Review Article

Following In Vitro Spermatogenesis with Long-term Preserved Spermatogonial Stem Cells

Mahdi Mohaqiq[1], Mansoureh Movahedin[2*], Zohreh Mazaheri[3], Naser Amir Janati[4]

1- PhD Candidate, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Associated Professor, Department of Andrologia and Embryology, Avicenna Research Institute, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: movahed.m@modares.ac.ir

Received: 11/Jul/2016, Accepted: 29/Nov/2016

Abstract

Spermatogonial stem cells are foundation of the male reproductive system. These cells are the only conduit capable of transferring genetic traits from one generation to the next. Isolation and long-term preservation of spermatogonial stem cells for use in inducing spermatogenesis is one technique to preserve fertility in male patients who need chemotherapy. In vitro spermatogenesis is an alternative to achieve this goal. The use of an optimal model of human spermatogenesis is a major step in understanding the physiology and genetic pathways in the male reproductive system. In vitro spermatogenesis is crucial to reducing a complex process into smaller parts for experimentation, manipulation, and deriving cellular and molecular level knowledge. Is it possible to manipulate the paracrine environment and separately evaluate the effects of growth factors. Different in vitro culture systems are used to explore alternatives to spermatogenesis and obtain mature, functional spermatozoa for ultimate use in infertility treatment. In order to present a useful and practical method, this study provides an overview of different methods for the long-term preservation of spermatogonial stem cells and in vitro culture systems used in spermatogenesis.

Keywords: Spermatogenesis, Spermatogonial stem cells, In vitro, Long-term preservation

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.3, Pages: 1-15

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

مقاله مروری

پی‌گیری فرآیند اسپرم‌زایی در شرایط آزمایشگاهی پس از حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

مهدی محقق[1]، منصوره موحدین[2*]، زهره مظاهری[3]، ناصر امیرجنتی[4]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشیار، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح
Email: movahed.m@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۰۴/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۹

چکیده

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اساس و پایه سیستم تولید مثل مذکر را تشکیل می‌دهند و تنها سلول‌های بنیادی‌اند که قادر به انتقال صفات ژنتیکی از نسلی به نسل بعد هستند. یکی از راه‌های حفظ باروری در افراد مذکر که نیاز به درمان‌های شیمی درمانی دارند، جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و حفظ طولانی مدت آن است تا برای از سرگیری اسپرم‌زایی استفاده شوند. پیشبرد اسپرم‌زایی در شرایط آزمایشگاهی یکی از راه‌های دست‌یابی به این هدف است. اسپرم‌زایی آزمایشگاهی برای کوتاه کردن یک روند پیچیده به قسمت‌های کوچک‌تر به‌منظور آزمایش‌ها، دستکاری‌ها و فهم آن در سطح سلولی و مولکولی ضروری است و اجازهٔ دستکاری محیط پاراکرین و همچنین بررسی تأثیر نقش هر یک عوامل رشد به‌صورت جداگانه در روند اسپرم‌زایی را می‌دهد. سیستم‌های مختلف کشت در شرایط آزمایشگاهی به‌منظور معرفی جایگزین مناسب برای پیشبرد اسپرم‌زایی و در نهایت رسیدن به اسپرماتوزوای بالغ و عملکردی برای استفاده در روش‌های درمان ناباروری است. در این مقاله سعی شده است روش‌های مختلف حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و سیستم‌های کشت در آزمایشگاه به‌منظور پیشبرد فرآیند اسپرم‌زایی را بررسی شود و یک جمع‌بندی مفید و کاربردی برای استفاده در بالین ارایه شود.

کلیدواژگان: اسپرم‌زایی، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، حفظ طولانی مدت

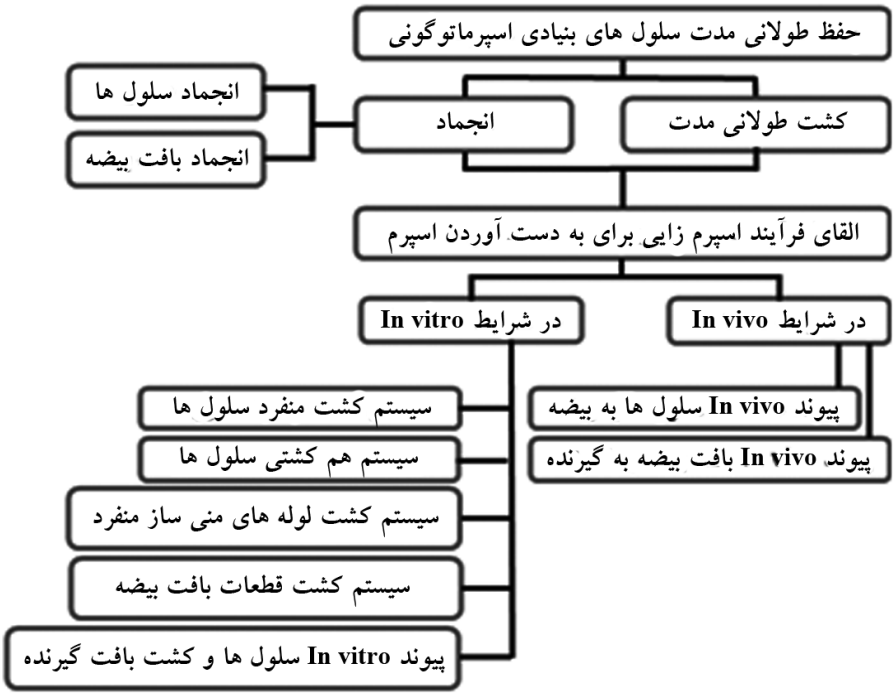
پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحات: ۱-۱۵

مقدمه

ناباروری مردان یک مشکل جهانی است و تا ۵۰ درصد از موارد ناباروری را شامل می‌شود [۱]. مطالعات نشان داده است یکی از دلایل اصلی ناباروری مردان می‌تواند شکست در فرآیند اسپرم‌زایی باشد، مانند موارد اولیگواسپرمی (Oligospermia) و آزواسپرمی (Azoospermia). در این موارد، توقف در هر یک از مراحل اسپرم‌زایی منجر به کاهش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

