

تأثیر فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها در تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی بافت بیضه رت بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی

مهناز نسیمی^۱، اسماعیل فتاحی^{۱*}، سید غلامعلی جورسرای^۲، مریم غلامی تبار طبری^۳، ابراهیم ذبیحی نیشابوری^۴

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد آیت‌الله امینی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

۳- گروه مامایی، مرکز تحقیقات باروری بهداشت، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۴- گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

*مسئول مکاتبات: esmail_fattahy@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۵

چکیده

رتینوئیدها و فاکتور سلول بنیادی نقش مهمی در تکثیر، بقا و تمایز سلول‌های بنیادی به اسپرم ایفا می‌کنند. لذا در این مطالعه اثر فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه رت بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی با استفاده از سیستم کشت بافت مورد ارزیابی قرار گرفته است. قطعات بافت بیضه در محیط کشت مکمل با رتینوئیدها یا فاکتور سلول بنیادی و یا ترکیبی از هر دو در شرایط دمای ۳۴/۵ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۲۵، ۳۰ و ۳۵ روز کشت داده شدند. سپس مقاطع بافتی تهیه شده در زمان‌های مذکور به وسیله رنگ‌آمیزی پاس و هماتوکسیلین مورد ارزیابی مورفولوژیکی قرار گرفتند. شمارش سلولی در واحد سطح با استفاده از نرم‌افزار ImageJ و تجزیه و تحلیل آماری، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه، ANOVA و آزمون تعقیبی توکی انجام شد. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و لایدیگ در روز ۲۵، ۳۰ و ۳۵ کشت و همچنین تعداد سلول اسپرماتید گرد و دراز در روز ۳۵ کشت در بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی در مقایسه با گروه‌های تجربی و کنترل افزایش معنی‌دار داشتند ($p < 0/001$). بررسی هیستولوژیک بافت بیضه در شرایط مختلف کشت، تغییرات پاتولوژیک را در سلول‌های سازنده اپی‌تلیوم نشان داد. رتینوئیدها در روز ۳۵ کشت در مقایسه با فاکتورهای دیگر در حفظ و تکثیر رده‌های سلولی فرایند اسپرماتوزن نقش مؤثرتری داشتند. از آنجائیکه این فاکتورها به تنهایی عامل القا تکثیر و تمایز نیستند، بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت جهت دستیابی به اسپرم بالغ پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: رتینوئیدها، فاکتور سلول بنیادی، کشت بافت، آزواسپرمی انسدادی، رت.

مقدمه

و حدود ۵۰ درصد از آن‌ها به علت فاکتورهای مردانه است (۲۵). یکی از علت‌های ناباروری در مردان آزواسپرمی (فاقد اسپرماتوزوئید در مایع منی) است که حدود ۶/۱ تا ۱۳/۶ درصد موارد ناباروری در مردان و حدود ۱ درصد از جمعیت مردان را تشکیل می‌دهد

ناباروری یک معضل بهداشتی و اجتماعی است که می‌تواند مسائل عدیده‌ای را برای جوامع بشری ایجاد کند. در سالیان اخیر میزان شیوع ناباروری رو به افزایش بوده و بر طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوجین نابارور می‌باشند



در پستانداران، شروع میوز عمدتاً توسط تولید، ذخیره سازی، و متابولیسم رتینول و متابولیت آن رتینوئیک اسید تنظیم می‌شود (۴۰). ویتامین A به صورت رتینول یا رتینوئیک اسید برای باروری و اسپرماتوزن طبیعی مورد نیاز است. رتینوئیک اسید رشد و نمو سلول زایا را تنظیم می‌کند (۱۵). همچنین اثرات مطلوبی از مصرف همزمان رتینول و رتینوئیک اسید در تمایز سلول های زایا و حفظ تکثیر سلولی داخل لوله‌ای سلولهای بنیادی اسپرماتوزنیک در سیستم کشت اندام گزارش شده است (۳۸).

مطالعات اسپرماتوزن آزمایشگاهی (IVS) به فاکتورهای زیادی از جمله: pH، دما، تماس سلول-سلول، سطح اکسیژن، روش کشت، ترکیب محیط کشت و حضور و یا عدم وجود سرم، هورمون‌ها و برخی از فاکتورهای رشد بستگی دارد (۱۶، ۳۶).

IVS به سه روش کشت سلولی دو بعدی، کشت سه بعدی و کشت اندام قابل انجام است. تکنیک کشت اندام به علت حفظ آرایش فضایی سلول‌های بیضه‌ای در *in vitro* و حفظ تعامل مورفولوژیکی بین سلول-های داخل لوله و قسمت بینابینی همانند *in vivo* و عدم نیاز به هضم آنزیمی از میان روش‌های دیگر شرایط مطلوبتری را برای اسپرماتوزن در شرایط آزمایشگاه فراهم می‌آورد (۲۷).

در این زمینه تلاش‌های زیادی در دهه ۱۹۶۰، توسط استینبرگرها انجام شد، آن‌ها به منظور بقای طولانی مدت بیضه در سیستم کشت اندام چندین اقدام مهم انجام دادند اما پیشرفت اسپرماتوزن فقط تا مرحله پاک‌تن میوز گزارش داده شد و پس از آن توقف میوزی صورت می‌گرفت (۳۵، ۳۷). در سال ۲۰۱۰ برای اولین بار امکان تمایز اسپرماتوگونی در بیضه موش تراریخته نوزاد به اسپرم عملکردی در شرایط *in vitro* روی ستون‌های آگارز و شرایط دمایی ۳۴ درجه و ۱۰ درصد اکسیژن نشان داده شد (۱۱).

(۳). محققین در تقسیم‌بندی آواسپرمی و عوامل ایجاد کننده آن اختلاف نظر دارند ولی آواسپرمی دو علت کلی دارد. در یک گروه از افراد اسپرماتوزوئید تولید می‌شود ولی راه‌های تخلیه اسپرماتوزوئید به صورت مادرزادی یا اکتسابی مسدود است که آواسپرمی انسدادی گفته می‌شود و دسته دیگر افرادی هستند که بیضه قادر به تولید اسپرم نیست و این افراد دچار آواسپرمی غیرانسدادی می‌شوند (۳۳).

امروزه بر اساس عامل وقوع آواسپرمی روش‌های متفاوتی برای درمان این بیماری استفاده می‌شود که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از سلول‌های بنیادی اشاره نمود. اگرچه روش‌های کمک باروری جراحی PESA، M-TESE و ICSI به بیماران آواسپرمی انسدادی کمک می‌کند (۹، ۱۸)، اما دستیابی به سلول زایای هاپلوئید بالغ از طریق القای تمایز سلول‌های زایای دیپلوئید در افراد آواسپرمی می‌تواند کمک کننده و امیدبخش باشد (۱۷).

در روند اسپرماتوزن سلول‌های سرتولی در واکنش مستقیم با سلول‌های اسپرماتوگونی از طریق تولید فاکتورهای ضروری نظیر فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیک اسید باعث پیشبرد تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شوند. بنابراین، سلول‌های سرتولی برای بقای سلول‌های بنیادی ضروری هستند و شرایط محیطی مطلوب مورد نیاز برای حفظ سلول جهت انجام اسپرماتوزن در *in vivo* و یا *in vitro* را فراهم می‌کنند (۱۳). فاکتور سلول بنیادی به عنوان لیگاند گیرنده c-Kit و یک فاکتور رشد پپتیدی/سیتوکین با دامنه فعالیت گسترده در مهاجرت، چسبندگی، تکثیر، تمایز و بقای سلول‌های مختلف به ویژه در سلول‌های زایای اولیه و اسپرماتوگونی در طی تکوین بیضه می‌باشد (۵). مطالعات نشان می‌دهد که جهش در بیان فاکتور سلول بنیادی و گیرنده c-Kit موجب اختلال در اسپرماتوزن و نازایی خواهد شد (۱۲).

