تاثیر FSH و تستوسترون در بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد تازه و منجمد - ذوب شدهٔ موش

نسرین قربانزاده .M.Sc☆، منصوره موحدین .Ph.D☆ ♦
تقی طریحی .Ph.D☆، انوشیروان کاظم‌نژاد .M.Sc★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آمار حیاتی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** مطالعه اثر هورمونهای FSH و تستوسترون بر بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد تازه (fresh) و منجمد - ذوب شده

* **مواد و روشها:** برای این منظور سوسپانسیون سلولی از بیضه موش نژاد NMRI (با سن ۱۰-۸ هفته) تهیه شد و به دو قسمت تقسیم گردید. بخشی از سوسپانسیون سلولی جهت استفاده به صورت تازه اختصاص داده شد. بخش دوم از آن با ترکیب ضدیخ (W/V) ۱۸درصد رافینوز و (W/V) ۳درصد شیرخشک در آب مقطر، با روش انجماد سریع منجمد گردید. از این دو بخش جهت کشت سلولی بمدت ۹۶ ساعت استفاده شد و نتایج حاصل با میکروسکوپ نوری بررسی و ثبت شد. همچنین میزان درصد زنده ماندن انواع سلولهای اسپرماتید در دوره ذکر شده با رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان‌بلو ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که در نمونه‌های تازه‌ای (fresh) که در محیط کشت حاوی هورمون کشت شده بودند بعد از ۲۴ ساعت تعداد سلولهای اسپرماتید گرد کاهش یافته و بر تعداد سلولهای اسپرماتید elongating و elongated افزوده شد ولی نمونه‌های منجمد - ذوب شده‌ای که در محیط حاوی هورمون کشت شده بودند علی رغم کاهش شدید تعداد سلولهای اسپرماتید گرد بدلیل آسیب ناشی از انجماد، تعداد سلولهای اسپرماتید elongating و elongated افزایشی نشان نداده ولی تعداد آنها در ساعت اولیه کشت حفظ شد.

* **نتیجه‌گیری:** این اطلاعات نشان می‌دهد که اسپرماتیدهای گرد در محیط کشت حاوی هورمون در نمونه‌های تازه و منجمد - ذوب شده فقط در ۲۴ ساعت اولیه کشت قادر به پیشرفت بلوغی هستند.

