جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Original Article

The Effect of FBS Concentration on Cryopreservation of Isolated Spermatogonial Cells from Neonatal Mouse by MACS Method

Jannat Alipoor F., M.Sc., Sadighi Gilani M. A., M.D.*, Eftekhari-Yazdi P., Ph.D., Daneshzadeh M.T., D.V.M., Khakzad H., D.V.M.

** P.O.Box: 19395-4644, Andrology Department, Royan Institute , Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The purpose of this study was the separation of spermatogonial cells from prepubertal NMRI mouse testis by magnetic activating cell sorting(MACS) method and assessment of FBS concentration on surviving these cells after cryopreservation.

Materials and Methods: Testes from 6-days-old mouse removed and digested in two enzymatic mediums. first 8-9 min at medium containing collagenase, trypsin and DNase and second 10-12 min in medium containing collagenase, trypsin, DNase, hyalloronidase and EDTA and then the spermatogonial cells were isolated by (MACS) method. In the freezing step, the cells were frozen in three medium containing DMEM/F12 medium, 10% DMSO and 50%, 60% and 70% FBS serum ,named group I,II.III.

Results: The viable cells obtained after enzymatic disaggregation were 91.66%±0.60% and after being isolated by MACS method were 95.25%±0.33%. The purity of the isolated cells was 93.79%±2.20%. The cells frozen in group I, II and III had 39.09%±0.15, 85.55%±6.98 and 90/29±1/38 % viability, respectively.

Conclusion: according to the obtained results, the increase of temperature at digestion step reduces the time of testicular tissue disaggregation and consequently increase viable cells. Higher viable cells and purity can be attained by using of α6 integrin and magnetic beads. The results show that spermatogonial cells in freezing media containing 60% - 70% FBS have the highest viability after thawing.

Keyword: Spermatogonial stem cell, Magnetic Activated Cell Sorting, Cryopreservation, Infertility

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقی

تأثیر غلظت سرم FBS بر انجماد سلول‌های اسپرماتوگونیای جداشده از موش نابالغ به روش MACS

فیروز جنت‌علیپور M.Sc.*، ✍ محمدعلی صدیقی گیلانی M.D.، پوپک افتخاری‌یزدی Ph.D.*****
محمدتقی دانش‌زاده D.V.M.**، هادی خاکزاد D.V.M.******

*گروه آندرولوژی پژوهشکده رویان ، تهران، ایران
**دانشکده زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه تهران، ایران
***گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان، تهران، ایران
****بخش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشکده رویان، تهران، ایران
*****بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتیو پاستور ایران، تهران، ایران
تاریخ وصول: شهریورماه ۸۷، تاریخ پذیرش: آبان‌ماه ۸۷

چکیده

هدف: جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیا از موش نابالغ NMRI (national medical research institute) با روش جداسازی مغناطیسی سلولی و بررسی تأثیر غلظت FBS(Fetal Bovine Serum) بر میزان زنده ماندن این سلول‌ها پس از انجماد.

مواد و روش‌ها: بیضه جدا شده از موش‌های ٦ روزه نژاد NMRI ابتدا در دو محیط آنزیمی مختلف قرار داده شد. ابتدا ۸ تا ۹ دقیقه در محیط اول حاوی آنزیم‌های کلاژناز، تریپسین و DNAseI و پس از شستشو با محیط DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) به‌مدت ۱۰ تا ۱۲ دقیقه در محیط دوم حاوی آنزیم‌های کلاژناز، تریپسین، DNaseI، هیالورونیداز و EDTA(Ethylene Diamine Tetra acetic Acide) قرار گرفت. سپس سوسپانسیون منفرد سلولی به‌دست آمد. در مرحله بعد سلول‌ها با استفاده از روش جداسازی MACS (magnetic activated cell sorting) جدا شدند. سپس درصد خلوص این سلول‌ها به‌وسیله فلوسایتومتری مشخص شد. در مرحله انجماد، سلول‌ها به‌وسیله محیط‌های انجمادی حاوی محیط KSOM(potassium simplex optimized medium) به‌علاوه ۱۰ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide)تکمیل شده با ۳ غلظت مختلف ۵۰، ٦۰ و ۷۰ درصد از FBS منجمد شد که به‌ترتیب گروه اول، دوم و سوم نام گرفت.