تعداد اسپرم‌های تولید شده می‌شود. نوسازی فرآیند اسپرم زایی انسانی خارج از شرایط بدن یک کنجکاوی علمی در علم آندرولوژی و یک نیاز در درمان ناباروری مردان است. استفاده از یک مدل بهینه اسپرم‌زایی انسانی گام بزرگی در درک فیزیولوژی و مسیرهای ژنتیکی در سیستم تولید مثل مذکر بوده است و مطالعات مدل‌های حیوانی، درک روند تکوین گنادها، اسپرم زایی و استرویدسازی را بر اساس بررسی‌های بافت‌شناسی، ایمنوهیستوشیمی، ارزیابی‌های هورمونی و تغییرات فنوتیپ ژن‌ها فراهم کرده است [۲]. به‌منظور پیگیری اسپرم زایی در شرایط آزمایشگاهی برای بیماران آزواسپرمی طی سال‌های گذشته تلاش‌های گسترده‌ای شده است ولی به‌دلیل محدودیت‌های سیستم کشت، این مسئله به‌صورت کامل نگرانی‌ها را رفع نکرده است. این موضوع بیشتر در بیماران جوان که با درمان‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی مواجه هستند، مورد نظر است. برای این بیماران روش‌های مختلفی برای حفظ باروری می‌توان در نظر گرفت. جداسازی و حفظ طولانی مدت قطعات بافت بیضه یا سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی این افراد برای استفاده متعاقب در پیوند با روش‌های مختلف به‌منظور استحصال اسپرم عملکردی، یکی از این روش‌ها است (شکل ۱).



شکل ۱ نمودار شماتیک از روند استحصال اسپرم برای حفظ باروری افراد با استفاده از سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بلند مدت حفظ شده

حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به‌عنوان تنها سلول‌هایی که توانایی انتقال صفات ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر را دارا هستند، بسیار اهمیت دارند. حفظ و استفاده دوبارهٔ این سلول‌ها مخصوصاً برای افرادی که دچار سرطان هستند و تحت درمان با داروهای شیمی درمانی یا پرتودرمانی قرار می‌گیرند، بسیار با ارزش و مهم است. به همین منظور دو راه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

کشت طولانی مدت و انجماد این سلول‌ها پیشنهاد می‌شود.

کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

سلول های بنیادی اسپرماتوگونی برای نگهداری به‌صورت بلند مدت نیازمند سلول‌های تغذیه‌کننده برای هم کشتی و همچنین عوامل رشدی است که از تمایز این سلول‌ها به رده‌های بعدی سلول‌های زایا جلوگیری کنند و به همین منظور محققان در گونه‌های مختلف این مسئله را بررسی کردند. ناگانو (Nagano) و همکارانش نشان دادند که سلول‌های زایا برای ٤ ماه در محیط حاوی سرم روی یک لایه تغذیه‌کننده از سلول‌های STO (Mouse embryonic fibroblast cell line) زنده ماندند [٣، ٤]. جیونگ (Jeong) و همکارانش نیز در سال ٢٠٠٣ نشان دادند که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌توانند برای ٤ الی ١٢ هفته کشت داده شوند [٥]. کوبوتا (Kubota]) و همکاران در سال ٢٠٠٤ برای کشت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از سلول‌های تغذیه‌کننده STO و بدون سرم و حاوی bFGF (Basic fibroblast growth factor)، GFRα-1 (GDNF family receptor alpha-1) و GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor) استفاده کردند و نشان دادند که سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تحت این شرایط برای ٦ ماه حفظ می‌شوند و اسپرم‌زایی طبیعی را در بدن گیرنده مدل حیوانی نابارور بعد از پیوند، آغاز می‌کنند [٦]. طی ١٠ سال گذشته همه مطالعاتی که نگهداری سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را در محیط آزمایشگاه گزارش کرده‌اند در یک موضوع مشترک بوده‌اند و آن هم، هم کشتی سلول‌های اسپرماتوگونی با یک لایه سلول تغذیه کننده است [٦، ٧].

انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

طی دهه های اخیر، مطالعات زیادی روی انواع و شرایط مختلف انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی توسط محققین مختلف انجام شده است و در نهایت ایزدیار و همکاران در سال ٢٠٠٢ با بررسی روش‌های مختلف انجماد و ضدیخ ها، روش کارآمدتری را برای انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی ارایه دادند. آن ها نشان دادند که انجماد در محیط کشت حاوی ١٠ درصد FCS (Fetal calf serum)، ١٠ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide) و ٠/٠٧ مول ساکاروز با استفاده از روش انجماد کنترل نشده، ساده‌ترین و بهترین راه برای حفظ و نگهداری اسپرماتوگونی A است که بعد از ذوب، ٧٠ درصد سلول‌ها زنده می‌مانند و در محیط کشت تکثیر می‌کنند. همچنین این سلول‌ها عملکرد خود را حفظ نمودند و توانستند بعد از پیوند در بیضه موش گیرنده کلونی ایجاد نمایند [٨]. در مطالعه‌ای که توسط میرزاپور وهمکارانش در سال ٢٠١٣ انجام گرفت، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انسانی به‌دست آمده از بیماران آزوسپرمی، با استفاده از ضد یخ DMSO با روش انجماد آهسته منجمد و ذوب شدند و تحت شرایط هم کشتی با سلول‌های سرتولی تازه قرار گرفتند و سلول‌ها توانایی بالایی برای تشکیل کلونی نشان دادند [٩].

