حفظ باروری در پسران و مردان مبتلا به سرطان

آرش مهذب[1]، مهناز حیدری[2]، شیدا صالح‌خو[1]، محمود جدی تهرانی[3]، محمدمهدی آخوندی[1]*

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران

۲- پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران

۳- پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران

چکیده

یکی از علل ناباروری در مردان، از بین رفتن سلول‌های زایای جنسی، در اثر درمان‌های ضد سرطان، نظیر شیمی درمانی و پرتو درمانی است. با توجه به افزایش میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان پس از درمان، به ویژه کودکان و رسیدن آنها به سن باروری، اهمیت درمان ناباروری پس از درمان سرطان، در این افراد دو چندان می‌شود. معمول‌ترین روش حفظ باروری در مردان مبتلا به سرطان، انجماد مایع منی و استفاده از اسپرم آنها برای لقاح آزمایشگاهی، پس از درمان سرطان است. به دلیل عدم اسپرماتوژنز فعال در کودکان، حفظ بافت بیضه یا سلول‌های زایا، به صورت منجمد، پیش از شروع درمان سرطان در این دسته از بیماران یک روش درمانی مناسب محسوب می‌شود. با این حال، عدم بلوغ اسپرماتوگونیها یکی از مشکلات عمدهٔ این روش درمانی است. برای حل این مشکل، تلاش شده است تا سلول‌های اسپرماتوگونی منجمد به شکل بافت بیضه یا به صورت مجزا، پس از درمان سرطان به بیضه فرد بازگردانده شود تا روند بلوغ سلول‌های اسپرماتوگونی در محیط طبیعی و زنده انجام گیرد. محیط‌های آزمایشگاهی نیز گزینه‌ای جایگزین برای بلوغ اسپرماتوگونی و تولید اسپرم لازم برای IVF هستند. در این مقاله مروری، تلاش بر آن است تا با شناخت سلول‌های زایا و علل ناباروری ناشی از درمان سرطان، مروری بر روش‌های حفظ باروری و پیوند سلول‌های زایا انجام شود.

* **مسئول مکاتبه:** محمد مهدی آخوندی، گروه جنین شناسی، پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، صندوق پستی: ۱۱۷۷- ۱۹۶۱۵، تهران، ایران

رایا نامه:
akhondi@avicenna.ac.ir

دریافت: ۸۹/۱/۳۱

پذیرش: ۸۹/۴/۹

کلید واژگان: انجماد بیضه، پرتو درمانی، پیوند سلول بنیادی اسپرماتوگونی، پیوند سلول‌های زایا، حفظ باروری، شیمی‌درمانی.

نحوه استناد به این مقاله: مهذب آرش، حیدری مهناز، صالح‌خو شیدا، جدی تهرانی محمود، آخوندی محمدمهدی. حفظ باروری در پسران و مردان مبتلا به سرطان. فصلنامه باروری و ناباروری: سال ۱۲ (۱۳۹۰)، شماره ۲، صفحات: ۸۴-۷۳.

زمینه و هدف

سلول‌های بنیادی و سلول‌های زایا: سلول‌های بنیادی گروهی از سلولها هستند که ضمن داشتن توانمندی تقسیم به سلول‌های کاملاً مشابه خود[1]، توانایی تولید و تمایز به سلول‌های تخصصی‌تر را نیز داشته باشند (۱). در بسیاری از انواع سلول‌های بنیادی، گروهی سلول حد واسط بین سلول‌های کاملاً تمایز یافته با سلول‌های بنیادی، وجود دارد که سلول‌های پیش‌ساز[2] نامیده می‌شوند سلول‌های پیش‌ساز خونی نمونه‌های مشهور آن هستند. علیرغم اینکه این سلولها قابلیت برگشت به حالت تمایز یافته را ندارند؛ بعضی از ویژگی‌های آنها را تقلید می‌کنند. مهم‌ترین تفاوت میان سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز، قابلیت تقسیم میتوز بسیار شدید سلول‌های پیش‌ساز، نسبت به سلول‌های بنیادی است (۲). بنابراین، نقش سلول‌های بنیادی، به عنوان ذخیرهٔ زایای بدن و نقش سلول‌های پیش‌ساز، به عنوان تولیدکننده رده‌های سلولی تعریف می‌شود و در واقع، سلول‌های پیش‌ساز، مسئول اصلی تمایز نهایی هستند.

1- Self renewal
2- Progenitor

Downloaded from http://www.jri.ir

سلول‌های زایای نر[1]، در واقع، مجموعه‌ای از سلول‌های تمایز نیافته هستند که در مجموع، اسپرماتوگونیها را شامل می‌شوند. این سلولها در گروه‌های مختلف جانوری، ترکیب‌بندهای متفاوتی دارند. به عنوان مثال، در ردهٔ پریماتها و انسان، دو ردهٔ سلولی اسپرماتوگونی A, B وجود دارد که ردهٔ A خود به دو گروه سلولی A_{dark} و A_{pale} تقسیم می‌شود. گروه A_{dark} که جمعیتی حدود ۱٪ از سلول‌های اسپرماتوگونی را شامل می‌شود، در واقع، همان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی[2] (SSCs) با تقسیم میتوزی اندک است (۳).

میزان پایین میتوز در اسپرماتوگونی‌های A_{dark} به کاهش خطر جهش و پایداری ژنتیکی کمک می‌کند. در واقع، اسپرماتوگونی‌های A_{dark} ذخیره سلول‌های بنیادی، در زمان تخریب حجم انبوه سلول‌های پیش‌ساز، هستند (٤). از سوی دیگر، گروه A_{pale}، به عنوان سلول‌های پیش‌ساز با تکثیر زیاد و تمایز برگشت‌ناپذیر، شرایط را برای تولید انبوه اسپرماتوزوییدها فراهم می‌کند.

در جوندگان، اسپرماتوگونی‌های A شامل ۷ رده اسپرماتوگونی A_{single}، A_{paired}، $A_{Aligned}$، A_1، A_2، A_3 و A_4 هستند که در این میان، تنها ردهٔ A_{single} نقش سلول بنیادی را به عهده دارد و سایر رده‌های اسپرماتوگونی، به ویژه A_{paired} و $A_{Aligned}$، نقش‌های حد واسط را بازی می‌کنند (٥).