یافته‌ها: میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از تیمار آنزیمی ۰/٦۰±۹۱/٦٦ درصد و بعد از جداسازی به روش MACS، ۰/۳۳±۹۵/۲۵ درصد و میزان خلوص سلول‌های جداسازی شده ۲/۲۰±۹۳/۷۹ درصد بود. میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از انجماد، در گروه اول ۰/۱۵±۰/۰۹ ۳۹ درصد و و در گروه دوم ٦/۹۸±۸۵/۵۵ درصد و در گروه سوم ۱/۳۸±۹۰/۲۹ درصد بود. این میزان بین گروه اول با گروه‌های دوم و سوم اختلاف معنی‌داری نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند که افزایش دما زمان هضم بافت بیضه را در محیط آنزیمی کاهش می‌دهد. با استفاده از آنتی‌بادی α6 اینتگرین و دانه‌های مغناطیسی Dynabead میزان بیشتری از سلول‌ها زنده مانده و با درجه خلوص بالاتری جدا می‌شوند. همچنین بقای سلول‌ها در محیط انجمادی حاوی ٦۰ الی ۷۰ درصد FBS افزایش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا، جداسازی سلولی با روش مغناطیسی، انجماد، ناباروری

✍ **آدرس مکاتبه:** تهران، پژوهشکده رویان، گروه آندرولوژی، صندوق پستی: ٤٦٤٤-۱۹۳۹۵
Email: masadighi@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

پیشرفت‌های قابل ملاحظه در زمینه شیمی‌درمانی و رادیوتراپی در سال‌های اخیر منجر به درمان حدود ۸۰ درصد افراد سرطانی شده است [۱]. متأسفانه از آثار منفی این نوع روش‌های درمانی اختلال در اسپرماتوژنز بیضه و ناباروری است [۲]. راه حل موجود برای مردان بالغ، انجماد اسپرم به منظور انجام لقاح در محیط کشت IVF(in vitro fertilization) یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection) است. اما در پسرهای نابالغ به‌دلیل عدم وجود اسپرم این امکان وجود ندارد. در سال‌های اخیر برای حل این مشکل دو راه پیشنهاد شده است که شامل پیوند(transplantation) سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا یا پیوند بافت بیضه (grafting) است [۲].

طی پدیده اسپرماتوژنزدر انسان روزانه حدود ۱۰۰ میلیون اسپرم تولید می‌شود. در پستانداران، اسپرماتوزوآ حامل اطلاعات ژنتیکی است که به نسل بعد منتقل می‌شود. بنابراین، فرآیند تولید اسپرم، برای حفظ و تنوع گونه‌ها ضروری است (۳). ادامه فرآیند اسپرماتوژنز در طول زندگی به تنظیم دقیق و تمایز پیوسته سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا وابسته است. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا، سلول‌های منفردی هستند که در غشای پایه اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز واقع شده‌اند. در موش بالغ تنها ۰/۰۳ درصد کل سلول‌های زاینده، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا هستند. آن‌ها تنها نوع سلولی هستند که می‌توانند دوباره ایجاد جمعیت کرده و پس از پیوند باروری را در حیوانات دریافت کننده که به طور مادرزادی عقیم هستند، از سر گیرند [٤]. یک ابزار کلیدی برای مطالعه بیولوژی سلول بنیادی اسپرماتوگونیا، توانایی غنی سازی و حفظ جمعیت سلول بنیادی در *In vitro* برای دوره طولانی است [٥]. پیش نیاز مهم برای نگهداری طولانی مدت سلول بنیادی اسپرماتوگونیا در کشت، خلوص جمعیت سلولی اولیه است و مطالعات نشان داده‌اند که در دو هفته اول دوره کشت، زمانی که سلول بنیادی اسپرماتوگونیا به شرایط کشت حساس است، درجه خلوص سلول بنیادی اسپرماتوگونیا حیاتی بوده و اگر غلظت آلودگی جمعیت سلول سوماتیکی بالا باشد، زودتر از سلول بنیادی اسپرماتوگونیا رشد می‌کنند. سلول‌های سوماتیک دارای اثر زیان‌آور بر خود تجدیدی و گسترش سلول بنیادی اسپرماتوگونیا هستند، بنابراین لازم است که جمعیت سلولی آن خالص شده و کشت با جمعیت خالص‌تری از سلول اسپرماتوگونیا شروع شود [٦].