ناحیه شکم، با ایجاد برش عرضی ۱ سانتی‌متری در ناحیه شکم و در خط وسط به خروج بیضه‌ها اقدام - شد. پس از نمایان شدن مجرای دفران با کمک پنس استریل آن را به شکل U کشیده و دو سر مجرای دفران را با نخ بخیه قابل جذب مسدود کرده سپس به قطع قسمت وسط مجرای دفران به اندازه ۱ سانتی‌متر با حفظ عروق مربوط به بیضه اقدام شد. سپس با بازگرداندن بیضه به داخل حفره شکم، لایه زیر پوست و پوست به صورت جداگانه بخیه شد (۲۰).

موش‌ها بعد از پایان جراحی، در وضعیت ریکاوری قرار گرفته و سپس داخل قفس‌های انفرادی و تحت شرایط بهینه نگهداری شدند. نمونه‌گیری از بافت بیضه موش‌ها یک ماه بعد از انجام وازکتومی در سن بلوغ موش‌ها انجام شد.

محیط کشت بافت: شامل: ۱- MEM α (گیبکو، آمریکا) مکمل با KSR (v/v) ۱۰٪ (گیبکو، آمریکا) + ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (v/v) (گیبکو، آمریکا)، ۲- MEM α مکمل با KSR ۱۰٪ (v/v) ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (v/v) + ۱۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور سلول بنیادی (فاکتور سلول بنیادی-نوترکیب موش صحرایی، پروتک)، ۳- MEM α مکمل با KSR ۱۰٪ (v/v) + ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (v/v) + ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید (سیگما آلد ریچ) + ۱۰ میکرومولار رتینول (سیگما آلد ریچ) و ۴- MEM α مکمل با KSR ۱۰٪ (v/v) + ۱٪ پنی‌سیلین/استرپتومایسین (v/v) + ۱۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF + ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید + ۱۰ میکرومولار رتینول.

گروه‌های مورد مطالعه: در این مطالعه تجربی، چهار گروه زیر بررسی شد:

۱- گروه کنترل: بافت بیضه بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی کشت داده شده در محیط کشت پایه شامل (MEM α + KSR ۱۰٪ + Pen/strep ۱٪)

به دنبال گزارشات موفقیت‌آمیز IVS با روش کشت اندام در مدل‌های موش و موش صحرایی نوزاد (۲۸، ۳۱) و معرفی محیط کشت مؤثر MEM α و دمای ۳۴/۵ درجه سانتی‌گراد در کشت بافت بیضه (۱۱، ۲۸، ۳۱) و حذف FBS از محیط کشت به دلیل کاهش تکثیر سلول بنیادی اسپرم‌ساز و جانشمینی آن با KSR (۱۹، ۳۱) و به کارگیری برخی فاکتورهای رشد، از جمله فاکتور سلول بنیادی (SCF) با غلظت ۱۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر جهت تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در *in vitro* (۲۳، ۱۷، ۴۱) و بهبود روند اسپرماتوژنز (۱۳)، در تحقیق حاضر تلاش شد تأثیر محیط کشت (KSR + ۱۰٪ MEM α) و محیط کشت مکمل با فاکتور سلول بنیادی، رتینوئیدها و یا ترکیبی از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و تمایز سلول‌های زایای موش صحرایی بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی، ۲۰ سر موش سفید صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۲۷-۳۰ روز و وزن 55 ± 5 گرم از مرکز آزمایشگاهی دامی، دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه گردید. موش‌ها تحت شرایط بهینه در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی-تاریکی (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند.

ایجاد مدل آزواسپرمی انسدادی در موش صحرایی آزمایشگاهی نابالغ: موش‌های گروه تجربی یک ماه بعد از تولد جهت انجام وازکتومی با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، وردن، هلند) و زایلزین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، وردن، هلند) بیهوش شدند. پس از مو زدایی و شستشوی پوست



شکل ستون و به قطر حدود ۷ میلی‌متر و ارتفاع ۵ میلی‌متر برش داده شدند (۲۸). داخل هر ول از پلیت شش خانه‌ای سه تا چهار عدد ستون و روی هر ستون ۱ قطعه بافت بیضه بارگذاری شد. قبل از شروع کشت بافت بیضه، ژل‌ها جهت انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مناسب آزمایش غوطه‌ور شدند (۴۲). پس از تعویض محیط کشت، نمونه‌ها بر سطح ستون‌ها (بدون پوشاندن قطعات بافت بیضه با محیط کشت) بارگذاری شدند (۲۸، ۴۲).

کشت بافت بیضه: ابتدا بافت بیضه با بافر فسفات سالین (PBS) و محیط کشت MEM α + ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین شستشو داده شد، سپس کپسول‌زدایی از بافت بیضه در محیط کشت جدید بر روی یخ و زیر هود لامینار انجام گرفت. بافت بیضه به کمک پنس استریل به قطعات کوچک ($\approx 1 \text{ mm}^3$) برش زده شد (۲۸).

نمونه‌های بافت بیضه در *in vitro* و در دمای 37°C با $3\frac{4}{5}$ با سطح CO_2 ۵ درصد به مدت ۲۵، ۳۰ و ۳۵ روز در محیط کشت پایه، محیط کشت پایه مکمل شده با ۱۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور سلول بنیادی، محیط کشت پایه مکمل شده با ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید و ۱۰ میکرومولار رتینول و همچنین محیط کشت پایه مکمل شده با ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید و ۱۰ میکرومولار رتینول و ۱۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور سلول بنیادی کشت داده شدند. تعویض محیط کشت یک بار در هفته صورت گرفت. سپس نمونه‌های کشت داده شده پس از طی زمان‌های تعیین شده جهت بررسی مورفولوژیکی و بافتی آماده شدند. رنگ‌آمیزی برش‌های تهیه شده با کیت پاس و با توجه به پروتکل سازنده صورت گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تعداد سلول‌ها در واحد سطح با توجه به ویژگی‌های

۲- گروه تجربی ۱: بافت بیضه بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی کشت داده شده در محیط کشت پایه مکمل با ۱۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور سلول بنیادی (MEM α + KSR + ۱۰% Pen/strep + ۱% SCF).

۳- گروه تجربی ۲: بافت بیضه بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی کشت داده شده در محیط کشت پایه مکمل با ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید + ۱۰ میکرومولار رتینول (MEM α + KSR + ۱۰% Pen/strep + ۱% RA + RE)

۴- گروه تجربی ۳: بافت بیضه بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی کشت داده شده در محیط کشت پایه مکمل با ۱۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور سلول بنیادی + ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید + ۱۰ میکرومولار رتینول (MEM α + KSR + ۱۰% Pen/strep + ۱% RA + SCF + RE)

هر چهار گروه جهت بررسی مورفولوژیکی رده‌های مختلف سلولی فرایند اسپرماتوزن به مدت ۲۵، ۳۰ و ۳۵ روز کشت داده شدند. همچنین گروه‌های مورد مطالعه از نظر مورفولوژیکی با بافت‌های بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی در شرایط *in vivo* مورد مقایسه قرار گرفتند.

