Short Communication

Isolation and Recognition of Spermatogenic Cell Lineages from Mouse Testis Tissue

Tahereh Modarresi, M.Sc.[1, 2], Kazem Parivar, Ph.D.[1], Homa Mohseni Kouchesfehani, Ph.D.[1], Marjan Sabbaghian, Ph.D.[2], Hamed Heidari-Vala, D.V.M.[3], Mohammad Reza Sadeghi, Ph.D.[4*]

1. Department of Biology, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran
2. Department of Andrology, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
3. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran
4. Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 19615-1177, Shahid Beheshti University, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran***
Email: sadeghi@avicenna.ac.ir

Received: 10/Apr/2010, Accepted: 21/Jul/2010

Abstract

The main objective of this study was to compare the quality and effectiveness of the sedimentation velocity at unit gravity (SVUG) method with the percoll density gradient centrifugation method in the separation of spermatogenic cells in order to introduce a simple and cost-effective method.

In this study, the testes from male mice (NMRI strain) were obtained and transferred to Ham's F10 medium. With the use of the mechanical and enzymatic digestion method, spermatogenic cells were isolated. Spermatogenic cell separation was undertaken with both the percoll gradient centrifugation and sedimentation velocity at unit gravity (SVUG) methods based on human serum albumin (HSA) gradients. Subsequently the May-Grunwald-Giemsa (MGG) staining method was used to identify isolated cells. The combined method possibly could isolate a purer fraction of spermatogenic cells. This method (SVUG and Percoll Gradients Centrifugation combination) has the potential to be used as a simple and effective method for the isolation of spermatogenic cells for diagnostic or research purposes.

Keywords: Spermatogenesis, Percoll, Density Gradient Centrifugation, Sedimentation Velocity, Cell Lineage

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 429-432

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی و شناسایی رده‌های سلولی اسپرماتوژنیک بافت بیضه موش

طاهره مدرسی .M.Sc[۱،۲]، کاظم پریور .Ph.D[۱]، هما محسنی کوچصفهانی .Ph.D[۱]، مرجان صباغیان .Ph.D[۲]، حامد حیدری‌والا .D.V.M[۳]، محمدرضا صادقی .Ph.D[۴*]

۱. دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده علوم تولیدمثل، جهاد دانشگاهی، گروه آندرولوژی، تهران، ایران
۳. پژوهشگاه ابن سینا جهاد دانشگاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی تولید مثل، تهران، ایران
۴. پژوهشگاه ابن‌سینا جهاد دانشگاهی، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۶۱۵، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشگاه ابن‌سینا جهاد دانشگاهی
پست الکترونیک: Email: sadeghi@avicenna.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۹/۱/۲۱، پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۳۰

چکیده

ارزیابی کیفیت و کارآمدی دو روش Sedimentation Velocity at Unit Gravity و سانتریفیوژ شیب غلظتی پرکل در جداسازی سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه هدف اصلی این مطالعه را تشکیل می‌دهد. طی این مطالعه تلاش شده است در نهایت یک مدل موفق با هزینه پایین، دسترسی بالا و خلوص به نسبت مطلوب پیشنهاد شود.

بافت بیضه موش‌های نژاد NMRI از بدن خارج و به محیط کشت Ham's F10 منتقل گردید. با کمک روش‌های جداسازی مکانیکی و هضم آنزیمی، سلول‌های بافت از یکدیگر جدا شدند. سپس جداسازی سلول‌های مخلوط با دو روش سانتریفیوژ شیب غلظتی پرکل (Percoll Gradients Centrifugation) در دو مرحله و (SVUG; Sedimentation Velocity at Unit Gravity) بر اساس شیب غلظتی آلبومین سرم انسانی (Human Serum Albumin; HSA) انجام گردید و در نهایت جهت شناسایی سلول‌های تفکیک شده از روش رنگ‌آمیزی (MGG; May-Grunwald-Giemsa) استفاده شد. با استفاده هم‌زمان این دو روش می‌توان جمعیت‌های با درجه خلوص بالای سلول‌های اسپرماتوژنیک را جهت انجام مطالعات مولکولی و سلولی، جداسازی کرد.