گل‌واژگان: اسپرماتید گرد، اسپرماتید دراز، بلوغ، انجماد، موش

مقدمه

اسپرماتوژنزیس، یک پروسه سنجیده و دقیق است که در سن بلوغ آغاز شده و در سراسر زندگی تولید مثلی ادامه می‌یابد و به موجب آن سلولهای بنیادی جنسی، تقسیمات و تمایزات وسیعی را پشت سر می‌گذارند (۱، ۲) که نتیجه میوز آنها، اسپرماتیدهای هاپلوئیدی است که تغییرات و اصلاحات ساختاری و شیمیایی عمیقی در اپیدیدیم و بیضه روی آنها انجام گرفته و در نهایت به اسپرماتوزوایی با توانایی باروری، مبدل می‌شوند (۲). در اکثریت افرادی که مبتلا به تومورهای بیضه‌ای هستند آزواسپرماتوزوایی مشاهده می‌شود (۳). شیمی درمانی و رادیوترایی در درمان سرطانها و تومورهای رایج در بیضه سبب آسیب به سلولهای جنسی و در نتیجه نقص در اسپرماتوژنزیس می‌شوند (۴، ۵). در انسان نقص و توقف مراحل اسپرماتوژنز یک حالت ناامیدکننده برای زوجهایی است که آرزوی آبستن شدن دارند (۲، ۳). ICSI[1] یک تکنیک امید بخش برای درمان بیمارانی با قدرت باروری پائین می‌باشد به گونه‌ای که تولدهای زنده و طبیعی به دنبال ICSI در انسان و برخی پستانداران مشاهده شده است (۶). اخیراً تعداد کمی حاملگی بعد از ROSI[2] با منشاء بیضه‌ای گزارش شده است (۷، ۸). این بدین معناست که اسپرماتیدهای گرد نیز می‌توانند منجر به باروری طبیعی شوند و جنین‌هایی با توانایی رشدی کامل را بوجود آورند (۹). لکن میزان باروری و حاملگی‌هایی که از طریق ROSI بدست آمده، بسیار پایین‌تر از آنهایی است که از اسپرماتوزوای بالغ و اسپرماتیدهای elongated بدست آمده است (۱۰). لذا بلوغ اسپرماتید گرد و حصول اسپرماتوزوا در افراد آزواسپرمیایی که توقف اسپرماتوژنزیس دارند و یا افرادی که به تومورها و سرطانهای بیضه‌ای مبتلا بوده و برای درمان نیاز به رادیوترایی و شیمی درمانی دارند، و در عین حال در پی داشتن فرزند، با استفاده از تکنیک درمانی ICSI می‌باشند ضروری به نظر می‌رسد. اما جدای از ضرورت بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد، مواردی وجود دارد که نیاز به بلوغ سلولهای اسپرماتید در زمانی دیرتر می‌باشد. مثلاً در پسران نابالغی که دچار بیماریهای بدخیم بوده و مجبور به انجام جراحی بیضه و یا شیمی درمانی و رادیوترایی هستند (۴) و یا در مردان آزواسپرمیایی که در برنامه استخراج اسپرم بیضه‌ای و ICSI گنجانده شده‌اند ممکن است موقعیت‌هایی پیش بیاید که با یک فقدان غیر منتظره‌ای از اسپرماتوزوا و Late elongated در زمان بدست آوردن تخمک مواجه شوند. بنابراین منجمد کردن و حفظ طولانی مدت نمونه‌های بیوپسی بیضه‌ای این امکان را می‌تواند فراهم کند تا بلوغ را در محیط کشت در یک زمان دیرتری از سلولهای جرم که در نمونه‌های بیوپسی موجود است بدست آوریم (۱۱). برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ تکمیل میتوز و آغاز اسپرماتوژنزیس بوسیله انکوباسیون قطعات لوله‌ای سمی نفروزی در محیط کشت بدست آمد (۱۲). سپس در سال ۱۹۹۱ اسپرماتوژنزیس در محیط کشت با کشت همزمان کوتاه مدت از اسپرماتوسیت‌های پاکی تن و سلولهای سرتولی خالص بدست آمد (۱). در سال ۱۹۹۸ مشخص شد که سلولهای ژرمینال انسانی وقتی به صورت in vitro کشت شوند و در محیط کشت آنها FSH[3] و تستوسترون اضافه شود می‌توانند تمایزات در حین میوز و بعد از میوز را انجام دهند (۱۱). با توجه به نیازی که برای بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد و همچنین انجماد سلولهای اسپرماتید گرد قبل از به بلوغ رساندن این سلولها وجود دارد، در این تحقیق کوشش شد تا سلولهای اسپرماتید گرد ابتدا منجمد گردند، سپس در محیط کشت حاوی هورمون کشت شوند و با سلولهای اسپرماتید گردی که منجمد نشده و در محیط کشت حاوی هورمون قرار داده شده‌اند، هم از نظر تعداد و هم از نظر درصد زنده ماندن مقایسه کردند. از آنجا که موش مدل آزمایشگاهی مناسبی برای مطالعهٔ اسپرماتوژنزیس انسانی محسوب می‌شود، پژوهش بر روی سوسپانسیون سلولی حاصل از بیضهٔ موش انجام شد.

مواد و روشها

* حیوان آزمایشگاهی

در این پژوهش موشهای نر سوری نژاد NMRI با سن بین ۸-۱۰ هفته از انستیتوی رازی تهران تهیه و در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد به مدت حداقل یک هفته نگهداری شدند و سپس برای انجام تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

* تهیه سوسپانسیون سلولی

بعد از کشتن حیوان، شکم آن از ناحیه خط وسط پاره و بیضه‌ها جدا گردید و داخل پتری دیش‌های محتوی محیط کشت DMEM (Cat No. 31600-075; Gibco BRL) حاوی ۱۰درصد سرم FBS(Chemochen) قرار داده شدند و غشای اطراف بیضه‌ها برداشته شد. بدین ترتیب لوله‌های سمی نفروزی به داخل محیط کشت ریخته شد. سپس این لوله‌ها توسط دو سرنگ انسولین پاره گشت و محتویات داخل آن‌ها که شامل انواع سلولهای جنسی و سلولهای سرتولی و دیگر انواع سلولها است به داخل محیط کشت تخلیه گردید. پتری دیش محتوی محیط کشت و سلولها به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵درصد دی اکسید کربن قرار داده شد، تا به تعادل رسیده و سلولها به طور کامل به داخل محیط منتقل شوند، بعد از گذشت مدت فوق با استفاده از پیپت پاستور محیط کشت محتوی سلولها به داخل لوله آزمایش آسپیره شد و با سرعت ۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید که به دنبال آن رسوب سلولی در ته لوله آزمایش تشکیل شد، رسوب حاصله با محیط کشت DMEM حاوی سرم به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق گردید و برای انجام مراحل شمارش سلولی قبل از کشت و کشت سلولی بمدت ۹۶ ساعت مورد استفاده قرار گرفت.