آماده‌سازی ژل آگارز: ۰/۷ گرم آگارز (آگارز، لونزا، سوئیس) و ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر تزریقی داخل فلاسک ۲۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد، با تکان دادن محتویات داخل فلاسک سوسپانسیون آگارز ایجاد شد. بعد از اتوکلاو (۲ اتمسفر، ۲۰ دقیقه، 121°C) محلول آگارز با غلظت ۷/۰٪ (W/V) توسط محیط کشت MEM α + KSR + ۱۰% + ۱% پنی-سیلین/استرپتومایسین به نسبت ۱:۱ رسانده شد و آگارز با غلظت نهایی ۰/۳۵(w/v) درصد بدست آمد. ۳۳ میلی‌لیتر از محلول آگارز در پتری‌دیش ۱۰ سانت ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا ژل آگارز بسته شد. ژل‌ها با تیغ بیستوری به

و مقایسه میانگین بین گروه‌ها با استفاده از تست توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار و اختلاف معنی‌داری در $p < 0/05$ نشان داده شده است.

مورفولوژیکی و موقعیت قرارگیری در داخل لوله منی-ساز و در بافت بینابینی مورد بررسی قرار گرفت (۲۹).
آنالیزهای آماری: داده‌های حاصل از شمارش تعداد سلول‌های زایا و سوماتیک توسط نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA



شکل ۱- وازکتومی موش صحرائی نر

نتایج

مقایسه تاثیر فاکتور سلول بنیادی، رتینوئیدها و ترکیبی از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و بقا رده‌های مختلف سلولی در فرآیند اسپرماتوزن در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و گروه کنترل و همچنین مقایسه میانگین تعداد سلول‌ها در این گروه‌ها با بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی نشان داده شده است. در روز ۳۵ کشت، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید دراز و لایدیگ در بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($p < 0/001$). ولی برخلاف روزهای ۲۵ و ۳۰ کشت، بین تعداد سلول لایدیگ در گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ تفاوت معناداری وجود نداشت. همچنین از نظر تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد اختلاف معناداری بین بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی با گروه کنترل و تجربی ۱ وجود دارد به ترتیب ($p = 0/001$ و $p = 0/008$) (نمودار ۱). نتایج ارزیابی مورفولوژیکی به دست آمده از بررسی ضخامت غشاء لوله‌های سمینفروس با استفاده از نرم-افزار Motic و تجزیه و تحلیل آماری آن به کمک

ارزیابی مورفولوژیکی: نتایج به دست آمده از بررسی شمارش رده‌های مختلف سلولی به کمک آزمون آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که در روز ۲۵ و ۳۰ کشت تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و لایدیگ و در روز ۳۵ کشت تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید دراز و تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه‌های مورد مطالعه (کنترل، تجربی ۱، ۲ و ۳) متفاوت می‌باشند. به طوری که با استفاده از آزمون تعقیبی توکی معلوم شد که در روز ۲۵ و ۳۰ کشت تعداد این سلول‌ها در بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی در مقایسه با گروه‌های کنترل، تجربی ۱، ۲ و ۳ افزایش معنی‌دار نشان داده است ($p < 0/001$). اما در مقایسه بین گروه‌ها در روز ۲۵ و ۳۰ کشت از نظر تعداد سلول-های اسپرماتید گرد و اسپرماتید دراز تفاوت معنی-داری مشاهده نشد. همچنین در روز ۲۵ و ۳۰ کشت از نظر میانگین تعداد سلول لایدیگ در گروه تجربی ۲ افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های تجربی ۱ و ۳ وجود داشت ($p < 0/001$).



تجمعاتی از سلول‌های اسیدوفیل لیدیگ به همراه عروق و سایر سلول‌های همبندی مشهود بود (شکل ۲A).

در بررسی هیستولوژیک بافت بیضه موش در روز ۳۵ کشت در گروه‌های کنترل، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳، اسپرمتوزنز فعالی در لوله‌های سمینفروس مشاهده نشد. در داخل لوله‌ها رده‌های مختلف سلول‌های اسپرمتوزنیک به صورت پراکنده همراه سلول‌های سرتولی دیده شدند. به علاوه سلول‌های سرتولی نیز اتصال خود را با سلول‌های زایا از دست داده و به صورت بی قاعده و با هسته‌هایی نامنظم و کوچکتر از معمول مشاهده شدند. از دست رفتن آرایش رده‌های مختلف سلولی و کاهش تعداد و از بین رفتن میزان زیادی از رده‌های مختلف سلول‌های اسپرمتوزنیک در برخی مقاطع بافتی قابل مشاهده بود.

لوله‌های سمینفروس ساختمان نسبتاً غیرطبیعی و رویهم خوابیده داشتند. اپیتلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار نبود و از هم گسیختگی اپیتلیوم زایا و پراکندگی سلولی در حفره داخلی لوله‌های اسپرم ساز مشاهده شد. مجرای لوله سمینفروس به صورت مشخص دیده نشد. غشاء پایه زیر اپیتلیوم ژرمینال به صورت یک لایه هموزن و منظم قابل تشخیص نبود. همچنین در بافت بینابینی تجمعاتی از سلول‌های اسیدوفیل لیدیگ مشهود بود (شکل ۲A, B, C, D, E). الگوهای مختلف تغییرات پاتولوژیک در گروه‌های (کنترل، تجربی ۱، ۲ و ۳) در روز ۳۰ کشت در شکل ۳ نمایش داده شده است. در برخی مقاطع بافتی نمونه کشت داده شده در شرایط مختلف تحت تیمار با فاکتورهای سلول بنیادی، رتینوئیدها یا ترکیبی از هر دو فاکتور، الگوهای مختلفی از تغییرات پاتولوژیک در سلول‌های سازنده اپیتلیوم ژرمینال مشهود بود. برخی از لوله‌ها آتروفیک و خالی از هر نوع سلول اسپرمتوزنز و سرتولی بودند. افزایش ضخامت غشاء

آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آنالیز با داده‌های تکراری در جدول ۱ نشان داد که در روز ۲۵ کشت بین گروه‌های مورد بررسی اختلاف معنی داری وجود دارد و این اختلاف ناشی از افزایش ضخامت غشاء در لوله‌های سمینفروس گروه تجربی ۱ و ۳ در مقایسه با بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی است ($p = 0/07$). در روز ۳۰ و ۳۵ کشت در گروه‌های کنترل و تجربی ۱، ۲ و ۳ در غشاء افزایش ضخامت ایجاد شده ولی بین این گروه‌ها اختلاف معناداری وجود ندارد اما مقایسه این گروه‌ها با بافت آزواسپرمی انسدادی افزایش معناداری را در ضخامت غشاء نشان داده است ($P < 0/001$). همچنین در گروه تجربی ۲ آنالیز با داده‌های تکراری نشان داد که با افزایش مدت زمان کشت بر ضخامت غشاء پایه لوله‌های سمینفروس افزوده شده و این افزایش معنادار است ($p = 0/002$) (جدول ۱).