مرحلهٔ بعدی تقسیم سلول‌های زایا، اسپرماتوگونی‌های B هستند که حد واسط نوع A تا اسپرماتوسیت تلقی می‌شوند. این سلولها در موش یک رده، در پریماتها چهار رده و در انسان نیز یک رده را شامل می‌شوند (٦،٧). به این ترتیب، اسپرماتوگونی‌های انسان برای رسیدن به اسپرماتوسیت عبارتند از A_{dark} و A_{pale}. در حالی که در موش، ۱۰ ردهٔ سلولی حد واسط و در پریماتها، ۷ ردهٔ سلولی حد واسط وجود دارد.

این تفاوتها، در تعداد اسپرماتوسیت‌های حاصل از هر سلول بنیادی اسپرماتوگونی تأثیر خواهد داشت؛ به گونه‌ای که در انسان از هر اسپرماتوگونی A_{dark}، ٤ اسپرماتوسیت و در پریماتها، ۳۲ اسپرماتوسیت و در موش، از هر A_{Single}، ۱۰۲٤ اسپرماتوسیت تولید می‌شود (۸).

کاهش تعداد سلول‌های پیش‌ساز در انسان که تقسیم میتوز فراوان دارند و تحت تأثیر عوامل داخلی و خارجی، در معرض خطر بالای جهش قرار می‌گیرند، یک راهکار تکاملی برای حفظ پایداری ژنتیکی و حساسیت سلولها در مقابل عوامل سیتوتوکسیک به نظر می‌رسد. افزون بر آن، از نظر الگوهای تولیدمثلی نیز، با توجه به امید به زندگی طولانی انسانها و نیز تعداد کم فرزندان، به تعداد کمتری گامت نیاز است و این الگوی سلول‌های پیش‌ساز با تولید کمتر اسپرمها مطابقت می‌کند (۸).

اثر درمان‌های ضد سرطان بر سلول‌های زایا: درمان‌های ضد سرطان، اعم از پرتودرمانی یا شیمی‌درمانی، با هدف قراردادن سلول‌های پرتکثیر، اثر درمانی خود را بر سلول‌های سرطانی اعمال می‌کنند. در این میان، سلول‌های زایا نیز، با توجه به نرخ بالای تکثیر، دچار آسیب و مرگ سلولی می‌شوند که در نهایت، با کاهش توان باروری یا ناباروری کامل بیماران همراه است (۹).

میزان آسیب در سلول‌های زایا به شدت درمان‌های ضد سرطان بستگی دارد، به گونه‌ای که در شیمی‌درمانی و پرتودرمانی با دوز پایین، تنها سلول‌های A_{pale} و اسپرماتوگونی‌های B از بین می‌روند و سلول‌های A_{dark} باقی می‌مانند و در نهایت، توانایی باروری بدین واسطه حفظ می‌شود (٤)؛ اگرچه این امکان نیز وجود دارد که به علت از دست رفتن سلول‌های پیش‌ساز، فرد دچار الیگوسپرمی شود (۱۰).

در دوزهای بالای شیمی‌درمانی، همه سلول‌های اسپرماتوگونی اعم از A, B از دست می‌روند و آنچه باقی می‌ماند سلول‌های سرتولی است که به این شرایط سندرم SCO[3] گفته می‌شود (۱۱).

به عنوان مثال، دوزهای پرتودرمانی ۰/۱-۱/۲Gy به رده‌های پیش‌ساز آسیب خواهد زد و در نهایت، الیگوزوسپرمی را به دنبال خواهد داشت. در دوزهای ٤ و ۳-۲ و ۱، اسپرماتوژنز به ترتیب ظرف ۱۸-۹ ماه، ۳ و ٥ سال باز خواهد گشت. در دوزهای بیش از ۲۰Gy، آسیب سلولی به

1- Male germ cells
2- Soermatogonial stem cell
3- Sertoli Cell Only

Downloaded from http://www.jri.ir

سلول‌های لایدیگ نیز گسترش خواهد یافت که در صورت بروز این آسیب در کودکان، روند هورمونی بلوغ دچار اختلال خواهد شد. اگر میزان پرتوها در محدوده زیر ۱۲Gy (پیوند مغز استخوان) باقی بماند، روند اسپرماتوژنز دچار اختلال می‌شود اما روند بلوغ آسیبی نمی‌بیند (۱۲،۱۳). در مورد درمان‌های شیمی‌درمانی، با توجه به تنوع رژیم‌های درمانی، تأثیرات نیز متنوع است ولی در کل گروهی از داروها که از سد خونی بیضه‌ای عبور کنند، آسیب‌رسان هستند مانند سیکلوفسفامید، بوسولفان، کلرامبوسیل (۱٤).

بقای بیماران سرطانی: بنا بر آمار ارایه شده، از هر ٦٤٠ امریکایی، یک نفر و در مجموع ۳۰۰ هزار نفر از جمعیت کل، بیماران مبتلا به سرطانی هستند که درمان شده‌اند و در سنین ۲۰ تا ٤۰ سال قرار دارند. بیش از نیمی از آنها امید به زندگی بیشتر از ٥ سال دارند و امکان داشتن فرزند به افزایش کیفیت زندگی آنها کمک خواهد کرد.

در کودکان نیز، اگرچه بقای ٥ ساله بعد از درمان سرطان حدود ۸۰٪ است؛ اما میزان بقای ۱۰ ساله و بیشتر، با توجه به سن و نیز عوارض درمان‌های ضد سرطان، کاهش می‌یابد. با این حال و با توجه به پیشرفت‌های موجود در درمان سرطان، یافتن راه‌های حفظ باروری کودکان تحت درمان‌های ضدسرطان از اولویت‌های متخصصان علوم باروری به حساب می‌آید (۱٥).

روش بررسی

این مقاله مروری، با استفاده از مقالات منتشر شده در منابع اطلاعاتی SCIENCE DIRECT و ELSEVIER در بازه زمانی سال‌های ۲۰۱۰ – ۱۹۸٥ میلادی و با جستجوی کلید واژه‌های Fertility preservation, Spermatogonial Stem cell culture & transplantation, infertility in cancer treatment آغاز و در مواردی از منابع درج شده در مقالات فوق‌الذکر نیز استفاده شد. تعداد منابع مورد بررسی در مجموع ۱٥٦ مقاله و ٤ کتاب بود.

روش‌های حفظ باروری پس از درمان سرطان: روش‌های حفظ باروری مورد استفاده در بیماران سرطانی، گروه‌های دیگری از افراد را نیز شامل می‌شود. کارگران و کارکنان کارخانه‌هایی که در مواجهۀ طولانی مدت با مواد گونادوتوکسیک قرار دارند (مثل کارگران نساجی) یا کارمندان سیستم‌های بهداشتی درمانی و نیز نظامیانی که در مواجهه با ترکیبات پرتوزا یا سمی قرار دارند، از این دسته افرادند (۱۷،۱٦).