انجماد بافت بیضه حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

به‌منظور حفظ ذخیرهٔ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، علاوه بر انجماد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی انتخاب دیگر، انجماد بافت بیضه حاوی این سلول‌ها است. انجماد موفق بافت بیضه به انتخاب ضد یخ و تراکم آن و نوع روش انجماد و ذوب بستگی دارد. در مطالعه‌ای که از روش انجماد آهسته برای انجماد بافت بیضه انسانی نابالغ استفاده شده بود، DMSO به‌عنوان بهترین ضد یخ بین دیگر ضدیخ‌ها شامل اتیلن گلایکل (Ethylene glycol)، پروپانديول (Propanediol) و گلیسرول گزارش شد [١٠]. این

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

گزارش‌ها به‌همراه نتایج قبلی، ارجحیت DMSO به‌عنوان ضد یخ مناسب برای انجماد بافت بیضه را مشخص می‌کند. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که DMSO به اضافه ساکروز به‌عنوان یک انتخاب مناسب برای انجماد بافت بیضه انسانی به هر دو روش انجماد آهستهٔ کنترل شده و کنترل نشده است [۱۱]. انجماد بافت بیضه در گونه‌های مختلف بررسی شده است و درجات مختلفی از زنده مانی، تکثیر و تمایز سلول‌های زایا بعد از ذوب کردن بافت بیضه را گزارش کرده‌اند، در گزارشی در همین راستا، بیضهٔ موش منجمد و ذوب شده بعد از پیوند آلوگرافت (Allograft) در نهایت منجر به تولید اسپرماتوزوا (Spermatozoa) شد [۱۲-۱٤]. همچنین پیوند بافت بیضه میمون به‌صورت تازه و منجمد و ذوب شده، بقا و تمایز خوبی را تا مرحله اسپرماتوسیت نشان داد. بافت بیضه میمون منجمد ذوب شده به پوست موش پیوند زده شد و به‌صورت زنده باقی ماند و در نهایتا منجر به اسپرم‌زایی شد [۱۵]. در مطالعه‌ای دیگر؛ مشخصات ساختاری بافت بیضه انسانی بعد از انجماد به‌صورت برنامه‌ریزی شده، حفظ شد ولی هیچ گزارشی در مورد کیفیت و توانایی آن برای اسپرم‌زایی گزارش نشده است [۱٦، ۱۷]. وینز (Wyns) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بقا و یک سری فعالیت‌های تکثیری در سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی تا ۲۱ روز بعد از انجماد و ذوب بافت بیضه انسانی و پیوند زنوگرافت (Xenograft) آن را گزارش کردند [۱۸]. ژنگ (Zeng) به‌همراه هنرآموز و دیگر همکارانشان در سال ۲۰۰۹ روش‌های سرد کردن (Cooling)، انجماد آهسته و انجماد شیشه‌ای بافت بیضه خوک را با هم مقایسه و اعلام کردند که هیچ اختلاف معنی‌داری بین میزان بقای سلول‌ها در سه روش انجمادی وجود ندارد. پروتکل انجماد آهستهٔ آن‌ها منجر به بقا و از سرگیری اسپرم‌زایی بعد از پیوند زنوگرافت شد. همچنین آن‌ها گزارش کردند که دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برای ٤۸ ساعت به روش سرد کردن به بقا، زنده مانی بافت بیضه و توانایی تکوین بعد از پیوند به موش گیرنده صدمه‌ای نمی‌زند. بنابراین بافت بیضه می‌تواند برای ۲ روز بدون از دست دادن توانایی اسپرم‌زایی، ذخیره یا پیوند زده شود [۱۹].

القای فرآیند اسپرم‌زایی بعد از حفظ طولانی مدت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

القا و از سرگیری فرآیند اسپرم‌زایی با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حفظ شده به‌مدت طولانی، به‌منظور تولید اسپرم بالغ و کاربردی، از اهداف بلند مرتبه پزشکی تولید مثل، فناوری غنی‌سازی و پردازش سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. یکی از راه‌های نیل به سمت این هدف، فرآیند پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. فناوری پیوند سلول‌های زایا، دیدگاه‌های جدیدی را در مطالعه محیط زندگی سلول‌های بنیادی و ارزیابی عملکردی آن‌ها برای مشخصه‌های واقعی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گشود [۸]. این روش در مواردی مثل مطالعه روند اسپرم‌زایی و کنش و واکنش بین سلولی در بیضه‌ها، تولید حیوانات اهلی بزرگ تراریخت (Transgenic)، پیشگیری از ناباروری‌های جنس‌های مذکر مبتلا به سرطان به‌دلیل شیمی‌درمانی یا اشعه‌درمانی، حفظ ردهٔ سلولی زایا در حیوانات با ارزش در حال انقراض اهمیت دارد [۲۰]. القای فرآیند اسپرم‌زایی با سلول‌های طولانی مدت حفظ شده در دو حالت in vivo و in vitro امکان‌پذیر است.

پیوند in vivo سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به بیضه

در نگاه اول شانس موفقیت روش پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بسیار کم است. به‌نظر می‌رسید که تزریق سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به بیضهٔ گیرنده احتمالاً باعث القای واکنش ایمنی یا حداقل بیرون رانده شدن آن‌ها از لوله‌ها به شبکه بیضه و اپی‌دیدیم (Epididymis) می‌شود

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[۲۱]. در سال ۱۹۹٤ پیشگامان پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی برای اولین بار در آزمایشگاه برینستر و همکارانش در کشور آمریکا این روش را با انتشار دو مقاله ارایه کردند. برینستر (Brinster) و زیمرمن (Zimmerman) در سال ۱۹۹٤ نشان دادند که تزریق سوپ سلولی از بیضه موش به لوله‌های منی‌ساز موش نابارور ژنتیکی منجر به اسپرم‌زایی در موش گیرنده می‌شود [۲۱]. پس از آن برینستر و اوربوک (Avarbock) در سال ۱۹۹٤ نشان دادند که موش نر گیرنده که با سلول‌های حامل ژن LacZ پیوند زده شد، بارور شد و گیرنده ژن LacZ در نسل‌های بعدی نیز مشاهده شد. آن‌ها همچنین سلول‌های بنیادی کلون شده را در بیضه‌های موش گیرنده نشان دادند و شروع اسپرم‌زایی و تولید اسپرم طبیعی با قابلیت باروری را مشاهده کردند [۲۲]. پس از آن مطالعات فراوانی به‌صورت موفقیت‌آمیز در این زمینه انجام شد. از آن جمله می‌توان به نتایج مربوط به مطالعات هنرآموز و همکاران در سال ۲۰۰۲، ژانگ (Zhang) و همکارنش در سال ۲۰۰۳، ایزدیار و همکارانش در سال ۲۰۰۳ و دیگر محققین اشاره کرد که فرآیند پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را به‌صورت موفقیت‌آمیز انجام و نتایج خود را منتشر کردند [۲۳-۲۵].