آرایش رده‌های مختلف سلولی موجود در لوله‌های سمینفروس در گروه‌های کنترل، تجربی ۱، ۲ و ۳ در روز ۳۵ کشت و مقایسه آن‌ها با بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی در محیط *in vivo* در شکل ۲ نمایش داده شده است.

در بررسی هیستولوژیک بافت بیضه موش بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی، اسپرمتوزنز در لوله‌های سمینفروس همراه با اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در داخل لوله‌ها رده‌های مختلف سلول‌های اسپرمتوزنیک در مراحل مختلف تقسیم به همراه سلول‌های سرتولی دیده شدند. لوله‌های سمینفروس دارای ساختمان و اپیتلیوم زایای نسبتاً طبیعی بودند. اپیتلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود. مجرای لوله سمینفروس به صورت کاملاً مشخص و روشن دیده شد. غشاء پایه زیر اپیتلیوم ژرمینال به صورت یک لایه هموزن و منظم به خوبی قابل تشخیص است. همچنین در بافت بینابینی

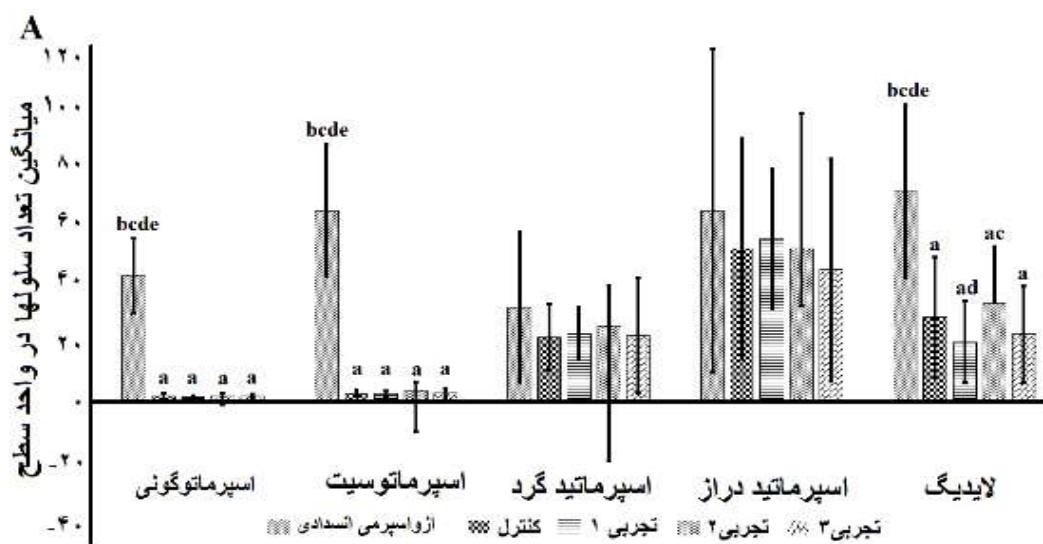
توده‌های کوچک و بزرگی از واکوئل‌ها داخل اپی‌تلیوم ژرمینال دیده می‌شد که حضور آن‌ها نشان دهنده مرگ سلولی است. در برخی از لوله‌ها اسپرماتوسیت‌های تحت تقسیم میوزی سیتوپلاسم‌های پراثرئوزینوفیلی دارند که این تغییر نیز نشان دهنده انحطاط می‌باشد (شکل ۳A, B, C, D).

پایه در بعضی از لوله‌های سمینفروس با الگوهای تغییرات از یک ضخیم‌شدگی ساده هموژن تا ضخیم‌شدگی ناهمگون و نامنظم به همراه چین خوردگی غشاء پایه و چند لایه شدن غشاء و نیز مواردی از ضخیم‌شدگی همراه با برجسته شدن به شکل گره به طرف اپی‌تلیوم ژرمینال مشاهده شد. در بعضی لوله‌ها

جدول ۱- ارزیابی مورفولوژیکی ضخامت غشاء لوله سمینفروس (بر حسب میکرومتر) در بافت بیضه موش صحرائی مدل آزواسپرمی انسدادی و بافت‌های کشت داده شده در گروه‌های مورد مطالعه

گروه/زمان	روز ۲۵ کشت	روز ۳۰ کشت	روز ۳۵ کشت	سطح معنی‌داری*
بافت بیضه	۱۰/۲۶ ± ۳/۱۴	۱۰/۲۶ ± ۳/۱۴ ^a	۱۰/۲۶ ± ۳/۱۴ ^a	
آزواسپرمی	۱۴/۲۳ ± ۶/۴۷	۱۵/۵۴ ± ۶/۷۴ ^b	۱۷/۷۶ ± ۶/۶۸ ^b	
گروه کنترل	۱۸/۸۲ ± ۱۲/۳۰	۱۸/۳۲ ± ۷/۱۳ ^b	۱۸/۲۳ ± ۸/۱۳ ^b	
گروه تجربی ۱	۱۱/۸۲ ± ۴/۲۹	۱۴/۱۷ ± ۵/۷۰ ^b	۱۷/۴۵ ± ۱۰/۱۸ ^b	$p = ۰/۰۰۲$
گروه تجربی ۲	۱۷/۴۰ ± ۶/۸۱	۱۸/۵۷ ± ۷/۶۹ ^b	۲۰/۹۷ ± ۹/۹۷ ^b	
گروه تجربی ۳				
سطح معنی‌داری**	$p = ۰/۰۰۷$	$p < ۰/۰۰۱$	$p < ۰/۰۰۱$	

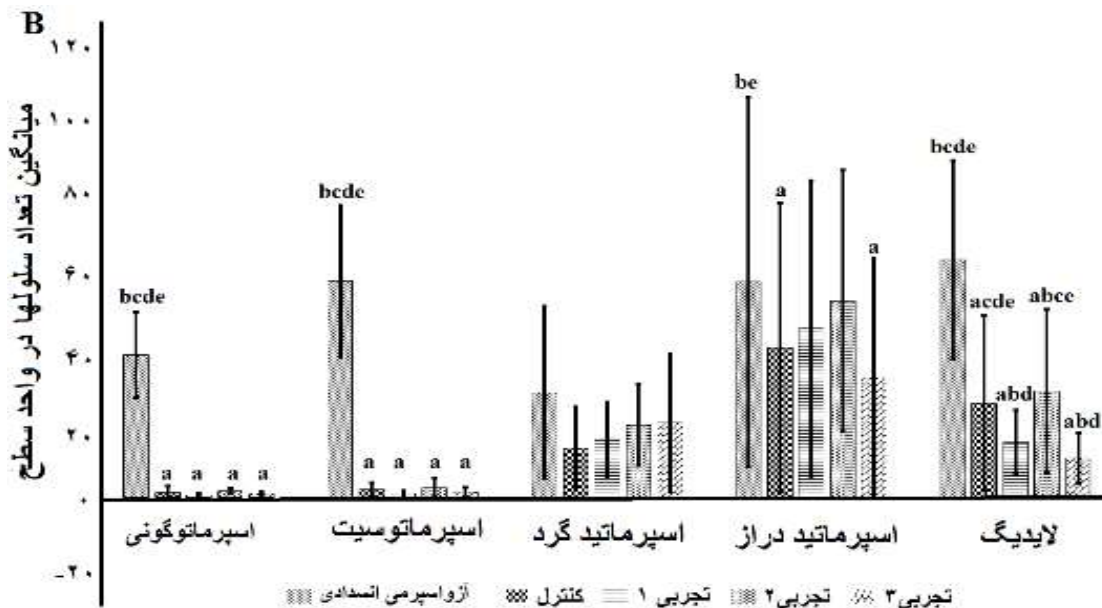
*: آنالیز واریانس با داده‌های تکراری، **: آنالیز واریانس یکطرفه. حروف‌های مشابه نشان دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