چندین روش مختلف برای جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا از بیضه وجود دارند که شامل پلاتینگ افتراقی [۷]، استفاده از دهندگان کریپتورکید [۸و۹]، جداسازی سلولی با روش فلورسنت FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) [۱۰و۱۱] و MACS(macs activating cell sorting) [۱۲و۱۳] است. خالص‌ترین جمعیت از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا با استفاده از روش‌های FACS و MACS به‌دست می‌آیند که بر پایه نشانگرهای سطح سلولی عمل می‌کنند [٤].

مشکل پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا نگهداری آن‌ها است. یک راه حل کشت کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت این سلول‌ها است که در مطالعات متعددی گزارش شده است [٤]. راه حل دیگر انجماد است تا بعد از طی دوره درمان سرطان بتوان سلول‌ها را به بیمار نجات‌یافته از سرطان پیوند زد [١٤]. در سال ۲۰۰۲، ایزدیار (Izadyar) و همکاران روشی برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در گاو ارایه دادند که در آن ازDMSO به همراه FCS (fetal calf serum) برای انجماد استفاده کردند که نتایج خوبی به‌دست آمد [١٤]. کاناتسو شیناهارا (Kanatsu-Shinohara) و همکاران نیز سلول‌های تازه و منجمد شده را در موش پیوند زدند و بازگشت باروری را در موش‌های گیرنده گزارش دادند [١٥]. در مطالعات سلول‌های بنیادی جنینی از FBS برای انجماد سلول‌ها استفاده شد و مشخص شد که بر بقای سلول‌ها در زمان انجماد، تأثیر مثبت دارد [١٦و١٧]. در مطالعه حاضر از روش MACS برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونیای موش استفاده شد و

همچنین میزان بقای سلول‌ها در سه مرحله، بعد از هضم آنزیمی، بعد از جداسازی با روش MACS و بعد از انجماد و ذوب، بررسی و برای اولین بار تأثیر سرم FBS بر انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی مطالعه شد. در مطالعات قبلی مشخص شد که روز ٦ بعد از تولد اولین زمان ایجاد اسپرماتوگونیا است [۱۸و۱۹] دراین مطالعه موش‌های ٦ روزه انتخاب شدند که درصد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا که بیان کننده نشانگر a6 اینتگرین هستند بیشتر باشد.