پیوند in vivo قطعات بافتی بیضه حاوی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

روش دیگر برای القای فرآیند اسپرم‌زایی با روش in vivo پیوند قطعات بافت بیضه به‌صورت کامل به گیرنده است. در این صورت محیط پاراکرین (Paracrine) سلول‌های بنیادی اسپرم‌زایی حفظ می‌شود. پیوند بافت بیضه نابالغ در قطعات کوچک به موش گیرنده در شروع اسپرم‌زایی مؤثر گزارش شده است [۲٦]. قطعات بافت بیضهٔ موش، خرگوش، گوسفند و قورباغه نابالغ به‌طور شگفت‌انگیزی بعد از پیوند به زیر پوست ناحیه کمری میزبان، زنده ماندند و با شروع فرآیند اسپرم‌زایی منجر به تولید اسپرم شدند. بعضی از آن‌ها این توانایی را داشتند که با روش‌های کمک باروری مثل ریزتزریقی (Microinjection) باعث بارور کردن تخمک شوند [۲۷، ۲۸]. اسکات (Schlatt) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که پیوند بافت بیضه از میمون‌های رزوس (Rhesus) نابالغ ۱۳ ماهه به موش میزبان باعث تسریع در بلوغ بیضه‌ای و تولید اسپرم بالغ عملکردی شد. میمون‌های زروس در حالت طبیعی فرآیند اسپرم‌زایی خود را در سن ۳ تا ٤ سالگی آغاز می‌کنند اما بیضه‌های پیوندی در این پژوهش در ۷ ماهگی شروع به تولید اسپرم کردند [۲۹]. هنرآموز و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای قطعات بافت بیضه از بیماران ۳۲ تا ٤۰ ساله با آزواسپرمی انسدادی و غیر انسدادی و سرطان بیضه را به موش دچار تضعیف سیستم ایمنی پیوند زدند. سپس مشاهده شد که اکثر سمی‌نفروس توبول‌ها (Seminiferous tubules) بعد از یک هفته دچار تغییرات هیالینی شد و سلول‌های زایا بعد از ۱٤روز ناپدید شدند [۳۰]. او در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰٤ از قطعات بافت بیضه بیمارانی که تحت عمل وازکتومی (Vasectomy) قرار گرفتند، استفاده کرد و ۷٤ قطعه بافت بیضه مورد نظر را به کمر موش دچار تضعیف سیستم ایمنی شده پیوند زد. همه پیوندها تغییرات شدید اسکلروتیک (Sclerotic) را نشان داد و سلول‌های زایا در اکثر موارد ناپدید شد. فقط ۱٦ قطعه دارای بعضی از رده‌های سلول‌های اسپرماتوگونی بودند [۳۱]. از طرف دیگر؛ مطالعه‌ای توسط اسکات و همکارانش در سال ۲۰۰٦ گزارش داده است که پیوند زنوگرافت بافت بیضه از یک انسان نوزاد دهنده به مدل موشی منجر به تسریع بلوغ بیضه‌ای در بافت پیوندی شده است [۳۲]. با مطالعه نتایج تحقیقات می‌توان دریافت که پیوند بافت بیضه می‌تواند به‌عنوان یک روش برای استحصال اسپرم از بافت بیضه نابالغ باشد؛ اما مؤثر بودن آن پایدار نیست و ممکن است موفقیت‌آمیز نباشد. در موارد بافت بالغ، به‌نظر می‌آید روش پیوند نمی‌تواند منجر به حفظ اسپرم‌زایی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

شود و به سمت تحلیل رفتن بافت پیوندی پیش می‌رود.

القای فرآیند اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه (in vitro)

پیگیری فرآیند اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه به‌دلیل کوتاه کردن یک روند پیچیده به قسمت‌های کوچک‌تر به‌منظور آزمایش‌ها، دستکاری‌ها و فهم آن در سطح سلولی و مولکولی می‌تواند دارای اهمیت باشد. سیستم‌های کشت آزمایشگاهی حداقل، فرصت دستکاری محیط پاراکرین و همچنین بررسی تأثیر نقش هر یک عوامل رشد به‌صورت جداگانه در روند اسپرم‌زایی را فراهم می‌کند. یک سیستم مطمئن برای تولید اسپرم هاپلویید می‌تواند از نظر علمی و اخلاق پزشکی برای محققان مفید باشد. تولید حیوانات تراریخت مشکل است و نیازمند انتقال ژن موفق هر دو والد و سپس بیان ژن در فرزند است. این موضوع پر هزینه، زمان بر، محدود به تنها چند گونه خاص است و نیازمند قربانی کردن تعداد زیادی از حیوانات برای تضمین موفقیت است.

در نهایت یک سیستم اسپرم‌زایی در شرایط آزمایشگاهی به‌منظور لقاح آزمایشگاهی (In Vitro Fertilization) برای بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی مثل اختلال سلول‌های سرتولی و اختلالات دارای توقف اسپرم‌زایی می‌تواند مفید باشد. در کل لقاح آزمایشگاهی اختلالات انسدادی باروری را با حذف مانع فیزیکی برای بارداری، درمان می‌کند اما در بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی، خیلی از سلول‌های زایای غایب، در حال تکوین یا غیر طبیعی هستند و از این رو برای لقاح آزمایشگاهی نامناسب هستند. انتقال سلول‌های زایا از ریز محیط آسیب‌دیده داخل بدن به محیط کشت‌های تحت کنترل می‌تواند باعث بهبود شرایط بلوغ سلول‌های زایا و تولید اسپرماتوزوآ زنده و مناسب برای روش‌های کمک باروری شود [۳۳]. بنابراین یک نیاز متعاقب برای سیستم اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه وجود دارد. تلاش‌ها برای رفع این نیاز باعث استفاده از روش‌های مختلف شده است که این روش‌ها از کشت منفرد سلول‌های زایا تا توبول‌ها و کشت بافت متنوع است.