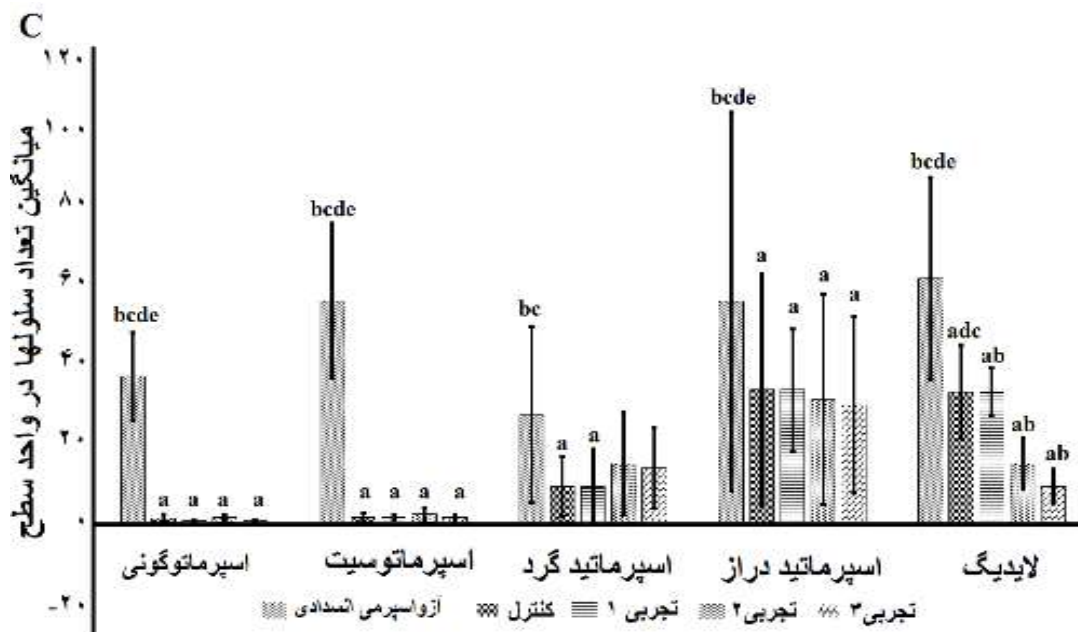
نمودار ۱- مقایسه عملکرد فاکتور سلول بنیادی، رتینوئیدها و ترکیبی از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و بقا رده‌های مختلف سلولی در فرآیند اسپرماتوژنز در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و گروه کنترل و مقایسه این گروه‌ها با بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی در روز ۲۵ کشت. a: تفاوت معنی‌داری هر یک از گروه‌ها با بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی، b:



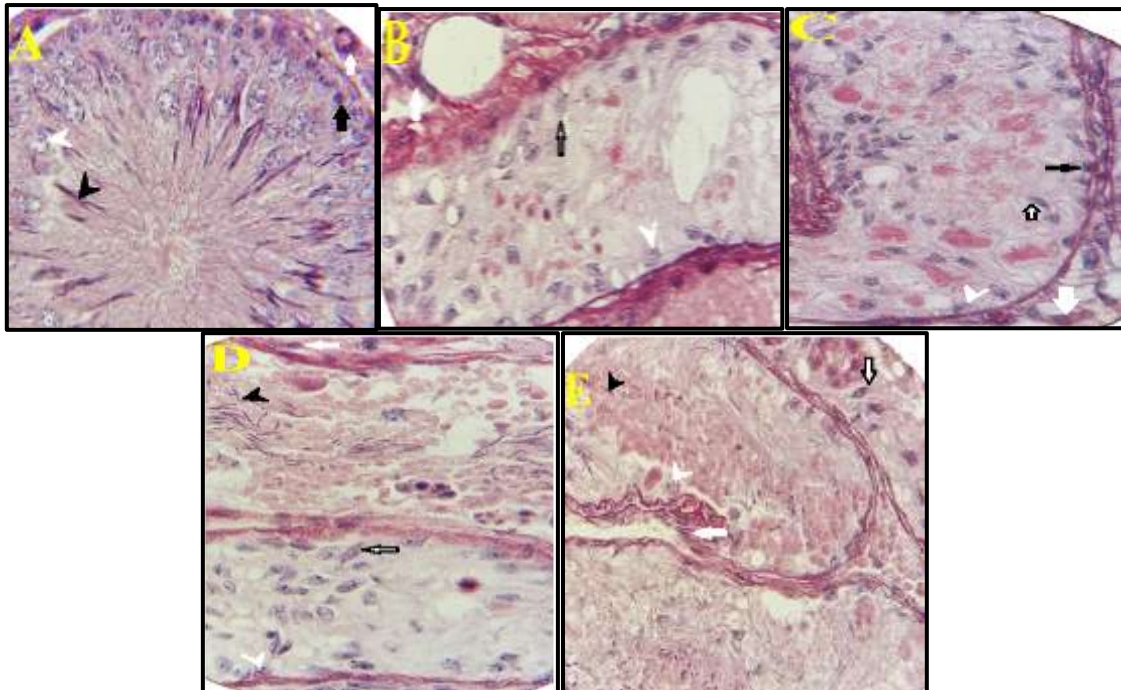
تفاوت معنی داری هر یک از گروه‌ها با گروه کنترل، c: تفاوت معنی داری هر یک از گروه‌ها با گروه تجربی ۱، d: تفاوت معنی داری هر یک از گروه‌ها با گروه تجربی ۲، e: تفاوت معنی داری هر یک از گروه‌ها با گروه تجربی ۳.



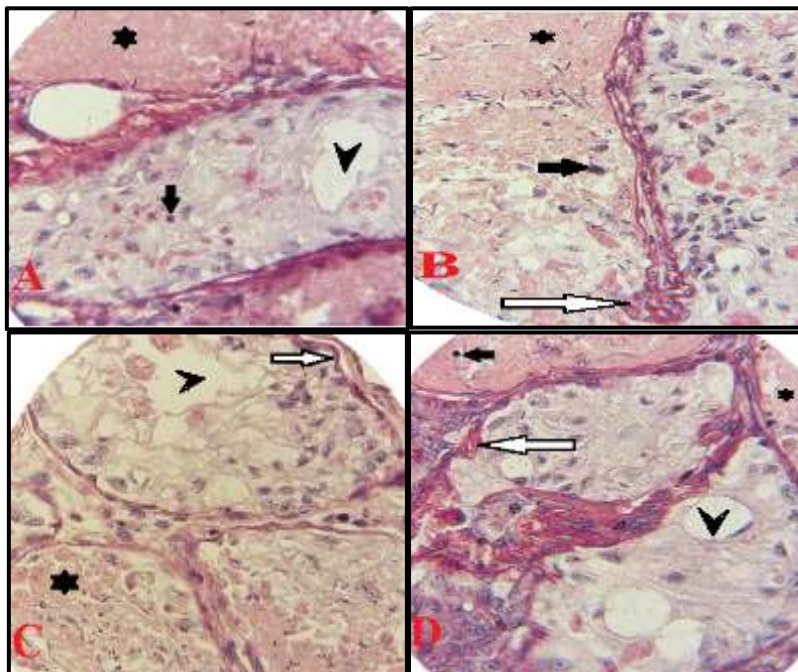
نمودار ۲- مقایسه عملکرد فاکتور سلول بنیادی، رتینوئیدها و ترکیبی از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و بقا رده‌های مختلف سلولی در فرآیند اسپرماتوزن در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و گروه کنترل و مقایسه این گروه‌ها با بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی در روز ۳۰ کشت.