* **کلیدواژگان:** اسپرماتوژنز، پرکل، سانتریفیوژ شیب غلظتی، سرعت ته نشست، رده سلولی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۴۳۱-۴۲۹

امروزه آگاهی از مکانیسم پیچیده کنترل روند اسپرماتوژنز، مطالعه تغییرات آنتی ژنی سطح سلول، بررسی الگوی بیان ژن‌های مختلف، ارزیابی مولکولی روند اسپرماتوژنز، تعیین و شناسایی عوامل حیاتی در کنترل اسپرماتوژنز و سایر بررسی‌های سلولی - مولکولی مستلزم جداسازی و شناسایی سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه می‌باشد. اولین گزارش مربوط به جداسازی و شناسایی سلول‌های اسپرماتوژنیک در سال ۱۹۷۷ توسط بلف و همکارانش ارایه شد؛ آنها توانستند جمعیت‌های خالصی از این سلول‌ها را از بافت بیضه موش‌های نابالغ به دست آورند. آنها با روش‌های مکانیکی و هضم آنزیمی، سلول‌های بافت را از یکدیگر منفک و متعاقب آن با تکنیک Sedimentation Velocity at Unit Gravity (SVUG) جمعیت‌های خالص هر شش رده سلولی اسپرماتوژنیک را به طور موفقیت‌آمیز از بافت بیضه موش‌های Balb/c در سراسر دوره رشد و نمو جدا کردند (۱).

در این مطالعه، برای هر بار انجام جداسازی سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه ۶ سر موش نر نژاد NMRI (ایران، انستیتو پاستور) مورد استفاده قرار گرفت. در هر مرتبه از روش شیب‌های غلظتی پرکل دو بیضه یک موش و در مورد روش SVUG، در هر آزمایش از ۱۰ بیضه یعنی ۵ سر موش استفاده می‌شد. بدین‌صورت که ابتدا جانور به طریق جابه‌جایی مهره‌های گردن قطع نخاعی و روی صفحه‌ای ثابت شد سپس با کمک قیچی و پنس شکافی روی پوست و پرده صفاق ایجاد و بیضه‌ها به صورت استریل جدا و خارج گردید و در پلیت حاوی محیط کشت Ham's F10 (Sigma, USA) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جداسازی جمعیت‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه با روش مکانیکی آغاز شد. مخلوط سلولی حاصل جهت حذف قطعات بافتی، بقایای سلولی و سلول‌های خونی یک تا دو بار با قدرت ۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از روش مکانیکی از روش هضم آنزیمی استفاده شد (۱) که مراحل آن عبارتند از : ۱. تهیه محیط کشت Ham's F10 حاوی آنزیم کلاژناز نوع II (Sigma, USA) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲). ۲. انکوباسیون بافت بیضه در محلول آنزیمی در انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه. ۳. خرد کردن با سوزن‌های ظریف به منظور تسهیل جداسازی و حذف قطعات بافتی اضافی. ۴. شست‌وشو با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت Ham's F10 و سانتریفیوژ با قدرت ۲۰۰g، در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه. ۵. مخلوط نمودن رسوب حاصل در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت Ham's F10 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم تریپسین نوع III (Merck, Germany) و ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنزیم DNaseI (Roche, Germany). ۶. انکوباسیون در انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه. ۷. دو بار شست‌وشو با محیط کشت Ham's F10 و سانتریفیوژ با قدرت ۲۰۰g، در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه. ۸. مخلوط نمودن رسوب حاصل در محیط کشت Ham's F10. ۹. استحصال سوسپانسیون سلولی از سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه. ۱۰. ارزیابی قدرت حیات سلول‌ها با محلول رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو.