روش‌های حفظ باروری را می‌توان با توجه به طیف سنی بیماران به دو دسته تقسیم کرد: برخی از روش‌های حفظ باروری در مردان بالغ انجام می‌گیرد، که این روشها، به علت دسترسی به بافت فعال بیضه و نیز اسپرماتوزوآی مؤثر، روش‌هایی به نسبت در دسترس هستند و در حال حاضر امکان حفظ باروری را فراهم می‌آورند. اما از سویی دیگر، روش‌های حفظ باروری کودکان تحت شیمی‌درمانی با مشکل فقدان سلول‌های اسپرماتوگونی فعال و نبود اسپرم مؤثر مواجه است در نتیجه فراهم کردن شرایط برای بلوغ و تمایز این سلولها به سمت اسپرماتوسیت و اسپرماتوزوآ بخشی مهم از این فرآیند است. وجود مشکلات فوق باعث محدودیت روش‌های حفظ باروری برای کودکان شده است. با این حال، تلاش خوبی در این راه انجام شده است و بسیاری از دانشمندان این فرآیند را پیگیری می‌کنند (۱٤).

روش‌های حفظ باروری در مردان بالغ: ۱ــ سرکوب تقسیم سلول‌های زایای بیضه در مردان بالغ به وسیلۀ تزریق آنالوگ‌های هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپینها GnRH قبل از انجام پرتو یا شیمی‌درمانی، به حساسیت کمتر این سلولها نسبت به درمان‌های سیتوتوکسیک منجر می‌شود (۱۸). از سوی دیگر، اگر درمان با دوزهای بالای آگونیست‌های GnRH بلافاصله پس از انجام شیمی‌درمانی تا حدود ده هفتۀ اول انجام شود، سلول‌های زایای باقی‌مانده را برای تقسیم تحریک می‌کند. در یک مطالعه، در ۹۰٪ از افرادی که پس از پرتوتابی ۳/٥ Gy تحت درمان GnRH قرار گرفته‌اند، تکثیر مجدد اسپرماتوگونیها را داشته‌اند، اگرچه هنوز اثر آنها بر روی باروری ثبت نشده است (۱۹). در مطالعه دیگرکه بر روی موشهای مدل آزوسپرمی انجام شده است تزریق توام گونادوتروپینها به همراه استرادیول با افزایش بازگشت اسپرماتوژنز همراه بوده است (۲۰). افزایش ترشح تستوسترون نیز نتیجه مثبت دیگری است که در نتیجه تزریق گونادوتروپینها به دست می‌آید (۲۱).

Downloaded from http://www.jri.ir

با تمام تلاش‌های فوق، این احتمال که اختلالات ژنتیکی ناشی از شیمی‌درمانی، در محتوای ژنتیکی متولدان تأثیرگذار باشد، استفاده از این روش را با ابهام مواجه می‌کند (۲۲).

۲ـ اخذ و انجماد نمونه‌های اسپرم قبل از انجام شیمی‌درمانی و پرتودرمانی و استفاده ازآن برای تزریق داخلی سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) یا IVF شانس باروری مردان رهایی یافته از سرطان را، تا ۵۰٪ افزایش داده است (۲۳). افزون بر آن، مطالعات، عارضهٔ ژنی خاصی را پس از تولد حاصل از اسپرم منجمد گزارش نکرده‌اند (۲٤).

روش‌های حفظ باروری در کودکان سرطانی: حفظ باروری در کودکان پسر، با توجه به عدم وجود اسپرماتوژنز فعال، با مشکلاتی روبه‌رو است که مهم‌ترین آنها عدم امکان انجماد اسپرم و نیز عدم تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی در بیضه است. بنابراین، سیاست حفظ باروری آنها بر یکی از سه محور زیر بنا خواهد شد:

الف) جداسازی و انجماد بافت بیضه و تلاش برای پیوند مجدد بافت پس از بهبودی

ب) جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی و تلاش برای کشت و بلوغ آنها در شیشه یا میزبان ثانویه با هدف نهایی تولید اسپرم برای IVF

ج) جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی از بافت منجمد شده بیضه پس از درمان سرطان و پالایش آن از سلول‌های سرطانی و پیوند مجدد آنها پس از بهبودی

انجماد بافت بیضه و پیوند مجدد: حفظ بافت بیضه، از طریق انجماد نمونه‌ها قبل از انجام شیمی‌درمانی و پیوند مجدد آنها پس از درمان، یک روش درمانی پیشنهادی برای حفظ باروری در کودکان تحت درمان سرطان است. در این روش، هدف نهایی بلوغ سلول‌های تمایز نیافتهٔ اسپرماتوگونی در بدن فرد بیمار، به کمک سلول‌های سرتولی است.

تلاش‌های بسیاری برای حفظ باروری در پستانداران از طریق پیوند بافت بیضه صورت گرفته است، بدین صورت که بافت بیضهٔ نابالغ به صورت ارتوتوپیک[1] در داخل بافت بیضهٔ میزبان و اکتوپیک[2]، در سایر نقاط بدن میزبان سرکوب ایمنی شده مثل پوست پیوند زده و وضعیت تولیدمثلی آنها نیز پیگیری شده است. به عنوان مثال، Schlatt و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳، موفق شدند به دنبال پیوند بافت بیضه در موش و همستر، به تولید نسل جدید از آنها دست یابند (۲۵،۲٦). تحقیقات هنرآموز (۲۷،۲۸) نیز در مورد خوک و بز، به ترتیب، به تولید جنین و اسپرم‌های زنده انجامید. گاهی این پیوندها در میزبانی غیر از گونهٔ دهندهٔ بیضه انجام شده است (xenotransplantation)، که به عنوان مثال، هنرآموز در سال ۲۰۰٤، موفق شد با پیوند اکتوپیک سلول‌های بیضهٔ میمون رزوس به موش سرکوب ایمنی شده، اسپرم میمون را در بدن موش ردیابی کند (۲۹).

یکی از پژوهش‌های مهم انسانی در این زمینه در سال ۲۰۰٦ توسط Schlatt به صورت زنوگرافت اکتوپیک انسان به موش و در زیر پوست انجام شد که علیرغم حفظ بقای سلول‌های زایا تقسیمات میوزی و اسپرماتوژنز را به همراه نداشت. این روش هنوز در مورد بافت‌های انسانی رویکرد موفقیت‌آمیزی نداشته است، با این وجود، در یک مطالعه، پیوند بافت‌های بیضه بالغ در ۱٤ نفر از ۳۱ فرد درمان شده پس از سرطان، به تولید سلول‌های بیضه و توبول‌های منی‌ساز منجر شده است. البته، پیشبرد فرآیند بلوغ این سلول‌های نابالغ همچنان نیازمند انجام پژوهش‌های بیشتر است (۳۰).