مواد و روش‌ها

بیضه موش‌های ٦ روزه (در هر مطالعه ۱۵-۲۰ موش) از نژاد NMRI ابتدا در دو محیط آنزیمی طبق مطالعات قبلی [۱۹] با کمی تغییر به شرح زیر قرار گرفتند: ۸ تا ۹ دقیقه در محیط DMEM/F12 حاوی آنزیم‌های کلاژناز نوع I (sigma) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تریپسین (gibco) با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و DNaseI (roche) با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بعد از این زمان ۳ میلی‌لیتر محیط شامل ۱۵ درصد سرم FBS برای مهار عمل آنزیم به آن اضافه و در لیوان حاوی یخ به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد تا در واحد گرانی لوله‌های سمینی‌فر ته‌نشین شوند، سپس محیط رویی برداشته و دور ریخته شد و لوله‌ها دوبار در محیط فوق بدون سرم شستشو داده شد. در مرحله دوم لوله‌های سمینی‌فر ۱۰ تا ۱۲ دقیقه در محیط مشابه محیط اول با اضافه کردن آنزیم هیالورونیداز (sigma) با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و EDTA (sigma) با غلظت ۰/۵ میکرومولار قرار گرفت و سوسپانسیون منفرد سلولی به‌دست آمد. این سوسپانسیون سپس از فیلتر مش ٤۰ میکرومتری (BDbioscience) عبور داده شد تا قطعات خرد نشده و اضافی حذف شود. در مرحله بعد سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه علیه a٦ اینتگرین (rat anti human CD49f, serotec) (نشانگر سطحی سلول‌های اسپرماتوگونیا) و مگنت (sheep anti rat dynabeades, dynalbiotech) طبق آموزش‌های کارخانه سازنده با کمی اصلاح به شرح زیر جدا شد:

ابتدا تعداد ۱×۱۰^{۷} سلول در ۱ میلی‌لیتر بافر I (۹/۹۹ میکرولیتر PBS (phosphate buffer saline)، ۱ میکرولیتر HSA(Human serum Albumin) (vitrolife, Sweden) در یک آزمون تیوب سوسپانس شده و ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه (rat anti human CD49f (α6 integrin ,serotec) به آن اضافه شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از۲۰ دقیقه سلول‌ها در ۳۰۰g به‌مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد ۲۵ میکروگرم آنتی‌بادی ثانویه متصل شده به دانه‌های مغناطیسی (M450 sheep anti rat dynabeades ,dynalbiotech) به سوسپانسیون ۱ میلی‌لیتری این سلول‌ها اضافه شد. بعد از مدت زمان ۲۰ دقیقه ۱ میلی لیتر بافر I به آن اضافه شد و آزمون تیوب در معرض میدان مغناطیسی قرار داده شد و در این مرحله سلول‌هایی که دانه‌های مغناطیسی به آن‌ها متصل بوده به دیواره تست تیوب چسبیده و جدا شد. محلول اضافه دور ریخته شد و سلول‌های چسبیده به لوله ٤ بار در محیط DMEM/F12 شستشو داده شده و در نهایتً در این محیط سوسپانس شده و برای مرحله انجماد آماده شد. سپس درصد خلوص این سلول‌ها به‌وسیله فلوسایتومتری مشخص شد.

سلول‌ها در سه گروه به شرح زیر منجمد شد:

گروه اول:۱۰ درصد DMSO (sigma) و ۵۰ درصد FBS در محیط KSOM

گروه دوم:۱۰ درصد DMSO (sigma) و ٦۰ درصد FBS در محیط KSOM

گروه سوم: ۱۰ درصد DMSO (sigma) و ۷۰ درصد FBS در محیط KSOM

سلول‌ها در هر سه گروه، بعد از اضافه کردن محیط انجمادی به آن‌ها به مدت ٢٤ ساعت در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از این زمان در مدت زمان کمتر از ۱ دقیقه به فریزر نیتروژن مایع انتقال داده شد و بعد از

گذشت ۱۵ روز، ذوب و میزان بقای آن‌ها بررسی شد.

برآورد میزان بقای سلول‌ها در سه مرحله، یعنی بعد از هضم آنزیمی، جداسازی به روشMACS و ذوب سلول‌ها با رنگ آمیزی PI(Propidium Iodide) و آنالیز فلوسایتومتری صورت گرفت و در هر مرحله ۱۰۰۰۰ سلول شمارش شد.

نتایج به‌دست آمده از بررسی داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزارهای آماری تجزیه و تحلیل شد. اختلاف میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از انجماد در سه گروه اول، دوم و سوم به‌وسیله آزمون ANOVA و سپس آزمون تکمیلیTueky HSD با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ تجزیه و تحلیل شد. تمامی داده‌ها به‌همراه میانگین خطای استاندارد (SE) ذکر شده‌اند.