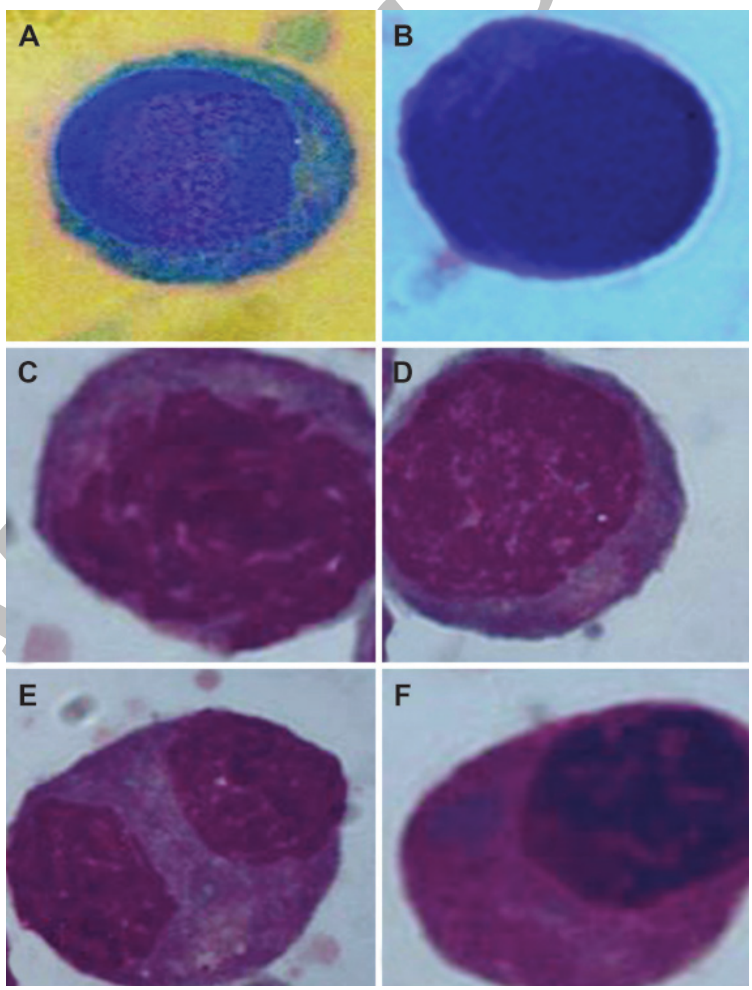
به منظور انجام روش گرادیان پرکل با افزودن ۲ میلی‌لیتر از رقت‌های ۲۰ و ۱۵ درصد پرکل (Pharmacia, Sweden)، به ترتیب از رقت بیشتر به کمتر، در یک لوله استریل ۱۴ میلی‌لیتری

Archive of SID
www.SID.ir

(Falcon, BD) ستونی ایجاد شد، سپس سوسپانسیون سلولی حاصل از هضم آنزیمی روی آن منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه با قدرت ۷۵۰g در دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ گردید. بعد از اتمام سانتریفیوژ دو لایه تشکیل شد که به آرامی با پیپت پاستورهای مجزا خارج شده و بعد از انتقال به لوله‌های مجزا، با قدرت ۲۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از مشاهده میکروسکوپی، لایه فاقد اسپرم خارج و روی ستون شیب‌های ۳۰، ۲۵ و ۲۰ درصد پرکل (به ترتیب ۲ میلی‌لیتر از هر رقت) منتقل شد و به مدت ۳۵ دقیقه با قدرت ۲۰۰g و در دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله لایه‌های تشکیل شده از سلول‌ها و نیز رسوب ته لوله خارج و به لوله‌های فالکون مجزا منتقل گردید سپس با افزودن محیط کشت به هر لوله به مدت ۵ دقیقه با قدرت ۲۰۰g سانتریفیوژ شدند. با افزودن محیط کشت به رسوب حاصل در هر لوله قدرت حیات سلول‌های هر لایه با محلول تریپان‌بلو ارزیابی شد و نتایج حاصل نشان داد که تفاوتی در درصد سلول‌های زنده قبل و بعد از استفاده پرکل وجود ندارد. در نهایت سلول‌های هریک از لایه‌ها به واسطه روش رنگ‌آمیزی (MGG; May-Grunwald-Giemsa) شناسایی شدند (۳، ۴). سلول‌های موجود در گسترش‌های سلولی با روش رنگ‌آمیزی MGG و به واسطه شکل، اندازه، قطر و موقعیت هسته، اندازه دم، وجود ساختارهای آکروزومی (در مورد سلول‌های هاپلوئید بافت بیضه) و خواص رنگ‌پذیری قابل تشخیص می‌باشند (شکل ۱).

بدین ترتیب، در بخش فوقانی گرادیان ۲۰ درصد باقی مانده‌های قطعات بافتی و سلول‌های مرده، در ناحیه بینابینی گرادیان‌های ۲۰ و ۲۵ درصد اسپرماتوگونی‌های نوع B با درجه خلوص ۴۵ درصد و اسپرماتیدهای کروی با درجه خلوص ۵۵ درصد، در ناحیه بینابین گرادیان‌های ۲۵ و ۳۰ درصد اسپرماتوگونی‌های نوع A با درجه خلوص ۴۰ درصد و اسپرماتوسیت‌های اولیه با درجه خلوص ۶۰ درصد و نهایتا در کف گرادیان ۳۰ درصد اسپرماتوسیت‌های دو هسته‌ای با درجه خلوص ۵۵ درصد و اسپرماتیدهای طویل شده با درجه خلوص ۴۵ درصد گزارش شدند.