نمودار ۳- مقایسه عملکرد فاکتور سلول بنیادی، رتینوئیدها و ترکیبی از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و بقا رده‌های مختلف سلولی در فرآیند اسپرماتوزن در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و گروه کنترل و مقایسه این گروه‌ها با بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی در روز ۳۵ کشت.



شکل ۲- آرایش رده‌های سلولی لوله‌های سمینفروس در گروه‌های کنترل، تجربی ۱، ۲ و ۳ در روز ۳۵ کشت و مقایسه آن‌ها با بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی در محیط *in vivo*. بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی (A)، بافت بیضه گروه‌های کنترل (B)، تجربی ۱ (C)، تجربی ۲ (D)، تجربی ۳ (E) (بزرگنمایی $\times 1000$). کاهش تعداد سلول اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت، بی‌نظمی در آرایش رده‌های سلولی لوله سمینفروس و کاهش سلول‌ها و رویهم خوابیدگی لوله‌ها در گروه‌های کنترل، تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی در شکل‌ها قابل مشاهده است. (پیکان سیاه: اسپرماتوگونی، پیکان سفید: سلول لایدیگ، نوک پیکان سفید: سلول اسپرماتوسیت، نوک پیکان سیاه: اسپرماتید دراز، پیکان سیاه و سفید: سلول سرتولی).





شکل ۳- الگوهای مختلف تغییرات پاتولوژیک در سلول‌های سازنده اپی‌تلیوم ژرمینال بافت بیضه موش در روز ۳۰ کشت. بافت بیضه گروه‌های کنترل (A)، تجربی ۱ (B)، تجربی ۲ (C)، تجربی ۳ (D) (بزرگنمایی $\times 100$). در برخی مقاطع بافتی تغییرات پاتولوژیک قابل مشاهده بود. از جمله دو لایه شدن غشاء، ضخیم شدن غشاء و ایجاد حالت گره در انتها، واکوئوله شدن داخل اپی‌تلیوم ژرمینال، هایپراثوزینوفیلی شدن اسپرماتوسیت‌ها و خالی شدن لوله سمینفروس از هر نوع سلول اسپرماتوژنیک و سرتولی. (پیکان سیاه: اسپرماتوسیت هایپراثوزینوفیل، پیکان سفید: چین خوردگی و دو لایه شدن غشاء پایه، نوک پیکان سیاه: واکوئوله شدن، ستاره سیاه: خالی شدن لوله از سلول).

بحث

در این مطالعه، از تکنیک کشت بافت برای القاء و حفظ اسپرماتوژنز در بیضه رت بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی در شرایط آزمایشگاه استفاده گردید و اثرات فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که فاکتور سلول بنیادی اگزوزن محلول می‌تواند بقا و تکثیر سلول‌های زایا را تا حدی جبران و برخی از بی‌نظمی‌های اسپرماتوژنز را بهبود بخشد (۱، ۲۶). رتینول و رتینوئیک اسید نیز شروع و حفظ اسپرماتوژنز و تمایز سلول‌های زایای موش نابالغ را در سیستم کشت اندام و همچنین تمایز سلول‌های زایای موش صحرائی نر نابالغ را در *in vivo* و *in vitro* تقویت می‌کنند (۲، ۱۰، ۱۵، ۳۸، ۳۹، ۴۳). در تحقیق حاضر فرض بر این است که این غلظت از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها شاید بتواند فشار انتشار بیشتری را از طریق لومن ایجاد کرده و اثر حفاظتی بیشتری بر اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها اعمال کند. در بررسی میکروسکوپی برخی مقاطع بافتی کشت داده شده در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و کنترل در مقایسه با بافت بیضه مدل آزواسپرمی محیط *in vivo* الگوهای مختلفی از تغییرات پاتولوژیک در سلول‌های سازنده اپی‌تلیوم ژرمینال مشهود بود. طبق یافته‌های این مطالعه، گروه‌های تجربی و کنترل مورد بررسی، در اپی‌تلیوم زایای لوله‌های منی‌ساز کاهش تعداد رده‌های مختلف سلولی

اسپرماتوژنز و در برخی موارد از بین رفتن تعداد زیادی از این سلول‌ها و یا خالی شدن برخی لوله‌ها از هر نوع سلول اسپرماتوژنز و سرتولی را نشان دادند که در کل موجب کاهش ضخامت اپی‌تلیوم منی‌ساز می‌شود. شاید بتوان کاهش سلول‌های زایای لوله سمینفروس را در گروه‌های کشت داده شده ناشی از دو مکانیسم کاهش تکثیر سلول‌های زایا و افزایش مرگ سلول‌های زایا دانست. به نظر می‌رسد علت کاهش تعداد سلول‌های زایا در گروه تجربی، تعداد کم تقسیمات میتوزی آن‌ها قبل از ایجاد اسپرماتوسیت‌ها و یا افزایش سرعت میوز اسپرماتوسیت‌ها در بافت باشد که با توجه به کاهش اسپرماتیدهای گرد در لوله‌های منی‌ساز گروه آزمایش، احتمال اول تأیید می‌شود؛ یعنی رتینوئیک اسید می‌تواند از تقسیمات میتوزی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیایی در اپی‌تلیوم منی‌ساز موش ممانعت به عمل آورد. در واقع ارتباط عملکردی بسیاری بین سلول‌های لیدیگ، سرتولی و در نهایت، بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا وجود دارد. سلول‌های لیدیگ، فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول‌های سرتولی را از طریق سنتز تستوسترون کنترل می‌کنند. هورمون تستوسترون نیز با اثر مستقیم بر روی سلول‌های سرتولی، باعث ترشح مایع لوله‌ای و پروتئین‌های متعددی نظیر فاکتورهای رشد و ترانسفرین می‌گردد، که نقش ویژه‌ای در تغذیه سلول‌های جنسی در حال تقسیم و در نهایت، تولید اسپرم

