Robert A Ettlin, Amiya P, Sinha Hikim and Eric D Clegg (1993) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Andrology. 16(1): 83-83.
10. Mayako F, Sung-Min K, Naojiro M, Masayasu Y and Hiroshi I (2011) Characterization and In Vitro culture of male germ cells from developing bovine testis. Reproduction and Development. 57(3): 355-364.
11. Mizrak SC and DG De Rooij (2008) Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. Development. 135: 2207-2213.
12. Nagano M, Mary R Avarbock, Efren B Leonida, Clayton J Brinster and Ralph L Brinster (1998) Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue and Cell. 30(4): 389-397.
13. Nagano M, Patrizio P and Brinster RL (2002) Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. Fertil Steril. 78: 1225-33.
14. Oatley JM (2004) Development of Culture Methods for Spermatogonial stem cells and Ectopic Testicular Xenografting in the Bull. Washington State University. Department of Animal Sciences, Ph.D. Dissertation.
15. Oatley Jon, Mary R. Avarbock, Aino I Telaranta, Douglas T Fearon and Ralph L Brinster (2006) Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. PNAS. 103(25): 9524-9529.
16. Quesnell MM, Zhang Y, De Avila DM, Bertrand KP and Reeves JJ (2000) Immunization of male mice with luteinizing

hormone-releasing hormone fusion proteins reduces testicular and accessory sex gland function. Biology of Reproduction. 63(1): 347-53.

17. Rooij DG De and Van Pelt AMM (2003) Spermatogonial Stem Cell Biology. Annual Review of Biomedical Sciences. 5: 105-114.

18. Sandeep Goel, Miki Sugimoto, Naojiro Minami, Masayasu Yamada, Shinichi Kume and Hiroshi Imai (2007) Identification, Isolation, and In Vitro Culture of Porcine Gonocytes. Biology of Reproduction. 77: 127-137.

19. Van Pelt Ans MM, Anna Rita Morena, Federica MF van Dissel-Emiliani, Carla Boitani, Ingrid C Gaemers, Dirk G de Rooij and Mario Stefanini (1996) Isolation of the Synchronized A Spermatogonia from Adult Vitamin A-Deficient Rat Testes. Biology of Reproduction. 55: 439-444.

20. Wyns Christine, Anne Van Langendonckt, Francois-Xavier Wese, Jacques Donnez and Mara Curaba (2008) Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. Human Reproduction. 23(11): 2402-14.

Yan L, Lei L, Yang C, Gao Z, Lei A, Ma X and Dou Z (2008) Isolation and cultivation of goat embryo stem cells. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 24(9): 1670-6.