سیستم کشت منفرد

سیستم‌های کشت منفرد سلول‌های زایا یک روش ایده‌آل برای فهم بیان ژن و نقش عوامل بیضه‌ای در تمایز است. ساده‌ترین کشت‌ها فاقد هورمون‌ها و مکمل‌های عامل رشد هستند و به‌صورت اجتناب ناپذیری باید کوتاه مدت باشند و بعد از گذشت ۲٤ ساعت نصف سلول‌ها حیات خود را از دست می‌دهند [۳٤]. بعضی از کشت‌ها برای بررسی سریع علایمی از تمایز [۳۵] یا تناسب سلول برای لقاح آزمایشگاهی [۳٦] استفاده می‌شوند. کشت‌های بلند مدت‌تر (هفته‌ها یا ماه‌ها) پیگیری سعی و خطاها با محیط کشت [۳۸] مثل غلظت‌های مختلف SCF (Stem cell factor) و اضافه کردن عوامل رشد را ممکن ساختند [۳۷-۳۹]. ارتباط مستقیم سلول به سلول بین سلول‌های زایا و سلول‌های تغذیه‌کننده هم می‌تواند برای اسپرم‌زایی طبیعی مهم باشد که در سیستم کشت منفرد این مهم وجود ندارد. میزان زنده مانی و تکثیر سلول‌ها در سیستم کشت منفرد در مقایسه با سیستم هم کشتی سلول‌های زایا و تغذیه‌کننده، به‌صورت معنی‌داری کمتر بود [٤۰، ٤۱]. نتایج یک مطالعه نشان داد زمان دو برابر شدن در کشت منفرد سلول‌های بنیادی زایا تا ۱۱۲ ساعت افزایش یافت در حالی که در سیستم هم کشتی با سلول‌های تغذیه‌کننده فیبروبلاست جنینی این زمان به ٦۵ ساعت رسید [٤۲].

سیستم هم کشتی

در حالی که سیستم کشت منفرد مطالعهٔ عوامل رشد را به‌صورت جداگانه تسهیل کرد، هم کشتی سلول‌های سرتولی و زایا برای بررسی تأثیرات پاراکرین مثل نقش تستوسترون (Testosterone) یا دی‌هایدرو تستوسترون (Dihydrotestosterone)، مفید است که در آن سلول‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

سرتولی به‌عنوان عامل نگهدارندهٔ سلول‌های زایا عمل می‌کنند [۴۳، ٤٤]. انتخاب سلول‌های تغذیه‌کنندهٔ بهینه، به نتیجهٔ مورد نظر طراحی شده و همهٔ مزایا و معایب مخصوص آن وابسته است. ناگانو و همکاران ظرفیت کلونی‌زایی سلول‌های زایای کشت داده شده با سلول‌های تغذیه‌کننده مختلف را مقایسه کردند و عملکرد ضعیف in vitro سلول‌های سرتولی مشتق شده از لاین را در مقایسه با دیگر تغذیه‌کننده‌ها در امر کلونی‌زایی را به‌عنوان نتیجه گزارش کردند. این سلول‌ها، سلول‌های زایا را به تمایز بیشتر از تکثیر تشویق کردند و علاوه بر این باعث رشد کند کلونی‌ها شدند. این نتایج نشان داد سلول‌های سرتولی برای تمایز سلول‌های زایا به رده‌های بالاتر برای سیستم هم کشتی بهتر هستند [٤٥]. سلول‌های Vero مزایای زیادی دارند اما به‌صورت بهینه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند، در حالی که اسپرم‌زایی به‌صورت بهینه در دمای کیسه بیضه یعنی ۳۲ تا ۳٤ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. سلول‌های سرتولی برای مطالعاتی که نیازمند بهترین سیستم نمایندهٔ شرایط داخل بدن هستند، در اولویت قرار دارند. اگر سلول‌های بعد میوزی برای استفاده‌های متعاقب به‌منظور لقاح مد نظر باشد، این سؤال مطرح می‌شود که انتخاب کدام یک از سلول‌های تغذیه‌کننده می‌تواند از نظر اپی ژنتیکی سلامت فرزندان را تحت تأثیر قرار دهد. یک مطالعه اخیر، پیشنهاد داد که سلول‌های سرتولی جنینی خوکی که به‌صورت بالقوه با مقدار بالا در دسترس هستند، ممکن است برای بهبود تکوین اسپرماتید انسانی مناسب باشد [٤٦].

کشت لوله‌های منی‌ساز (Seminiferous Tubule) منفرد

کشت بیضه خارج شده می‌تواند در اندازه قطعات کوچک توبولار [۷، ٤۷-۵۰] تا برشی از یک بیضه کامل [۵۱-۵۳] که شامل بافت بینابینی است متفاوت باشد. دلیل این که چرا این روش متداول‌تر است این است که خیلی از مشکلات کشت منفرد و هم کشتی را ندارد. در ابتدا محیط پاراکرین بیضه به‌صورت نسبی یا کامل حفظ می‌شود و شامل خیلی از انواع سلول‌های بافت بینابینی‌اند که همراه با لوله‌های منی‌ساز حاضر هستند. به‌نظر می‌رسد می‌توان این سیستم‌ها را با استفاده از محیط کشت ساده حفظ کرد [۷، ٥٤]. سیستم کشت ذاتاً توانایی حمایت از همهٔ مراحل اسپرم‌زایی را دارد و اجازه مشاهده همزمان کل بافت و چرخهٔ اسپرم‌زایی را می‌دهد. ضمناً، علاوه بر این‌که بافت بیضه تحت هیچ‌گونه هضم آنزیمی قرار نمی‌گیرد، حمایت آناتومیکی بین سلول‌های زایا و سرتولی به‌صورت دست نخورده باقی می‌ماند که به نوبه خود سلول‌های زایا را پرورش می‌دهد و از شکست پل‌های بین سلولی سلول‌های اسپرماتوگونی در حال تمایز جلوگیری و شرایط کشت را به‌عنوان نماینده نزدیک‌تر به شرایط داخل بدن حفظ می‌کند. سلول‌های سرتولی همانند اتاقک‌های کشت قسمت‌بندی شده هستند که از سطوح کناری دارای اتصالات محکم بوده و به‌عنوان سد خونی بیضه‌ای می‌توانند نقش داشته باشند [۵۵]. این مزایا در مطالعاتی که تمایل به کنش و واکنش‌های بین سیستم اندوکرین (Endocrine)، پاراکرین و اتوکرین (Autocrine) در تکوین بیضه دارند، استفاده می‌شود. علاوه براین؛ حفظ همهٔ مراحل مختلف تمایز سلول‌های زایا ممکن است کنش و واکنش‌های اتوکرین - پاراکرین اضافی که متقابلاً مفید هستند را تشویق کند.