دادند (۲۴). در حالی که گزارش دیگری این تغییر غشاء پایه به انضمام چین‌خوردگی آن را به دلیل کاهش قطر لوله‌های سمینفروس معرفی کرد (۲۲). کاهش قطر لوله‌های سمینفروس و بدنبال آن تغییر در غشاء پایه در برخی مقاطع بافتی نمونه‌های کشت داده شده این تحقیق نیز با گزارشات پیشین سازگار است. حضور واکوئل‌هایی داخل اپی‌تلیوم ژرمینال در برخی مقاطع بافتی اشاره به مرگ سلولی که اغلب حاصل از بین رفتن سلول‌های ژرمینال بعلت اثرات سلول‌زایای اولیه و سرتولی می‌باشد. به نظر می‌رسد افزایش حفرات و افزایش تدریجی آن‌ها در پوشش منجر به آتروفی لوله‌ها شده است ایجاد این حفرات را همچنین می‌توان به از دست رفتن اتصالات سلول سرتولی یا مرگ آن‌ها نسبت داد. حضور اسپرماوسیت‌های تحت تقسیم میوزی سیتوپلاسم هایپرائوزینوفیلی در برخی لوله‌ها می‌تواند نشان‌دهنده انحطاط باشد. با توجه به شواهد و یافته‌های موجود، کارایی سیستم کشت اندام در تمایز، تکثیر و حفظ سلول‌زایای موش صحرائی بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی به مراتب بسیار پایین‌تر از موش صحرائی نوزاد و موش است که در مطالعات پیشین توضیح داده شد (۶، ۲۱، ۲۸، ۳۱). با کمال تعجب، مکمل‌ها تمایز سلول‌زایای نر موش صحرائی بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی را در محیط *in vitro* بهبود ندادند، که نشان می‌دهد آن‌ها تنها بازیکنان در روند فرایند تمایز و تکثیر نیستند. این نتایج با نتایج گزارش ساتو سازگار است که موفقیت گزارش شده در تولید اسپرمااید پس میوزی فقط با استفاده از محیط کشت MEM α مکمل با KSR حاصل شده بود و همچنین با نتایج گزارش شده توسط ردا که نشان دادند القا کننده‌های گلوتاماکس، ملاتونین و رتینوئیک اسید بکار گرفته شده همراه با محیط کشت MEM α مکمل با KSR تمایز سلول‌زایای نر موش صحرائی نابالغ در

برعهده دارد (۱۴). در این مطالعه سلول‌های لیدیگ در روز ۳۵ کشت در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل و بافت بیضه مدل آزواسپرمی انسدادی، به طور معنی‌داری کاهش یافت، لذا میتوان نتیجه گرفت کاهش جمعیت و یا اختلال کارکردی سلول‌های لیدیگ در پی مصرف فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها، شاید با کاهش سطح سرمی تستوسترون باعث کاهش سلول‌های سرتولی و عدم یک پارچگی اپی‌تلیوم زایا شده باشد. مطالعات در *in vitro* نشان داده است که سنتز غشاء پایه نیازمند همکاری هر دو سلول سرتولی و میوئید است و حضور ماتریکس خارج سلولی مناسب و نرمال در عملکرد صحیح سلول‌های لیدیگ، سرتولی و میوئید ضروری می‌باشد (۳۴).

در مطالعه حاضر ممکن است افزایش ضخامت غشاء پایه همراه با دیگر تغییرات پاتولوژیک منجر به کاهش انتشار مواد موجود در خون شود که برای سلول‌های زایای در حال تکامل به شدت نیاز است. این که آیا افزایش ضخامت غشاء منجر به اختلال در روند اسپرماتوزن می‌شود و یا این که اختلال در روند اسپرماتوزن عامل این تغییرات پاتولوژیک در غشاء پایه است مشخص نیست. ضخیم شدن غشاء پایه از ارتباط طبیعی بین سلول سرتولی و میوئید جلوگیری کرده و مانع از اینترکشن‌های طبیعی بین آن‌ها شده و با تشدید تغییرات سلولی در روند اسپرماتوزن اختلال ایجاد می‌کنند. یکی دیگر از عواملی که در بعضی از مطالعات علت افزایش ضخامت غشاء پایه ذکر شده رسوبات ایمنی در آن است. از جمله مطالعه سالمون و همکاران در سال ۱۹۸۲ وجود IgG و IgM را در غشاء پایه لوله‌های سمینفروس بیضه در افراد نابارور گزارش کردند (۳۰). سالمون این مورفولوژی در غشاء پایه را Delamination نام نهادند. ناکانه و پی-یرس نیز این چند لایه شدن غشاء پایه را به سنتز اضافی غشاء پایه در پاسخ به ضایعه اپی‌تلیال نسبت



نشان نداده است. با توجه به این که، شرایط کشت بافت ما به اندازه کافی شرایط موجود در *in vivo* را تقلید نکرده است، نمی‌توان پیشرفت طبیعی اسپرماتوژنز را انتظار داشت. بکارگیری موش بالغ مدل آزو اسپرمی انسدادی جهت کشت بافت برای اولین بار، می‌تواند امید دستیابی به اسپرم بالغ را در مدل انسانی ارتقا بخشد، از اینرو، تحقیقات بیشتری برای بهینه‌سازی شرایط کشت بافت بیضه بالغ در شرایط *in vitro* مورد نیاز می‌باشد.

منابع

- Allard E.K., Boekelheide K., 1996. Fate of germ cells in 2,5-hexanedione induced testicular injury. II. Atrophy persists due to a reduced stem cell mass and ongoing apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 137: 149-156.
- Arkoun B., Dumont L., Milazzo J.P., Way A., Bironneau A., Wils J., Mace B., Rives N., 2015. Retinol improves *in vitro* differentiation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells into sperm during the first wave of spermatogenesis. *Plos One*, 10(2): e0116660.
- Baker K., Sabanegh Jr E., 2013. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics*, 68(S1): 61-73.
- Bergh A., Collin O., Lissbrant E., 2001. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of reproduction*, 64(1): 13-20.
- Bokemeyer C., Kuczyk M.A., Dunn T., Serth J., Hartmann K., Jonasson J., Pietsch T., Jonas U., Schmoll H.J., 1996. Expression of stem-cell factor and its receptor *c-kit* protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122(5): 301-306.
- Dumont L., Arkoun B., Jumeau F., Milazzo J.P., Bironneau A., Liot D., Wils J., Rondanino C., Rives N., 2015.

محیط *in vitro* را بهبود نداده است (۲۸، ۳۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محیط کشت مکمل با رتینوئیدها در روز ۳۵ کشت در مقایسه با فاکتور SCF در حفظ رده‌های سلولی فرایند اسپرماتوژنز نسبت به گروه کنترل نقش مؤثرتری داشتند. این نتایج با نتایج تحقیقات قبلی در مورد اثرات مطلوب رتینوئیدها در حفظ تکثیر سلولی داخل لوله و تمایز سلول‌های زایا سازگار است (۲، ۳۸). کشت طولانی‌مدت بافت بیضه موش صحرائی بالغ مدل آزو اسپرمی انسدادی برای مدت ۲۵، ۳۰ و ۳۵ روز باعث ایجاد تغییراتی در خصوصیات بافت‌شناسی آنها شد. پشتیبانی از بافت‌های بالغ هر عضو تحت شرایط کشت چالش برانگیز است و معمولاً در برابر شرایط کشت آسیب‌پذیر هستند (۳۲). از جمله شرایط نامطلوب برای بافت بیضه بالغ، وضعیت هیپوکسیک است که با وجود افزایش غلظت اکسیژن در انکوباتور برطرف نشده است (۴، ۸).
اختلاف بین بافت‌های بیضه بالغ مدل آزو اسپرمی انسدادی و بیضه بالغ نرمال ممکن است به دلیل تغییرات دژنراتیو، از جمله فشار داخل لوله‌ای و کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز باشد. همچنین، وازکتومی و احتمالاً اختلالات گردش خون منجر به از بین رفتن برخی از سلول‌های زایا می‌شود (۷، ۲۰).