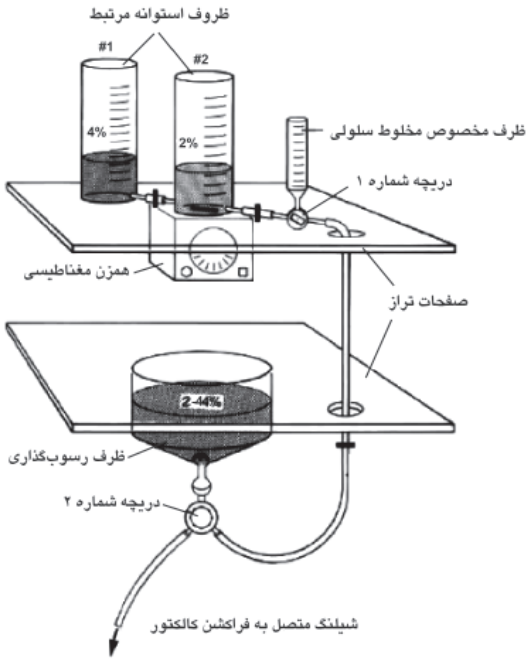
سیستم SVUG طراحی شده در این مطالعه شامل چهار ظرف شیشه‌ای مدرج، یک دستگاه هم‌زن مغناطیسی، شیلنگ‌های رابط و شیرهای کنترل است. این ظروف در دو صفحه مسطح مقاوم و در فاصله‌ای مناسب از هم ثابت شده‌اند. ظرف‌های مدرج شماره ۱ و ۲ که طبق قانون ظروف مرتبطه و به واسطه یک شیلنگ رابط مناسب به هم متصل می‌باشند، در واقع یک دستگاه گرادیان ساز را تشکیل می‌دهند.



شکل ۱: سلول‌های اسپرماتوژنیک حاصل از روش‌های پرکل و SVUG بعد از رنگ‌آمیزی MGG.
A. اسپرماتوگونی نوع A، B. اسپرماتوگونی نوع B، C. اسپرماتوسیت اولیه لپتوتن، D. اسپرماتوسیت اولیه پاکی تن، E. اسپرماتوسیت اولیه دو هسته‌ای در تقسیم میوز و F. اسپرماتید (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×).

www.SID.ir

در امتداد این دو ظرف، استوانه‌ای تعبیه شده است که مختص سوسپانسیون سلولی بوده و در ادامه ظرف رسوب‌گذاری سلولی قرار می‌گیرد. مخزن رسوب‌گذاری (Sedimentation Chamber) یک ظرف کوتاه با سطح مقطع زیاد است که انتهای آن مخروطی است و از طریق دریچه و شیلنگ رابط با ظرف سوسپانسیون سلولی مرتبط است (۲) (شکل ۲).