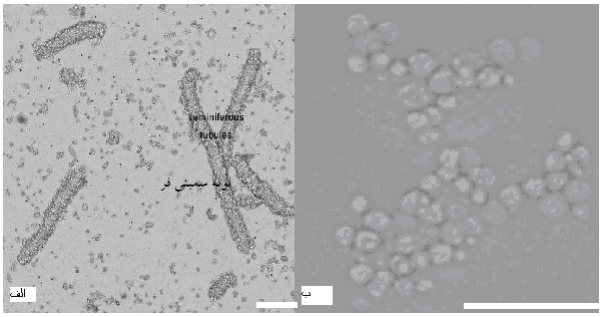
یافته‌ها

جداسازی در مرحله اول آنزیمی

در این مرحله هضم در زیر میکروسکوپ وارونه بررسی شد و همان‌طوری که در شکل۱ پیداست لوله‌های سمینی‌فر جدا شد. علاوه بر لوله‌های سمینی‌فر سلول‌های دیگری هم در شکل پیداست که شامل بقیه سلول‌های موجود در بافت بیضه و سلول‌هایی از لوله‌های سمینی‌فر است که کاملاً هضم شدند، این سلول‌ها بعد از ته نشین شدن لوله‌های سمینی فر، چون سبکتر هستند در محیط رویی باقی می‌ماند و از محیط حذف می‌شود.

جداسازی در مرحله دوم آنزیمی

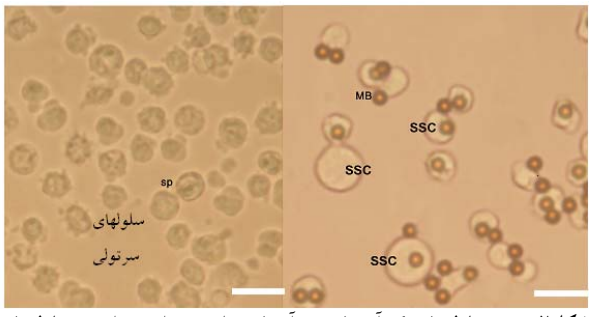
در این مرحله بعد از قرار گیری در آنزیم، سلول‌ها به فاصله زمانی ۵ دقیقه پیپتاژ شد و هضم در زیر میکروسکوپ وارونه بررسی شد و بعد از مدت زمان ۱۰ تا ۱۲ دقیقه لوله‌ها هضم شد و سوسپانسیون تک سلولی به‌دست آمد (شکل۱ب).در این مرحله درصد حیات سلول‌ها بعد از ۳ تکرار ۰/۶۰±۹۱/۶۶ بود.



شکل ۱. الف) لوله‌های سمینی‌فر بعد از مرحله اول آنزیمی، ب) سوسپانسیون تک سلولی به‌دست آمده بعد از مرحله ۲ آنزیمی (بار: ۱۰۰ میکرومتر).

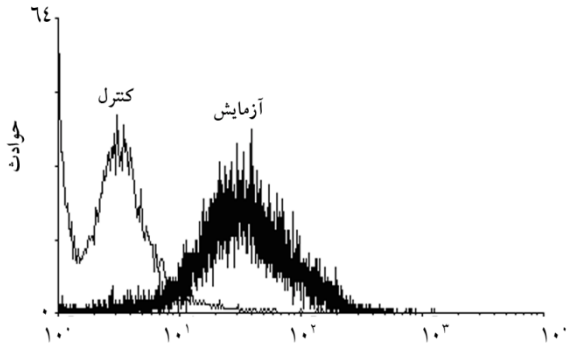
جداسازی با روش MACS

بعد از جداسازی با روش MACS دو نوع سلول جدا شد که در شکل ۲ نشان داده شده‌است. یکی سلول‌هایی که آنتی‌بادی به آن‌ها متصل نشده و بنابراین در میدان مغناطیسی منحرف نشد و در محلول معلق باقی ماند و نوع دوم سلول‌هایی که آنتی‌بادی به آن‌ها متصل شده و جدا شد.