نگهداری سیستم کشت لوله‌های منفرد برای بیشتر از چند روز به‌دلیل روی هم خوابیدن اجتناب ناپذیر لومن لوله‌ها می‌تواند سخت باشد [۵۰، ٥٦]. این موضوع ممکن است منجر به اضمحلال سریع بسیاری از لوله‌ها به‌همراه از دست دادن پیشرونده سلول‌های تمایز یافته از روز اول کشت در محیط آزمایشگاه شود [۵۷]. این در حالی است که کشت قطعات لوله‌های کوچک‌تر، این مشکل را تجربه نمی‌کند. هرچند مطالعات اخیر نشان دادند که زنده مانی و بقای سلولی در کشت لوله‌های بزرگ‌تر رو به افزایش است [۵۰] اما به‌صورت کلی این کشت‌ها کوتاه مدت است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

اسپرمیوژنسیس (Spermiogenesis) و اسپرم‌زایی در سیستم‌های کشت لوله‌ها با محیط کشت‌های اختصاصی سلول‌های سرتولی، ادامه پیدا می‌کند؛ هرچند این پیشرفت می‌تواند با توجه به مرحله اسپرماتوژنیک لوله، متغیر باشد [۴۷، ۴۸]. اکثر مطالعاتی که به بهینه‌سازی محیط کشت برای کشت لوله‌ها تمایل داشتند، برای تولید سلول‌های زایای هاپلویید مناسب برای لقاح آزمایشگاهی تلاش می‌کردند. این مطالعات به‌صورت نادر بیشتر از ۲۴ تا ۴۸ ساعت به طول انجامید [۵۸، ۵۹]. در این مطالعات به بقا و وضعیت ریخت‌شناختی سلول‌های سوماتیک کمتر اهمیت داده شد و به جای آن روی تأثیرات حاد هورمون‌ها روی میزان اسپرمیوژنسیس و اسپرم‌زایی تمرکز شده بود [۴۴]. به هرحال، مفید بودن کشت توبول‌ها به‌منظور استفاده در لقاح آزمایشگاهی برای بیماران آزواسپرمی غیر انسدادی، قویاً ثابت شده است [۴۴]. این سیستم با توجه به نسبت تمایز به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apotosis) که در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌یابد، نسبت به اسپرم‌زایی سالم داخل بدن، به نظر دارای تأثیر کمتری است، مثل مطالعاتی که میزان بالای مرگ سلول‌های دیپلویید (Diploid) و تتراپلویید (Tetraploid) را در کشت لوله‌های منی‌ساز گونه رت گزارش کرده‌اند [۴۹-۵۲، ۵۷].

کشت قطعات کامل بیضه خارج شده

مطالعات اندکی پیرامون بهینه‌سازی محیط کشت بافت (Organ Culture) گزارشی را منتشر کرده‌اند. مواردی که برای سیستم کشت منفرد و هم کشتی سلول زایا و سرتولی عنوان شده بود، شامل انواع محیط کشت، هورمون‌ها و عوامل رشد مکمل بودند که در مورد کشت بافت گزارش نشده است. تفاوت در این‌جا با گزارش ساتو (Sato) و همکارانش به‌وجود آمد، کسانی که از قطعات بافت بیضه موشی نابالغ استفاده کردند و به اسپرماتوزای کاملاً عملکردی به‌دست آمده از سلول‌های اسپرماتوگونی، رسیدند [۵۹]. به هر حال همهٔ اجزای سیستم پاراکرین بیضه شامل سلول‌های لیدیگ (Leydig cells) تولید کنندهٔ آندروژن (Androgen)، با کشت قطعات بافت بیضه حاضر هستند و می‌توانند تکثیر و تمایز سلول‌های زایا را با یک محیط کشت کاملاً ساده مثل DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) همراه با FCS و آنتی‌بیوتیک حفظ کنند [۵۴]. تساریک (Tesarik) و همکارانش در سال ۲۰۰ تأثیر هورمون FSH (Follicle-stimulating hormone) اضافه شده به محیط کشت بافت بیضه را بررسی کردند که پیشرفت فرآیند اسپرم‌زایی تا حصول اسپرماتوسیت پاچیتن (Pachytene spermatocyte) را گزارش کردند [۶۰]. آن‌ها همچنین با استفاده از قطعات بافت بیضه موشی نابالغ، بزرگترین اسپرم‌زایی موفق با قطعات پردازش شده مکانیکی و کوچک‌تر مثل نمونه‌های بیوپسی بیضه افراد آزواسپرمی غیر انسدادی را انجام دادند. این محققان، بافت بیضه را به‌صورت مکانیکی به تجمعات سلولی نفوذپذیرتری از سلول‌های زایا و سرتولی، تبدیل کردند و نشان دادند که نسبت به نمونه‌های هضم آنزیمی شده، اسپرم‌زایی پیشرفته‌تری را در سیستم کشت داشتند [۵۷، ۵۸]. اسپرماتیدهای به‌دست آمده ظاهرا منجر به فرزندان سالم تولید شده با تزریق داخل سلولی شده‌اند [۶۱].