در میان تکنیک‌های مختلف انجماد، حفظ سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و بستر بافتی بیضهٔ نابالغ به وسیلهٔ انجماد در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) موفقیت‌آمیزتر بوده است (۳۱). از سوی دیگر، در سال ۲۰۰۷، Wyns موفق شد بافت بیضهٔ منجمد شدهٔ انسانی را پس از ذوب کردن به بیضهٔ موش پیوند بزند و سلول‌های اسپرماتوگونی را زنده نگهدارد (۳۲). یکی از موفقیت‌های این پژوهش، تأیید سلامت سلولها پس از انجماد و ذوب بود که قابلیت استفاده از پیوند بافت در کودکان مبتلا به سرطان را، پس از انجماد طولانی مدت، نوید می‌داد.

مطالعات wistuba در سال ۲۰۰۵ و Luetjens در سال ۲۰۰۷ که روی پریماتها انجام شد (۳۳)، نشان می‌دهد که پیوندهای ارتوتوپیک از پیوندهای اکتوپیک مؤثرترند، چرا که

1- Orthotopic
2- Ectopic

Downloaded from http://www.jri.ir

چرخهٔ اسپرماتوژنز در پیوندهای ارتوتوپیک در بافت بیضه تکمیل می‌شود اما در حالت اکتوپیک، سلول‌های اسپرماتوگونی در چرخه‌های میوز و اسپرمیوژنز گیر می‌افتند.

تولید اسپرم در محیط آزمایشگاهی از سلول‌های زایای استخراج شده قبل از درمان: فراهم ساختن شرایط مناسب در شیشه (in vitro) برای تمایز سلول‌های زایای بدوی (PGC)[1] یا اسپرماتوگونیها به سمت اسپرماتوسیتها، در نهایت، به شبیه سازی محیط بیضه خواهد انجامید که در صورت تحقق این امر گام بسیار بزرگی در روند حفظ باروری افراد و درمان ناباروری برداشته خواهد شد، اگرچه تا رسیدن به این هدف راهی بسیار طولانی پیش‌رو است.

برای تحقق این امر، مهم‌ترین اقدامات، بررسی فاکتورهای رشد ترشح شده در بافت بیضه و سلول‌های سرتولی، شناسایی ژن‌های مؤثر بر باروری و تمایز اسپرماتوگونیها و نیز، انتخاب سلول‌های تغذیه کننده مناسب است (۳٤).

افزون بر آن، استفاده از محیط‌های مناسب تمایز در آزمایشگاه، در فاصله زمانی بین درمان‌های ضد سرطان و بازگرداندن سلول‌های زایا زمان کافی برای تمایز سلول‌های نابالغ استخراج شده را مهیا می‌سازد و این محیطها امکانی فراهم می‌آورد تا سلولها مراحل تقسیم و تمایز خود را در محیط آزمایشگاهی به دست آورند و پس از آن عمل پیوند انجام گردد. آنچه در نهایت، پس از پیوند بافت بیضه، بسیار مهم به نظر می‌رسد، سلامت و احیای چرخه اسپرماتوژنز و نیز حفظ محتوای ژنتیکی اسپرم‌های تولید شده است که این موضوع در نمونه‌های حیوانی توسط zeng، در دو مقاله بررسی و تأیید شده‌اند (۳٥،۳٦).

از سوی دیگر، در صورت موفقیت نهایی حفظ اسپرماتوژنز انسان از طریق پیوند زنوگرافت می‌توان برای حفظ باروری مبتلایان به سرطان، از تلقیح اسپرم به دست آمده از آن استفاده کرد و نیاز به پیوند اتوگرافت بافت در فرد دهنده را مرتفع ساخت.

یکی از مهم‌ترین ایرادات وارد شده به پیوند بافت بیضه، امکان انتقال سرطان از طریق پیوند اتوگرافت بافت‌های آلوده است؛ چرا که ممکن است آلودگی آن در روندهای تشخیصی معمول قابل ارزیابی دقیق نباشد. افزون بر آن، Fujita در سال ۲۰۰۸ نشان داد که وجود سلول‌های سرطانی در بافت بیضه مانع تکمیل روند اسپرماتوژنز نرمال در بافت پیوندی می‌شود (۳۷).

پیوند سلول‌های SSC منجمد شده: در این روش سلول‌های *SSC* پس از جداسازی از نمونهٔ بیضه، منجمد می‌شوند و تا پایان درمان سرطان، نگهداری و سپس ذوب می‌گردند و به بافت بیضه فرد بازگردانده می‌شوند. سابقه پیوند سلول‌های *SSC* به سال ۱۹۹٤ بر می‌گردد که Brinster موفق شد با پیوند سلول‌های *SSC* ی یک موش، باروری را به موش نابارور دیگر برگرداند و موجب تولید اسپرماتوزوآی فعال و مؤثر شود (۳۸،۳۹).

معمولاً در مطالعات پیوند سلول‌های *SSC*، برای ردیابی سلول‌های پیوند شده از نشانگرهای ژنتیکی تراریخته یا پروتئین‌هایی استفاده می‌شود که ژن آنها به صورت ترانس‌ژنیک وارد سلول‌های زایای فرد دهنده شده باشد؛ اما فرد گیرنده فاقد آن باشد. به عنوان مثال، Brinster در مطالعهٔ خود از ژن B گالاکتوزیداز استفاده کرد که به صورت ترانس‌ژنیک در موش دهنده وجود داشت و پس از پیوند، در اسپرم تولید شده نیز ردیابی شد. در یک مطالعه نیز سلول‌های SSCs با ماده شیمیایی Brdu نشاندار و سپس با آنتی بادی علیه آن ارزیابی گردیدند (٤۰).

در مطالعهٔ سال ۱۹۹٦، Avarbock نشان داد که سلول‌های زایا را می‌توان قبل از میوز برای مدت طولانی منجمد کرد (٤۱). در ۱۹۹۸، Nagano قبل از انجام پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی، آنها را در محیط کشت آزمایشگاهی رشد داد و پس از نامیرا کردن در محیط کشت، پیوند زد و بقای آنها را برای مدت طولانی تایید کرد (٤۲). نتایج حاصل از چنین پیوندی در موش، در سال ۲۰۰۳ و از سوی Shinohara گزارش شد (٤۳).