شکل۲. چپ: سلول‌هایی که آنتی‌بادی به آن‌ها متصل نشده است؛راست: سلول‌هایی که آنتی‌بادی به آن‌ها متصل شده است و جدا شده‌اند (بار ۲۵ میکرومتر).
SSC: Spermatogonial stem cell, MB:Miro bead, SP: Spermatogonia

در این مرحله دو عامل بررسی شد. اول، میزان بقای سلول‌ها که بعد از سه تکرار ۰/۳۳SE±۹۵/۲۵ درصد بود و این میزان حیات از مرحله آنزیمی هم بالاتر بوده است. دوم، درصد خلوص سلول‌های جدا شده که توسط آنالیز فلوسایتومتری با آنتی‌بادی اولیه a۶ اینتگرین و آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با FITC (فلوئورو ایزو تیو سیانات) انجام شد و همان‌طور که در هیستوگرام شکل ۳ مشخص است به‌طور متوسط در سه تکرار ۲/۲۰±۹۳/۷۹ درصد سلول‌ها نشانگر مورد نظر را بیان کرد.



شکل۳. درصد خلوص سلول‌های جدا شده با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری

نتایج به‌دست آمده از انجماد و ذوب سلول‌ها

در این مرحله بقای سلول‌های منجمد شده در سه محیط انجمادی (در قسمت مواد و روش‌ها) بعد از گذشت ۱۵ روز بررسی شد. نتایج به‌دست آمده در جدول۱ آمده است. در این مطالعه تأثیر غلظت سرم بر سلول‌ها بررسی و فاکتورهای دیگر طبق مطالعات قبلی [۱٤و۱۵] بود و ثابت در نظر گرفته شد.

جدول ۱. سلول‌های جدا شده با روش MACS در سه گروه انجمادی، آزمون Tukey، تکرار در هر گروه = ۳

گروه‌ها	میانگین درصد حیات بعد از ذوب ± خطای استاندارد
گروه I (۵۰ درصد سرم)	۳۹/۰۹±۰/۱۵[a,b]
گروه II (٦۰ درصد سرم)	۸۵/۵۵±٦/۹۸
گروه III (۷۰ درصد سرم)	۹۰/۲۹±۱/۳۸

a: اختلاف معنی‌دار با گروه II، p= ۰/۰۰٤

b: اختلاف معنی‌دار با گروه III، p= ۰/۰۰۲

همان‌طوری که در جدول ۱ مشخص شده است بین گروه ۱و۲ و همچنین بین گروه ۱و۳ اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی بین دو گروه ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار نیست و این نشان می‌دهد که افزایش میزان سرم از ۵۰ به ٦۰ درصد تأثیر زیادی بر بقای سلول‌های اسپرماتوگونی بعد از انجماد و ذوب می‌گذارد ولی این افزایش تا ۷۰ درصد تأثیر چندانی بر بقای سلول‌ها بعد از انجماد ندارد.

بحث

در حال حاضر برای بیماران نابالغ سرطانی هیچ راه حلی برای حفظ باروری بعد از درمان سرطان وجود ندارد [۲۰و۲۱]. پیوند سلول‌های بنیادی بیضه‌ای (سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا) در آینده می‌تواند به‌عنوان یک روش برای از سرگیری باروری به بیماران نابالغی باشد که در اثر درمان، نابارور شده اند [۲۱].

تهیه سریع و کارآمد این سلول‌ها برای پیوند در حیوانات بالغ و نابالغ اساس آزمایش‌های In vitro برای پیوند این سلول‌هاست [۱۳]. تا به حال از روش‌های متفاوتی برای جداسازی این سلول‌ها استفاده شده است که در این بین بهترین روش MACS و FACS است. در مطالعه حاضر از روش MACS استفاده شد که هم خلوص بالایی بعد از جداسازی می‌دهد و هم روشی است که نیاز به تجهیزات پیچیده ندارد.