شکل ۲: نمایی از سیستم Sedimentation Velocity at Unit Gravity

ایجاد شیب غلظت آلبومین توسط دستگاه گرادیان ساز و ورود آن به استوانه رسوب‌گذاری توسط پمپ پریستالتیک و یا اختلاف سطح ظروف استوانه‌ای و نیروی جاذبه کنترل می‌شود. در نهایت شیلنگ دیگر ظرف رسوب‌گذاری را به دستگاه جمع‌کننده (Fraction Collector) متصل می‌سازد. از آنجایی که هدف تولید شیب افزاینده غلظت بوده، ضمن انسداد ارتباط دو ظرف، در استوانه اولی حجم معینی از غلظت بیشتر آلبومین سرم انسانی (Human Serum Albumin; HSA) (۴ درصد) و در استوانه دوم متصل به خروجی همان حجم از غلظت کمتر HSA (۲ درصد) اضافه شد. سپس محلول ۰/۵درصد HSA در ظرف سوسپانسیون سلولی (Cell Loading Chamber) اضافه شده و سوسپانسیون سلولی بر آن افزوده شد. در شروع با تنظیم دریچه‌ها، محلول موجود از ظرف سوسپانسیون سلولی به ظرف رسوب‌گذاری جریان پیدا کرد، به گونه‌ای که سوسپانسیون سلولی از طریق دریچه ورودی از کف مخروطی وارد ظرف شد. برای تشکیل شیب مورد نظر، ابتدا محلول ۲ درصد HSA به سمت مخزن رسوب‌گذاری هدایت شد. سپس با تخلیه این محلول و طبق قانون ظروف مرتبطه، محلول ۴ درصد HSA از استوانه اول به استوانه شماره ۲ راه پیدا کرد. در این وضعیت، مگنتی داخل این استوانه وجود دارد که با مخلوط کردن آن به تدریج و با خروج محلول، غلظت افزایش می‌یابد تا در نهایت به غلظت ۴ درصد در زمان تخلیه کامل استوانه‌ها برسد. در آخرین مرحله در حالی که بقیه مسیرها مسدود بودند، مسیر جریان ظرف رسوب‌گذاری تا دستگاه جمع‌کننده برقرار گردید تا سلول‌ها همراه با لایه گرادیانی خود، از این دریچه خارج شوند. در این مطالعه سرعت تعویض لوله‌های دستگاه طوری تنظیم شد که در نهایت حدود ۲۰۰ قطره (۱۰ میلی‌لیتر) محلول در هر لوله تخلیه شود؛ به گونه‌ای که کل حجم (۸۰۰ میلی‌لیتر) ظرف رسوب‌گذاری طی ۴ ساعت در لوله‌ها تقسیم شد. به منظور آماده‌سازی و مشاهده سلول‌های هر لوله و بررسی بیشتر در مراحل بعدی، لوله‌ها سانتریفیوژ شدند. سپس بر رسوب حاصل در هر لوله محیط کشت Ham's F10 افزوده شد و پس از رنگ‌آمیزی به روش MGG، لام‌های رنگ شده در مجاورت هوای آزاد خشک شده و با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰۰× و ۱۰۰۰× تحت مطالعه قرار گرفتند. در نهایت با شمارش سلولی به کمک سل کانتر درجه خلوص سلول‌های هر لایه ارزیابی شد. در مجموع ۸۵ لوله حاوی سلول‌های جداسازی شده به دست آمد. در لوله‌های ۱ تا ۳۰ سلولی دیده نشد، در لوله‌های ۳۵-۳۰ اسپرماتوسیت‌های اولیه پاکی تن با درجه خلوص ۷۵ درصد، در لوله‌های ۴۵-۴۰ اسپرماتوگونی‌های نوع A با درجه خلوص ۷۰ درصد، در لوله‌های ۵۵-۵۰ اسپرماتوسیت‌های لپتوتن با درجه خلوص ۶۵ درصد، در لوله‌های ۶۵-۶۰ اسپرماتوگونی‌های نوع B با درجه خلوص ۷۰ درصد، در لوله‌های ۷۵-۷۰ اسپرماتیدها با درجه خلوص ۶۰ درصد و در لوله‌های ۸۵-۸۰ اجسام باقی‌مانده یا سیتوپلاست‌ها با درجه خلوص ۸۵ درصد مشاهده شدند. برخلاف اینکه این روش سلول‌های اسپرماتوژنیک را از هم‌دیگر بهتر از روش پرکل، تفکیک می‌نماید ولی درصد آلودگی سلول‌ها با آلاینده‌هایی نظیر اجسام باقی‌مانده و اسپرم‌ها بیشتر است به طوری که پیشنهاد می‌شود طی یک روش تلفیقی بعد از هضم آنزیمی بافت بیضه، ابتدا روش SVUG به کار برده شود و سپس به منظور حذف آلاینده‌ها و افزایش میزان خلوص سلول‌ها از روش پرکل استفاده شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان، مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا که حمایت مالی این تحقیق را بر عهده داشتند، ابراز می‌دارند.

References

1. Bellve AR, Millette CF, Bhatnagar YM, O'brien DA. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. J Histochem Cytochem. 1977; 25: 480-494.
2. La Salle S, Sun F, Handel MA. Isolation and short-term culture of mouse spermatocytes for analysis of meiosis. In: Keeney S (ed). Meiosis, Cytological Methods. Vol 2. New York: Humana Press; 2009; 279-297.
3. Amer M, Abd Elnasser T, Elhaggar S, Mostafa T, Abdel-Malak G, Zohdy W. May-Grunwald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. Hum Reprod. 2001; 16: 1427-1432.
4. Gandini L, Lenzi A, Lombardo F, Pacifici R, Dondero F. Immature germ cell separation using a modified discontinuous Percoll gradient technique in human semen. Hum Reprod. 1999; 14: 1022-1027.

Archive of

www.SID.ir