پیوند آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

به‌منظور تولید اسپرم از سلول‌های زایا در شرایط آزمایشگاهی می‌توان از روش IVT (In Vitro Transplantation) یا پیوند در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرد که دارای ابعاد مختلفی از پیوند سلولی به‌همراه کشت بافت است. در روش IVT، سلول‌های زایا به داخل سمی‌نفروس توبول یک بیضه جدا شده از بدن فرد گیرنده، تزریق می‌شود و سپس قطعات بیضه مورد نظر تحت انکوباسیون و کشت بافت قرار می‌گیرد [۶۲].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

سلول‌های زایا در سمی‌نفروس توبول، شروع به تشکیل کلونی می‌کنند و به اسپرماتید یا اسپرم تمایز می‌یابند. روش IVT نسبت به روش پیوند in vivo که به‌صورت رایج استفاده می‌شود دارای یک سری مزایا است مانند امکان مشاهدهٔ سلول‌های زایا پیوند زده شده در هر روز و هر هفته؛ بنابراین روش IVT می‌تواند برای مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به جزئیات، مثل نحوه مستقر شدن این سلول‌های در کنام خود، نحوه گسترش و پیشرفت این سلول‌ها در فرآیند اسپرم‌زایی مفید باشد. علاوه بر این، روش IVT می‌تواند برای شناسایی ساده و سریع حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در نمونه‌های سلولی استفاده شود. روش IVT همچنین این توانایی را ایجاد می‌کند که از پاسخ‌های احتمالی سیستم ایمنی بدن فرد گیرنده که می‌تواند باعث رد کردن پیوند شود، فاصله گرفت.

مطالعات زیادی برای بررسی این روش تا کنون انجام نشده است. در سال ۲۰۱۳ ساتو (Sato) و همکارانش در ژاپن در این حیطه، روش کاری را منتشر کردند [٦٢]. روش کار آن‌ها هر چند نیاز به مهارت دستی و تمرین فراوان دارد ولی ساده و راحت است. به این صورت که سلول‌های زایا به داخل لوله‌های منی‌ساز بیضه خارج شده از بدن فرد گیرنده، تزریق می‌شود و سپس قطعات بیضه جدا شده تحت شرایط کشت بافت قرار می‌گیرد. این سیستم کشت بافت بیضه با حمایت کامل فرآیند اسپرم‌زایی از سلول‌های اسپرماتوگونی اولیه تا تشکیل اسپرم را شامل می‌شود. آن‌ها همچنین نشان دادند که قطعات کوچک بافت بیضه را می‌توان در ضد یخ و سپس در نیتروژن مایع برای مدت طولانی حفظ کرد. این بافت، بعد از فرآیند ذوب شدن، اسپرم‌زایی را دوباره شروع کرد.

یکی از راه‌های حفظ باروری در افراد مذکر که نیاز به درمان‌های شیمی‌درمانی دارند، جداسازی بیضه و انجماد آن و بدین صورت، حفظ طولانی مدت آن است تا در آینده و بعد از بلوغ به فرد پیوند زده و فرآیند اسپرم‌زایی از سر گرفته شود و باروری فرد حفظ شود. محیط داخل بدن بعد از درمان سرطان می‌تواند برای احتمال بازگشت سلول‌های سرطانی دارای خطر بالایی باشد و از طرف دیگر؛ شاید محیط داخل بدن بعد از درمان با داروهای شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، شرایط لازم برای حمایت از القای اسپرم‌زایی را نداشته باشد. طراحی محیطی که برای از سرگیری فرآیند اسپرم‌زایی جایگزین محیط داخل بدن باشد بسیار با اهمیت بوده و شاید تنها راه درمان این افراد باشد. به‌نظر می‌رسد القای فرآیند اسپرم‌زایی در محیط آزمایشگاه و خارج از بدن فرد و از طریق کشت بافت بیضه می‌تواند جایگزین خوبی برای محیط داخل بدن باشد.

منابع

[1] McLachlan R, de Kretser DM. Male infertility: the case for continued research. Med J Aust 2001; 174(3): 116-7.

[2] Lo KC, Domes T. Can we grow sperm? A translational perspective on the current animal and human spermatogenesis models. Asian J Androl 2011; 13(5): 677-82.

[3] Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. Tissue Cell 1998; 30(4): 389-97.

[4] Nagano M, Watson DJ, Ryu BY, Wolfe JH, Brinster RL. Lentiviral vector transduction of male germ line stem cells in mice. FEBS Lett 2002; 524(1-3): 111-5.

[5] Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. J Androl 2003; 24(5): 661-9.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[6] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(47): 16489-94.

[7] Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. Biol Reprod 2003; 68(6): 2207-14.

[8] Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. J Androl 2002; 23(4): 537-45.

[9] Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Haron AW, Nowroozi MR. Evaluation of the effects of cryopreservation on viability, proliferation and colony formation of human spermatogonial stem cells in vitro culture. Andrologia 2013; 45(1): 26-34.

[10] Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. Hum Reprod 2007; 22(5): 1384-95.

[11] Baert Y, Van Saen D, Haentjens P, In't Veld P, Tournaye H, Goossens E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? Hum Reprod 2013; 28(7): 1816-26.

[12] Schlatt S, Kim SS, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. Reproduction 2002; 124(3): 339-46.

[13] Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T, Ogura A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. Hum Reprod 2002; 17(12): 3039-45.

[14] Goossens E, Frederickx V, Geens M, De Block G, Tournaye H. Cryosurvival and spermatogenesis after allografting prepubertal mouse tissue: comparison of two cryopreservation protocols. Fertil Steril 2008; 89(3): 725-7.

[15] Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. Hum Reprod 2007; 22(4): 1060-7.

[16] Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. Hum Reprod 2005; 20(6): 1676-87.

[17] Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Høyer PE, Møllgård K, Yding Andersen C. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. Hum Reprod 2006; 21(2): 484-91.

[18] Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonckt A, François-Xavier W, Donnez J. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. Hum Reprod 2007; 22(6): 1603-11.

[19] Zeng W, Snedaker AK, Megee S, Rathi R, Chen F, Honaramooz A, Dobrinski I. Preservation and transplantation of porcine testis tissue. Reprod Fertil Dev 2009; 21(3): 489-97.

[20] Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. Nat Med 2000; 6(1): 29-34.

[21] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(24): 11298-302.

[22] Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(24): 11303-7.

[23] Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod 2002; 66(1):21-8.