در مقایسه با کارهای مشابه انجام شده، مدت زمان قرارگیری بافت در آنزیم در این مطالعه کاهش داده شد (۹ دقیقه در مقابل ٦۰ دقیقه) [۱۹]. در این مطالعه دما به ۳۸ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و این افزایش دما شاید دلیلی بر هضم سریع‌تر بافت باشد. علاوه بر این در مرحله دوم آنزیمی از EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) استفاده شد؛ EDTA در بافت‌هایی که اینتگرین دارند با جمع‌آوری یون‌های دو ظرفیتی که اتصالات EDTA به آن‌ها وابسته است، عمل جداسازی را تسریع می‌کند و این عامل باعث شد تا در مرحله دوم آنزیمی هم سلول‌ها در مقایسه با کار قبلی، سریع‌تر جداسازی شوند [۱۹]. کاهش مدت زمان قرارگیری در معرض آنزیم باعث شد تا میزان حیات سلول‌ها در مقایسه با موارد قبلی بالا باشد (۹۱ درصد در مقابل ٦۰ و ۷۰ درصد) [۱۳و۲۲]. درصد حیات سلول‌ها بعد از جداسازی به روش MACS هم نسبت به کارهای مشابه بالا بود (۹۵ درصد در مقابل ٦۰ درصد) [۲۰] و میزان آن حتی بالاتر از درصد حیات

سلول‌ها بعد از مراحل آنزیمی بود. درصد خلوص هم نسبت به کارهای مشابه بالاتر بود (۹۳ درصد در مقابل ۷۰ تا ۹۰ درصد) [۱۲،۱۳و۲۲]. این دو نتیجه با هم بر این دلالت دارد که آنتی‌بادی استفاده شده به‌طور اختصاصی به سلول‌هایی که نشانگر را بیان کرده و زنده هستند، متصل می‌شود و اتصال به سلول‌های مرده کمتر صورت می‌گیرد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که روش کار برای جداسازی این سلول‌ها، روشی بهینه بوده است.

مسئله دیگر علاوه بر جداسازی با خلوص بالا، نگهداری سلول‌های اسپرماتوگونیا برای پیوند اتولوگ به بیمارانی است که به‌طور موفقیت‌آمیزی برای سرطان درمان می‌شوند. دو روش معمول برای نگهداری سلول‌ها شامل کشت و انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا پیشنهاد شده است. کشت کوتاه مدت و طولانی مدت این سلول‌ها در مطالعات زیادی گزارش شده است [٦و۲۳]. راه دوم انجماد این سلول‌ها است. سلول‌های اسپرماتوگونیا برخلاف اسپرم، سلول‌هایی هستند که کار با آن‌ها راحت‌تر است و همچنین یک روش مشابه و تجهیزات ارزان قیمت می‌تواند برای انجماد این سلول‌ها در گونه های متنوع شامل رت، موش، هامستر، پریمات‌ها و حتی انسان استفاده شود [۱۵]. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیای منجمد شده بعد از پیوند به موجود گیرنده می‌تواند اسپرماتوژنز را از سر گرفته و منجر به تولد شود [۱۵]. همچنین نشان داده شده که این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های دیگر بیضه به انجماد مقاوم تر هستند [۱۵]. در مطالعات گذشته از یک محلول تجاری که مورد استفاده انجماد بافت بیضه هم است، برای انجماد این سلول‌ها استفاده شده است [۱۵]. در مطالعه ایزدیار (Izadrar) و همکاران سعی شده است تا یک روش برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا در گاو ارایه شود. در این مطالعه ثابت شده است که محیط حاوی ماده محافظ انجمادی DMSO نسبت به گلیسرول باعث بقای بهتر سلول‌ها بعد از ذوب می‌شود. در این مطالعه و مطالعات دیگر از سرم FCS استفاده شده است [١٤و١٥]. براساس بررسی‌های انجام شده،FBS نسبت به FCS یا سرم اسب، در کشت اولیه سرم بقای بهتری را نشان می‌دهد [٢٤]. همچنین مشخص شده است که استفاده از سرم FBS در بقای سلول‌ها در انجماد تأثیر مثبت دارد [١٦و١٧]. از این‌رو در این مطالعه فاکتورهای دیگر ثابت درنظر گرفته شد و تأثیر میزان غلظت سرم FBS در محیط انجمادی بر بقای سلول‌های اسپرماتوگونیا بررسی شد. با توجه به داده‌های موجود میزان ٦٠ درصد و ٧٠ درصد سرم FBS در محیط انجمادی سلول‌های اسپرماتوگونیا میزان حیات بالایی را پس از ذوب باعث می‌شوند و از طرفی چون اختلاف معنی‌داری بین درصد حیات سلول‌ها با استفاده از سرم ٦٠ و ٧٠ درصد وجود ندارد بر این اساس، محیط انجمادی با ٦٠ درصد سرم FBS برای سلول‌های اسپرماتوگونیای موش نژاد NMRI به‌عنوان محیطی بهینه پیشنهاد می‌شود.