با وجود انجام پیوندهای متعدد، سلول‌های زایا در گونه‌های جانوری مختلف از جمله رت، همستر، بز، گاو و خوک و میمون، زانوگرافت بین دو گونه، زمانی به تولید اسپرم خواهد انجامید که این پیوند بین دو گونهٔ نزدیک به هم

1- Primordial Germ Cell

Downloaded from http://www.jri.ir

باشد به طوری که این امر بین رت با موش و بز با خوک اتفاق افتاده است. در غیر این صورت، در قسمتی از میوز، روند اسپرماتوژنز مختل خواهد شد (٤٤).

به نظر می‌رسد اختلال فوق ناشی از عدم تطابق فعالیت سلول‌های سرتولی بیضه میزبان با سلول‌های زایای پیوندی باشد. زیرا که Shinohara در ۲۰۰۳ نشان داد که پیوند همزمان سلول‌های سرتولی با سلول‌های زایا توانایی تولید اسپرم را به دنبال خواهد داشت.

در نزدیک‌ترین مطالعه به انسان که توسط Hermann روی پریماتها انجام شده است، پس از مواجهۀ میمون رزوس با بوسولفان و ایجاد وضعیت ناباروری در آن، سلول‌های اسپرماتوگونی که از قبل نمونه‌گیری شده بودند و به صورت منجمد نگهداری می‌شدند، به بیضه او بازگردانده شدند. نشانگر ژنی اسپرماتوگونی (VASA, DA2L) و نیز پیش‌ساز (PLZF, GFRα1) در بافت‌های بیضه ردیابی و پیوند موفقیت‌آمیز گزارش شد (٤٥).

از سوی دیگر، نیز پیوند زنوگرافت بافت بیضه، نسبت به پیوند سلول‌های *SSC* به تنهایی، موفقیت بیشتری در اسپرماتوژنز داشته‌اند که این امر می‌تواند مؤید نقش سلول‌های سرتولی در این میان باشد.

پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انسان: آنچه در نهایت به ذهن می‌رسد، این است که آیا بعد از به نتیجه رسیدن فعالیت‌های پژوهشی حیوانی، پیوند سلول‌های زایا در انسان قابل انجام است یا به عبارت دیگر، آیا از این روند می‌توان به عنوان روشی برای حفظ باروری افراد مبتلا به سرطان، به ویژه کودکان مبتلا که سلول‌های زایای آنها پیش از طی مراحل بلوغ از بین رفته است، استفاده کرد یا خیر. افزون بر آن، پرسش‌های بسیاری در مورد ایمنی و سلامت این پیوند، به ویژه در حفظ محتوی ژنی آنها، مطرح است که باید به آنها پاسخ داده شود. در یکی از مطالعات انجام شده، در ۱۱ نفر از مردان مبتلا به سرطان نمونه‌گیری و نمونه‌های بافتی بیضه منجمد شده و سپس در مرحله پس از درمان با باز گرداندن بافت بیضه، ٥ نفر از آنها اسپرماتوژنز فعال خود را باز یافته‌اند (٤٦).

مراحل اصلی پیوند سلول‌های *SSC* برای حفظ باروری کودکان مبتلا به سرطان عبارتند از: نمونه‌گیری و انجماد نمونه‌ها، جداسازی سلول‌های *SSC*، رفع آلودگیها و بدخیمیها و در نهایت پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی به فرد.

تقریباً از هر 10^4 سلول بیضه، ۲ سلول آن اسپرماتوگونی بنیادی (S.S.C)[1] هستند (٤٤) در نتیجه در یک بیضه موش نابالغ حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ سلول بنیادی اسپرماتوگونی وجود دارد (٥). به دست آوردن تعداد مناسب از سلول‌های *SSC* و نیز تخلیص یا بالا بردن غلظت آنها در سوسپانسیون پیوند یکی از عوامل مؤثر در میزان موفقیت آن پیوند است (٤٧).

انجماد بافت بیضه: با توجه به فاصلۀ زمانی میان نمونه‌گیری تا پیوند سلول اسپرماتوگونی که شامل دورۀ درمان ضد سرطان و اطمینان از وضعیت سلامتی و عدم بازگشت سرطان و نیز اتمام اثر داروهای ضد سرطان در بدن است و حدود ٥ سال به درازا می‌کشد (٤٧)، انجماد سلول‌های اسپرماتوگونی اجتناب‌ناپذیر است. نخستین الگوی انجماد سلول‌های بافت بیضه با هدف فعالیت‌های In vitro و مهم‌تر از همه ICSI طراحی شد (٤٨). اگرچه با همین الگوها در ۱۹۹٦، Avarbock اولین پیوندهای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی موش را پس از انجماد با موفقیت انجام داد؛ اما نیاز به یک تکنیک اختصاصی برای انجماد سلول‌های زایا و سلولهای همراه آن احساس می‌شود تا بتواند بهترین شرایط ممکن را فراهم آورد. در ۱۹۹۹، Dobrinsky و Ogawa با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰٪ موفق به انجماد مؤثر شدند و در ۲۰۰۲، ایزدیار (٤٦) و همکاران جهت انجماد اسپرماتوگونی گاو از الگوی مشابهی استفاده کردند. تفاوت روش آنها در این بود که محیط انجماد آنها ساکارز ۰/۰۷*M* بود و بقای سلول‌های ذوب شده بعد از انجماد حدود ۷۰٪ گزارش شد. در یک پژوهش دیگر در سال ۲۰۰۷، Hermann موفق شد با استفاده از DMSO با غلظت ۱۰٪، به بقای ۵۸٪ سلول‌های میمون، پس از انجماد، برسد (٤٥). برای انجماد سلول‌های انسانی، Kvist در سال ۲۰۰٦ از روش انجماد آهسته که پیش از آن در مورد تخمدان استفاده شده بود، استفاده کرد که مادۀ محافظ آن اتیلن‌گلیکول ۱/٥*M* و ساکارز ۰/۱*M* بود (٤٩). از سوی دیگر، در سال ۲۰۰۷،

1- Spermatogonial Stem Cell

Downloaded from http://www.jri.ir

Keros از انجماد آهسته با DMSO استفاده کرد و به نتیجه رسید. برای ذوب کردن نیز معمولاً از محلول نمکی هنکس (HBSS) در یک حمام آب ۳۷ ℃ استفاده می‌شود (۳۱).