نتیجه‌گیری

رتینوئیک اسید و رتینول در مقایسه با فاکتور سلول بنیادی و ترکیبی از فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیک اسید و رتینول در روند تمایز سلولی و حفظ سلول‌ها در لوله سمینفروس پس از ۳۵ روز کشت در شرایط *in vitro* عملکرد بهتری داشته است. اما در مقایسه با بافت بیضه مدل آزو اسپرمی انسدادی که در آن از هیچ القا کننده‌ای استفاده نشد و صرفاً در محیط کشت پایه کشت داده شد، پس از ۳۵ روز کشت عملکرد خوبی

- Ceftriaxone on Histology, Histomorphometry, and Histochemistry of Testis and Sperm Characteristics in Mice. *Qom Univ Med Sci J*, 10(6): 1-12.
15. Hogarth C.A., Griswold M.D., 2013. Retinoic acid regulation of male meiosis, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 20(3): 217-223.
16. Kim K.J., Kim B.G., Kim Y.H., Lee Y.A., Kim B.J., Jung S.E., et al., 2015. In Vitro Spermatogenesis Using Bovine Testis Tissue Culture Techniques. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(5): 314-323.
17. Koruji S.M., Movahedin M., Mowla S.J., Gorabi H., Jabari Arfaei A., 2007. The Effects of Inducer Factors on Adult Mouse Spermatogonial Cells Colony Formation In Vitro. *Yakhteh Medical Journal*, 9(2): 141-150.
18. Kovac J.R., Lehmann K.J., Fischer M.A., 2014. A single-center study examining the outcomes of percutaneous epididymal sperm aspiration in the treatment of *obstructive azoospermia*. *Urol Ann*, 6: 41-45.
19. Kubota H., Avarbock M.R., Brinster R.L., 2004. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 71: 722-731.
20. Lavers Ann E., Swanlund David J., Hunter Brian A., Tran Michael L., Pryor Jon L., Roberts K.P., 2006. Acute Effect of Vasectomy on the Function of the Rat Epididymal Epithelium and Vas Deferens. *Andrology*, 27: 326-336.
21. Liu F., Cai C., Wu X., Cheng Y., Lin T., Wei G., He D., 2016. Effect of knockOut serum replacement on germ cell development of immature testis tissue culture. *Theriogenology*, 85: 193-199.
22. Martin D., 1994. Basement Membrane Regulation of Sertoli Cells. *Endocrinol Rev*, 15: 102-115.
- Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa. *Andrology*, 3: 611-625.
7. Duru F.I.O., Ajayi S., Azu O.O., 2013. The effect of unilateral vasectomy on testosterone and testicular parameters in the adult male African giant rat (*Cricetomys Gambianus*). *African Health Sciences*, 13(2): 483 - 489.
8. Farias J.G., Bustos-Obregon E., Orellana R., Bucarey J.L., Quiroz E., Reyes J.G., 2005. Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia*, 37(1): 47-52.
9. Ghieh F., Mitchell V., Mandon-Pepin B and Vialard F., 2019. Genetic defects in human azoospermia. *Basic and Clinical Andrology*, 29: 4.
10. Gholamitabar Tabari M., Jorsaraei S.G.A., Ghasemzadeh-Hasankolaei M., Ahmadi A.A., Amirikia M., 2018. Evaluation of Novel Mouse-Specific Germ Cell Gene Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cell-Like Cells In Vitro with Retinoic Acid Treatment. *Cellular reprogramming*, 20(4): 245-255.
11. Gohbara A., Katagiri K., Sato T., Kubota Y., Kagechika H., Araki Y., et al., 2010. In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system. *Biology of Reproduction*, 83: 261-267.
12. Grimaldi P., Rossi P., Dolci S., Ripamonti C.B., Geremia R., 2002. Molecular genetics of male infertility: stem cell factor/c-kit system. *Am J Reprod Immunol*, 48(1): 27-33.
13. Hai Y., Hou J., Liu Y., Liu Y., Yang H., Li Z., He Z., 2014. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 29: 66-75.
14. Hasanzadeh S., Najafi G., Pirdehghan H.R., Bonyadi F., 2016. The Effects of



32. Sato T., Katagiri K., Kojima K., Komeya M., Yao M., and Ogawa T., 2015. *In Vitro* Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS One*, 10(6): e0130171.
33. Schlegel P.N., 2004. Cause of azoospermia and their management. *Reproduction, Fertility and Development Journal*, 16: 561-572.
34. Skinner M.K., Tung P.S., Fritz I.B., 1985. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol*, 100(6): 1941-1947.
35. Steinberger A., Steinberger E., Perloff W.H., 1964. Mammalian Testes in Organ Culture. *Experimental Cell Research*, 36: 19-27.
36. Steinberger A., Article: M.J., 1975. In vitro techniques for the study of spermatogenesis. *Enzymology Journal Article*, 39: 283-296.
37. Steinberger E., Steinberger A., Perloff W.H., 1964. Initiation of spermatogenesis in vitro. *Endocrinology*, 74: 788-792.
38. Travers A., Arkoun B., Safsaf A., Milazzo J.P., Absy A., et al., 2013. Effects of vitamin A on In Vitro maturation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells. *Plos One*, 8(12): e82819.
39. Vernet N., Dennefeld C., Klopfenstein M., et al., 2008. RXR beta expression in Sertoli cells controls cholesterol homeostasis and spermiation. *Reproduction*, 136: 619-626.
40. Wang S., Wang X., Ma L., Lin X., Zhang D., et al., 2016. Retinoic Acid Is Sufficient for the In Vitro Induction of Mouse Spermatocytes. *Stem Cell Reports j*, 7: 80-94.
41. Yan W., Suominen J and Toppari J., 2000. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *Journal of Cell Science*, 113: 161-168.
23. Park T.S., Han J.Y., 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev*, 56: 475-482.
24. Pierce G.B., Nakane P.K., 1969. Basement membranes. Synthesis and deposition in response to cellular injury. *Lab Invest*, 21(1): 27-41.
25. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S., 2009. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*, 50(4): 336-347.
26. Qin Q., Liu J., Ma Y., Wang Y., Zhang F., Gao S., Dong L., 2017. Aberrant expressions of stem cell factor/c-KIT in rat testis with varicocele. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116: 542-548.
27. Reda A., Hou M., Landreh L., Kjartansdottir K.R., Svechnikov K., Soder O., Stukenborg J.B., 2014. In vitro spermatogenesis – optimal culture conditions for testicular cell survival, germ cell differentiation, and steroidogenesis in rats. *Front Endocrinol*, 5: 21.
28. Reda A., Hou M., Winton T.R., Chapin R.E., Soder O., Stukenborg J.B., 2016. In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Molecular Human Reproduction*, 22(9): 601-612.
29. Russell L.D., Ettlin R.A., Sinha Hikim A.P., Clegg E.D., 2008. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International Journal of Andrology*, 16(1): 83 - 83.
30. Salomon F., Saremaslani P., Jakob M., Hedinger C.E., 1982. Immune complex orchitis in infertile men. Immunoelectron microscopy of abnormal basement membrane structures. *Technical Methods and Pathology*, 47(6): 555-567.
31. Sato T., Katagiri K., Gohbara A., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., et al., 2011a. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471: 504-507.

43. Zhang L., Tang J., Haines C.J., Feng H., Teng X., Han Y., 2015. RA induces differentiation of multipotent P19 cells towards male germ cell. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Animals*, 51: 85-91.

42. Yokonishi T., Sato T., Katagiri K., and Ogawa T., 2013. In Vitro Spermatogenesis Using an Organ Culture Technique. *Methods in molecular biology*, 927: 479-488.