[24] Zhang Z, Renfree MB, Short RV. Successful intra- and interspecific male germ cell transplantation in the rat. Biol Reprod 2003; 68(3): 961-7.

[25] Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DP, Spoormakers TJ, Colenbrander B, Oldenbroek JK, Van der Ploeg KD, Woelders H, Kal HB, De Rooij DG. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduction 2003; 126(6): 765-74.

[26] Absalan F, Movahedin M, Mowla SJ. Spermatogonial stem cell transplantation and subsequent orchidopexy in the bilateral cryptorchid mouse model. Cell J 2011; 13(3): 143-8.

[27] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Pour-Beiranvand S, Jabbari Arfaee A. Autologous transplantation of adult mice spermatogonial stem cells into gamma irradiated testes. Cell J 2012; 14(2): 82-9.

[28] Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Schöler H, Dobrinski I, Schlatt S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. Nature 2002; 418(6899): 778-81.

[29] Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, Schöler HR, Dobrinski I. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. Biol Reprod 2003; 68(6): 2331-5.

[30] Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. Biol Reprod 2003; 69(4): 1260-4.

[31] Honaramooz A, Li MW, Penedo MC, Meyers S, Dobrinski I. Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice. Biol Reprod 2004; 70(5): 1500-3.

[32] Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rübben H, Dhir R, Dobrinski I, Patrizio P. Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. Hum Reprod 2006; 21(2): 384-9.

[33] Geens M, De Block G, Goossens E,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

Frederickx V, Van Steirteghem A, Tournaye H. Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. Hum Reprod 2006; 21(2): 390-6.

[34] Sato Y, Nozawa S, Yoshiike M, Arai M, Sasaki C, Iwamoto T. Xenografting of testicular tissue from an infant human donor results in accelerated testicular maturation. Hum Reprod 2010; 25(5): 1113-22.

[35] Hunter D, Anand-Ivell R, Danner S, Ivell R. Models of in vitro spermatogenesis. Spermatogenesis 2012; 2(1): 32-43.

[36] Aslam I, Fishel S. Short-term in-vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in-vitro conception. Hum Reprod 1998; 13(3): 634-8.

[37] Gerton GL, Millette CF. Generation of flagella by cultured mouse spermatids. J Cell Biol 1984; 98(2): 619-28.

[38] Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Nuhoglu A. In-vitro culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1999; 14(11): 2808-11.

[39] Dirami G, Ravindranath N, Pursel V, Dym M. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. Biol Reprod 1999; 61(1): 225-30.

[40] Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction 2002; 124(6): 791-9.

[41] Yan W, Suominen J, Toppari J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. J Cell Sci 2000; 113 (Pt 1): 161-8.

[42] Chen HF, Ho HN, Chen SU, Lien YR, Chao KH, Lin HR, Huang SC, Lee TY, Yang YS. Co-culture with Vero cell monolayer maintains the motility of asthenozoospermic semen samples. Hum Reprod 1994; 9(7): 1276-80.

[43] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2009; 45(5-6): 281-9.

[44] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Miki H, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells in vitro. Biol Reprod 2006; 74(3): 522-9.

[45] Erkkilä K, Henriksén K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M, Dunkel L. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(7): 2314-21.

[46] Tesarik J, Guido M, Mendoza C, Greco E. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83(12): 4467-73.

[47] Menegazzo M, Zuccarello D, Luca G, Ferlin A, Calvitti M, Mancuso F, Calafiore R, Foresta C. Improvements in human sperm quality by long-term in vitro co-culture with isolated

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

porcine Sertoli cells. Hum Reprod 2011; 26(10): 2598-605.

[48] Toppari J, Brown WR, Parvinen M. Rat spermatogenesis in vitro traced by live cell squashes and monoclonal antibodies. Ann N Y Acad Sci 1984; 438: 515-8.

[49] Toppari J, Parvinen M. In vitro differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle morphologic and immunolocalization analysis. J Androl 1985; 6(6): 334-43.

[50] Toppari J, Mali P, Eerola E. Rat spermatogenesis in vitro traced by quantitative flow cytometry. J Histochem Cytochem 1986; 34(8): 1029-35.

[51] Hue D, Staub C, Perrard-Sapori MH, Weiss M, Nicolle JC, Vigier M, Durand P. Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. Biol Reprod 1998; 59(2): 379-87.

[52] Danner S, Kirchhoff C, Ivell R. Seminiferous tubule transfection in vitro to define post-meiotic gene regulation. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7: 67.

[53] Aizawa S, Nishimune Y. In-vitro differentiation of type A spermatogonia in mouse cryptorchid testis. J Reprod Fertil 1979; 56(1): 99-104.

[54] Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, Araki Y, Ogawa T. In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system. Biol Reprod 2010; 83(2): 261-7.

[55] Mitchell RT, Saunders PT, Childs AJ, Cassidy-Kojima C, Anderson RA, Wallace WH, Kelnar CJ, Sharpe RM. Xenografting of human fetal testis tissue: a new approach to study fetal testis development and germ cell differentiation. Hum Reprod 2010; 25(10): 2405-14.

[56] Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, McLean DJ. Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. Biol Reprod 2004; 70(3): 625-31.

[57] Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P. The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. Exp Cell Res 2000; 260(1): 85-95.

[58] Seidl K, Holstein AF. Organ culture of human seminiferous tubules: a useful tool to study the role of nerve growth factor in the testis. Cell Tissue Res 1990; 261(3): 539-47.

[59] Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature 2011; 471(7339): 504-7.

[60] Tesarik J, Balaban B, Isiklar A, Alatas C, Urman B, Aksoy S, Mendoza C, Greco E. In-vitro spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: relationship with in-vivo blocking stage and serum FSH. Hum Reprod 2000; 15(6): 1350-4.

[61] Tesarik J, Mendoza C, Anniballo R, Greco E. In-vitro differentiation of germ cells from frozen testicular biopsy specimens. Hum Reprod 2000; 15(8): 1713-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[62] Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Ogawa T. In vitro sperm production from mouse spermatogonial stemcell lines using an organ culture method. Nat Protoc 2013; 8(11): 2098-104.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]