جداسازی سلولها: پس از ذوب کردن سلول، نوبت به استخراج سلول‌های اسپرماتوگونی از بافت بیضه می‌رسد که طبق آنچه گفته شد، تراکم پایینی در بیضه دارند و باید جهت پیوند، جداسازی و افزایش غلظت داده شوند. برای جداسازی سلول‌های اسپرماتوگونی معمولاً از روش‌های جداسازی سلولی مبتنی بر اتصال آنتی‌بادی به گیرنده‌های سطحی اختصاصی این سلولها استفاده می‌شود. اولین شاخص پروتئینی که برای سلول‌های اسپرماتوگونی شناخته شد، گیرندهٔ C-kit بود که در سلول‌های اسپرماتوگونی تمایز نیافته (A) بیان نمی‌شود ولی در انواع تمایز یافته‌تر یافت می‌شود (۵۰).

بنابراین، سلول‌های زایای مناسب برای پیوند، گروه $C\text{-}kit^-$ است. سایر پژوهشها در مورد سلول بنیادی اسپرماتوگونی نشان می‌دهد که سلول‌های اسپرماتوگونی انسانی THY_1^+، $integrin^+$ β_1 و α_6، CD_{24}^+، CD_9^+، $C\text{-}kit^-$، $MHC\ I^-$، integrin α_v^+ هستند (۵۱). با این حال هیچ یک از شاخص‌های زیر برای SSCs اختصاصی نیستند و در سایر سلول‌های رده زایا نیز مشترکا یافت می‌شوند. اخیراً GPR125 به عنوان یک شاخص اختصاصی سلول‌های SSCs معرفی شده است که توسط سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیان می‌شود. اما به نظر می‌رسد عدم بیان آن در سایر سلول‌های بافت بیضه نیازمند بررسی بیشتر باشد (۵۱).

دو روش جداسازی سلولی براساس برهم کنش ایمنولوژیک وجود دارد:

ـ روش FACS[1] مبتنی بر اتصال رنگ‌های فلورسنت به آنتی‌بادی اختصاصی برای سلول‌های اسپرماتوگونی و جداسازی آنها بر مبنای اتصال به آنتی‌بادی نشاندار است. در سال ۲۰۰۳، Kubota سلول‌های اسپرماتوگونی را با روش FACS جداسازی کرد (۵۲).

ـ در روش MACS[2] آنتی‌بادی اختصاصی علیه شاخص‌های سطحی مورد نظر به دانه‌های بسیار ریز مغناطیسی متصل می‌شود تا با عبور محلول حاوی سلولها از میدان مغناطیسی، سلول‌های متصل شده به ذرات مغناطیسی از طریق آنتی بادی، جداسازی گردند. سال ۱۹۹۹ Von schonfeldt با روش MACS سلول‌های $c\text{-}kit^+$ را جداسازی کرد (۵۳).

رفع آلودگی سلول‌های SSC: در سال ۲۰۰۱، Jahnukainen (۵٤) نشان داد که پیوند سلول‌های زایای به دست آمده از بیضه آلوده با لوکمی، به القای مجدد سرطان در افراد گیرنده منجر می‌شود. به عبارتی دیگر، در میان سلول‌های زایا، هنوز تعدادی از سلول‌ها ویژگی سرطانی دارند.

از آنجا که تعدادی از سرطان‌های دوره کودکی، به ویژه سرطان خون، می‌توانند به بافت بیضه وارد شوند یا تهاجم کنند، آلودگی این سلولها می‌تواند موجب بازگشت سرطان شود بنابراین تا رفع این مشکل باید از پیوند سلول‌های زایا به عنوان درمان حفظ باروری خودداری شود.به علاوه همانطور که پیشتر ذکر شد وجود سلول‌های سرطانی مانع تمایز صحیح و بلوغ کامل سلول های اسپرماتوگونی موش می‌شوند (۳۷).

تلاشها برای جدا سازی سلول‌های سرطانی بر عدم بیان MHC I روی سلول‌های اسپرماتوگونی بنیادی بنا شده است؛ چرا که MHC کلاس اول بر روی سلول‌های سرطانی بیان می‌شود. Fujita در سال ۲۰۰۵ موفق شد با استفاده از روش FACS سلول‌های فاقد CD45 و زنجیره‌های سنگین MHC I (H2kb, H2Db) را به عنوان سلول‌های اسپرماتوگونی موش جداسازی کند و به بیضه موش‌های شیمی‌درمانی شده تزریق نماید و در نهایت با تولد اولین موش زندهٔ ناشی از این پیوند، جداسازی صحیح و کامل این سلولها را اعلام کند. از سوی دیگر، سلول‌های جداسازی نشده در گروه شاهد باعث بازگرداندن لوکمی به این موشها شدند (۵۵).

در تلاش برای جداسازی سلول‌های سرطانی در انسان، Geens در سال ۲۰۰۷، با وجود استفاده از FACS برای سلول‌های HLA,A^-,B^-,C^-، نتوانست به کیفیت مناسبی از جداسازی برای یک پیوند مطمئن برسد (٥٦).

کشت سلول‌های SSC: با توجه به دشواری‌های جداسازی

1- Fluorescen+ Antibody Cell Sorting
2- Magnetic Antibody Cell Sorting

Downloaded from http://www.jri.ir

سلولها و نیز نیاز به مقادیر کافی سلول برای پیوند، کشت آنها در محیط in vitro یک مقولهٔ الزامی است. اولین پژوهشها برای کشت این سلولها به همراه سلولهای سرتولی در محیط کشت به نتیجه رسید.

در ۱۹۹۹، Dirami از محیط کشت KSOM برای سلولهای *SSC* موش استفاده کرد و در عرض ۳ روز به بقای ۵۰ درصدی این سلولها رسید.در این روش کشت سلولهای پیکری از سلولهای زایا بر مبنای تفاوت در زمان اتصال آنها به ظرف کشت، جداسازی افتراقی[1] شدند (۵۷). Nagano در ۱۹۹۸، توانست سلولهای *SSC* موش را ۱۳۲ روز در محیط کشت نگهداری و در آخر پیوند کند. محیط کشت او حاوی STO[2] به عنوان سلول تغذیه کننده بود (۴۲). فاکتورهای رشد مختلفی برای کشت سلولهای زایا استفاه شدند که به تدریج کارآیی آنها تأیید یا رد شده است EGF, bFGF, LIF, GDNF مهمترین فاکتورهای رشد کارآمد برای کشت هستند. GDNF به عنوان یکی از مهمترین فاکتورهای رشد مؤثر بر سلولهای *SSC*، با اتصال به گیرندهٔ خود GFRα1، در همانندسازی این سلولها نقش خود را ایفا میکند (۵۸،۵۹). حدود ده سال کشت سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی براستفاده از سلولهای تغذیه کننده[3] مانند STO و MEF[4] مبتنی بود. اما در فاصله سالهای ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ بستر پوشانده شده از لامینین که یک پروتئین داربست سلولی است جایگزین سلولهای تغذیه کننده شد، به طوریکه امکان تکثیر این سلولها تا چند هزار برابر را نیز افزایش داد (۶۰).