References

1. **Bleyer WA.** Epidemiologic impact of children with brain tumors. Childs Nerv Syst 1999; 15 (11-12): 758-63.
2. **Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S.** Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. Hum Reprod 2000; 15(10): 2154-9.
3. **Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT.** Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. Endocrinology 1994; 135(3): 1227-34.
4. **Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM.** Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. Apmis 2005; 113(11-12): 727-42.
5. **Oatley JM, Brinster RL.** Spermatogonial stem

cells. Method Enzymol 2006; 419: 259-82.

6. **Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ.** Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. Biol Reprod 2003; 68(6): 2207-14.
7. **Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M.** Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. Dev Biol 2005; 279(1): 114-24.
8. **Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL.** Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2004; 71(3): 722-31.
9. **Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL.** Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(47): 16489-94.
10. **Ryu BY, Orwig K, Kubota E.** Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. Dev Biol 2004; 274(1): 158-170.
11. **Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR.** Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(15): 8346-51.
12. **Von Schonfeldt V, Krishnamurthy H, Foppiani L, Schlatt S.** Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from Djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. Biol Reprod 1999;. 61(3): 582-9.
13. **Van der Wee KS, Johnson EW, Dirami G, Dym TM, Hofmann MC.** Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. J Androl 2000; 22(4) 696-704.
14. **Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K.** Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. J Androl 2002; 23(4): 537-45.
15. **Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T.** Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. Hum Reprod 2003; 18(12): 2660-7.
16. **Yang PF, Hua TC, Tsung HC, Cheng QK, Cao YL.** Effective Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells By Programmed Freezing: Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2005; 1(1): 482-5.
17. **Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, et al.** Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer: Hum Reprod 2005; 20(7): 1779-85.
18. **Sapsford CS.** Changes in the cells of the sex cord and the seminiferous tubules during development of the testis of the rat and mouse. Aust J Zool 1962; 10: 178–192.
19. **Anjamrooz SH, Movahedin M, Tiraihi T, Mowla SJ.** In vitro effects of epidermal growth factor, follicle stimulating hormone and testosterone on mous spermatogonial cell colony formation. Reprod Fertil Dev 2006; 18(6): 709-20
20. **Lass A, Akagbosu F, Brinsden P.** Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. Hum Reprod Update 2001;7(4): 370-7
21. **Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S.** Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. Hum Reprod Update 2006; 12(3): 275-82
22. **Geens M, Van de Velde H, De Block G, Goossens E, Van Steirteghem A,** Tournaye H The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. Hum Reprod 2007; 22(3): 733-42.
23. **Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K.** Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biol Reprod 2003; 69(2): 612-6.
24. **Freshney, R, Ian,** culture of animal cells: A manual of basic technique. 6th ed. New york wiley-liss Ind. 2005, pp 175-80