کشت بسیار موفق SSCs موش با تغییر محیطهای کشت پایه از DMEM یا αMEM به محیط کشت غنیتر STEM PRO- 34 (که نخستین بار به عنوان محیط کشت مناسب برای سلولهای بنیادی خونساز به بازار آمد) با استفاده از حداقل سرم در محیط ترکیبی (SFM)[5] در کنار ایجاد زیست ساختار لامینین در سال ۲۰۰۵ توسط Shinohara (۶۱) مقدمهای شد که دکتر صدری اردکانی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ موفق به تکثیر ۱۸۰۰۰ برابری سلولهای *SSC* انسانی با استفاده از SFM گردند (۶۲).

در سال بعد گروهی از محققین کرهای توانستند سلولهای *SSC* را از نمونههای بیوپسی بیضه افراد آزوسپرم علیرغم اختلال در تولید اسپرم از آنها جداسازی و کشت کنند (۶۳).

پیوند نهایی سلولها: پیوند نهایی سلولها به بافت مورد نظر در موش به صورت بازگشتی از مجرای دفران صورت میگیرد اما با توجه به طول بیشتر آن در موجودات بزرگتر و نیز احتمال پر شدن لولههای منی ساز و کاهش سلولهای سرتولی، تزریق محلول حاوی سلولهای *SSC* به محل Rete testis از طریق سونوگرافی، جایگزین روش قبلی در جانداران بزرگتر از نشخوارکنندگان تا پریماتها شده است. در پژوهشهای ذکر شده در مورد پیوند سلولهای *SSC* در جوندگان و نشخوار کنندگاند و پریماتها با توجه به امکان تکثیر بالای این سلولها در محیط آزمایشگاهی، پیوند الوگرافت این سلولها در بسیاری موارد با موفقیت همراه بوده و گاه تا تولید نسل بعد این جانوران همراه بوده است. با توجه به مسائل اخلاقی مداخله در بیولوژی انسانی، پیوند سلولهای کشت شده انسانی هنوز در مرحله زنوگرافت به موش است و در غالب موارد ردیابی بیان ژنهای انسانی اختصاصی *SSC* و سلولهای زایا مانند PLZF، VASA و UCHL1 در سلولهای موشی پس از پیوند سلولهای کشت یافته اسپرماتوگونی با موفقیت همراه بوده است و افق روشنی را در مسیر حفظ باروری از طریق کشت و جداسازی سلولهای SSCs پس از جداسازی سلولهای سرطانی ایجاد گشوده است.

نکتههای ایمنی و اخلاقی: در پایان ذکر چند نکته ضروری به نظر میرسد:

Zeng در ۲۰۰۶ اسپرماتوژنز خوک را بعد از انجام پیوند سلولهای منجمد بررسی کرده و نشانهای از آسیب ژنی یا اختلال کروموزمی در روند اسپرماتوژنز گزارش نکرد (۳۵،۳۶)؛ ولی با این حال، باید مسئله فوق را در موجودات عالیتر و در نهایت، انسان نیز بررسی کرد. همچنین، سلامت فرزندان ناشی از اسپرماتوژنز با روش پیوند نیاز به تأیید

1- Differential culture
2- SIM mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant
3- Feeder
4- Mouse embryonic fibroblasts
5- Serum free media

Downloaded from http://www.jri.ir

دارند تا استفادهٔ درمانی از پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی در نهایت تضمین ایمنی و سلامت داشته باشد.

برای تأمین امنیت کامل پیوند، بررسی عوارض مداخلهٔ جراحی در بیضه نیز نکته‌ای قابل تأمل است که باید به آن پرداخته شود و با توجه به عوارض آن، زمان بهینه برای اخذ نمونه و نیز پیوند پس از درمان سرطان تعیین گردد (٤٨).

به عنوان آخرین نکته، اینکه در هنگام نمونه‌برداری و تصمیم برای حفظ باروری کودکان مبتلا به سرطان، تصمیم گیرندهٔ نهایی والدین این کودکان هستند، در حالی که نظر کودک، به عنوان فرد اصلی تصمیم گیرنده در روند باروری، محاسبه نمی‌گردد و این می‌تواند ملاحظات اخلاقی داشته باشد (٦٤).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده در پستانداران غیر از انسان و نیز با پیشرفت‌های اخیر در زمینه کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در انسان، به نظر می‌رسد در صورت اطمینان از سلامت زیستی و اخلاقی روش‌های فوق، کشت و جداسازی این سلولها پیش از درمان سرطان و پیوند آنها پس از درمان قطعی می‌تواند روش مناسبی برای حفظ باروری کودکان سرطانی که فاقد اسپرم یا بافت بالغ تولید مثلی هستند باشد. از آنجاییکه حفظ باروری بدین روش این مزیت را به همراه دارد که باروری حاصله، فارغ از روش‌های مصنوعی تولید مثلی است و فرد به روند عادی تولید مثلی بر می‌گردد، در صورت بالا بودن درصد موفقیت آن، می‌تواند در مورد مردان بالغ نیز به کار برده شود تا نیازی به روش‌های لقاح مصنوعی در آزمایشگاه نباشد.

تشکر و قدردانی

در پایان از سرکار خانم معصومه اخلاق پسند که زحمت تایپ این مقاله را متقبل شدند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Robey PG. Stem cells near the century mark. J Clin Invest. 2000;105(11):1489-91.
2. Cowen C, Melton D. Stemness: Definitions, Criteria, and Standards. In: Lanza RP, Hogan B, Melton D, Pedersen R, editors. Essentials of stem cell biology. Burlington: Elsevier Academic Press; 2006.
3. Simorangkir DR, Marshall GR, Ehmcke J, Schlatt S, Plant TM. Prepubertal expansion of dark and pale type A spermatogonia in the rhesus monkey (Macaca mulatta) results from proliferation during infantile and juvenile development in a relatively gonadotropin independent manner. Biol Reprod. 2005;73(6):1109-15.
4. van Alphen MM, van de Kant HJ, de Rooij DG. Repopulation of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. Radiat Res. 1988; 113(3):487-500.
5. Dettin L, Ravindranath N, Hofmann MC, Dym M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. Biol Reprod. 2003;69(5):1565-71.
6. Wistuba J, Schrod A, Greve B, Hodges JK, Aslam H, Weinbauer GF, et al. Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system. Biol Reprod. 2003;69(2):582-91.
7. Johnson L, Staub C, Neaves WB, Yanagimachi R. Live human germ cells in the context of their spermatogenic stages. Hum Reprod. 2001;16(8):1575-82.
8. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. Hum Reprod Update. 2006;12(3):275-82.
9. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. Lancet. 1993;342(8875): 864.
10. Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. Lancet. 2002; 360(9330):361-7.
11. de Rooij DG, van de Kant HJ, Dol R, Wagemaker G, van Buul PP, van Duijn-Goedhart A, et al. Long-term effects of irradiation before adulthood on reproductive function in the male rhesus monkey. Biol Reprod. 2002;66(2):486-94.
12. Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. J Natl Cancer Inst Monogr. 2005;(34):12-7.
13. Shalet SM, Tsatsoulis A, Whitehead E, Read G. Vulnerability of the human Leydig cell to radiation

Downloaded from http://www.jri.ir

damage is dependent upon age. J Endocrinol. 1989; 120(1):161-5.

14. Sabanegh ES Jr, Ragheb AM. Male fertility after cancer. Urology. 2009;73(2):225-31.
15. Hudson MM. Survivors of childhood cancer: coming of age. Hematol Oncol Clin North Am. 2008; 22(2):211-31.
16. Heindel JJ. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of reproductive disease and dysfunction. Semin Reprod Med. 2006;24(3):168-77.
17. Lawson CC, Schnorr TM, Daston GP, Grajewski B, Marcus M, McDiarmid M, et al. An occupational reproductive research agenda for the third millennium. Environ Health Perspect. 2003;111(4): 584-92.
18. Rivkees SA, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. JAMA. 1988;259(14):2123-5.
19. Meistrich ML, Wilson G, Huhtaniemi I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis. Cancer Res. 1999;59(15): 3557-60.
20. Jafarian A, Akhondi MA, Pezhhan N, Sadeghi MR, Zarnani AH, Salehkhou Sh, et al. Stimulatory effects of Estradiol and FSH on the restoration of spermatogenesis in azoospermic mice. J Reprod Infertil. 2009;9(4):317-25.
21. Akbarzadeh Najar R, Akhondi MA, Parivar K, Jeddi-Tehrani M, Sadeghi MR, Djavadi E, et al. The effects of Human Chorionic Gonadotropin on germ cell maturation and testosterone secretion in neonatal mouse testis. J Reprod Infertil. 2006;7(3): 209-17.
22. Revel A, Revel-Vilk S. Pediatric fertility preservation: is it time to offer testicular tissue cryopreservation? Mol Cell Endocrinol. 2008;282(1-2): 143-9.
23. van Casteren NJ, van Santbrink EJ, van Inzen W, Romijn JC, Dohle GR. Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. Fertil Steril. 2008;90(6):2245-50.
24. Lansac J, Royere D. Follow-up studies of children born after frozen sperm donation. Hum Reprod Update. 2001;7(1):33-7.
25. 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.
26. Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rübben H, Dhir R, et al. Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. Hum Reprod. 2006;21(2):384-9.
27. Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. Mol Reprod Dev. 2003;64(4):422-8.
28. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod. 2002;66(1): 21-8.
29. 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.
30. Schrader M, Muller M, Straub B, Miller K. Testicular sperm extraction in azoospermic patients with gonadal germ cell tumors prior to chemotherapy--a new therapy option. Asian J Androl. 2002;4(1):9-15.
31. 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.
32. 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 cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. Hum Reprod. 2007;22(6):1603-11.
33. Luetjens CM, Stukenborg JB, Nieschlag E, Simoni M, Wistuba J. Complete spermatogenesis in orthotopic but not in ectopic transplants of autologously grafted marmoset testicular tissue. Endocrinology. 2008;149(4):1736-47.
34. Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, et al. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. Hum Reprod Update. 2005;11(3):229-59.
35. Zeng W, Avelar GF, Rathi R, Franca LR, Dobrinski I. The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. J Androl. 2006;27(4):527-33.
36. Zeng W, Rathi R, Pan H, Dobrinski I. Comparison of global gene expression between porcine testis tissue xenografts and porcine testis in situ. Mol Reprod Dev. 2007;74(6):674-9.

Downloaded from http://www.jri.ir

37. Fujita K, Tsujimura A, Hirai T, Ohta H, Matsuoka Y, Miyagawa Y, et al. Effect of human leukemia cells in testicular tissues grafted into immunodeficient mice. Int J Urol. 2008;15(8):733-8.

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

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

40. Akbarzadeh Najar R, Jeddi-Tehrani M, Sadeghi MR, Zarnani AH, Salehkhou SH, Hoseinzadeh F, et al. Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Mice. Tehran Univ Med J. 2008;65(Suppl 3):1-10.

41. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. Nat Med. 1996;2(6):693-6.

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

43. 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.

44. Dobrinski I. Transplantation of germ line stem cells for the study and manipulation of spermatogenesis. Ernst Schering Res Found Workshop. 2006;(60):175-93.

45. Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. Stem Cells. 2007;25(9):2330-8.

46. Radford J. Restoration of fertility after treatment for cancer. Horm Res. 2003;59 Suppl 1:21-3.

47. Geens M, Goossens E, De Block G, Ning L, Van Saen D, Tournaye H. Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application. Hum Reprod Update. 2008;14(2):121-30.

48. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. Hum Reprod Update. 2001; 7(4):378-83.

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

50. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, et al. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. Development. 1991;113(2):689-99.

51. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res C Embryo Today. 2009;87(1):27-34.

52. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(11): 6487-92.

53. von Schönfeldt 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.

54. Jahnukainen K, Hou M, Petersen C, Setchell B, Söder O. Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. Cancer Res. 2001;61(2):706-10.

55. Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, et al. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. J Clin Invest. 2005;115(7):1855-61.

56. 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.

57. 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.

58. 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.

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

60. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biol Reprod. 2003;69(2):612-6.

Downloaded from http://www.jri.ir

61. Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. Biol Reprod. 2005;72(4): 985-91.

62. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA. 2009;302(19):2127-34.

63. Lim JJ, Sung SY, Kim HJ, Song SH, Hong JY, Yoon TK, et al. Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. Cell Prolif. 2010;43(4):405-17.

64. Bahadur G. Ethics of testicular stem cell medicine. Hum Reprod. 2004;19(12):2702-10.

Downloaded from http://www.jri.ir