* انجماد سوسپانسیون سلولی

در این مطالعه از ضدیخ نفوذناپذیر ۱۸(W/V)درصد رافینوز (Cat No. 7549; MERCK) به همراه ۳(W/V)درصد شیر خشک استفاده شد. این ضد یخ بر اساس روش Nakagata (۲۰۰۰) ساخته

---

[1] Intracytoplasmic Sperm Injection
[2] Round Spermatid Injection
[3] Follicles Stimulating Hormone

شد (۱۳). جهت انجماد، ابتدا رسوب سوسپانسیون سلولی تشکیل شد سپس به مقدار مساوی سوسپانسیون سلولی و محیط کشت، ضدیخ به آنها اضافه گردید. پس از متعادل شدن سوسپانسیون سلولی با محلول ضدیخ کرایوتیوبهای حاوی سوسپانسیون سلولی و ضد یخ به مدت ۱۰ دقیقه در گاز نیتروژن مایع (۱۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگه داشته پس از آن در نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند.

※ ذوب سوسپانسیون سلولی

کرایوتیوب‌های حاوی سوسپانسیون سلولی پس از حداقل یک روز از نیتروژن مایع خارج شدند و ۲۰ ثانیه در هوای محیط نگه داشته شدند، سپس ۲ دقیقه در آب ۳۷ درجه سانتیگراد نگه داشته تا یخ‌های آن کاملاً ذوب گردند. محتویات کرایوتیوبها به یک لوله آزمایش استریل تخلیه شد و ۲ برابر حجم آن محیط کشت افزوده گردید و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰g سانتریفوژ شدند. محلول رویی با پیپت استریل برداشته، روی پلیت تشکیل شده، محیط کشت افزوده شد، دوباره سانتریفوژ و محلول رویه تخلیه گردید، پلیت تشکیل شده پس از رقیق شدن برای شمارش و بررسی میزان درصد زنده ماندن سلولها و همچنین کشت سلولی بمدت ۹۶ ساعت مورد استفاده قرار گرفت.

※ کشت سلولی in vitro

گروههای مورد مطالعه در این پژوهش به شرح ذیل بودند: ۱ـ گروه غیر انجمادی که شامل سوسپانسیون سلولی بود که با محیط کشت نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون سلولی و محیط کشت به قطره‌های ۵۰ میکرولیتری موجود در پتری دیش‌ها که از ۲۴ ساعت قبل داخل انکوباتور گذاشته شده بود اضافه گردید. ۲ـ گروه انجمادی: پلیت سلولی توسط ضدیخ رافینوز و شیرخشک منجمد گردید و بعد از انجام مراحل ذوب مانند شرایط گروه غیر انجمادی کشت گردید. ۳ـ گروه غیر انجمادی - هورمونی: پس از رقیق نمودن پلیت سلولی به نسبت ۱ به ۱۰، مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن داخل قطره‌های ۵۰ میکرولیتری که با ۵۰ واحد بین‌المللی در واحد لیتر rFSH1 (۷۵ IU Gonal F Serono-Holland) و ۱ میکرومول بر لیتر تستوسترون (شرکت ابوریحان، Testosterone Enantate) سایلمنت شده بود منتقل گردید. ۴ـ گروه انجمادی - هورمونی: پلیت سلولی ابتدا توسط ضدیخ رافینوز و شیر خشک منجمد شد و سپس ذوب گردید. پلیت حاصله بعد از ذوب به میزان ۱ به ۱۰ رقیق گشته و داخل قطره‌هایی که به آنها هورمونهای rFSH[1]، و تستوسترون (با همان مقادیر ذکر شده در گروه غیر انجمادی - هورمونی) اضافه شده بود منتقل گردید. در کلیه گروهها، هر ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض گردید و سلولهای گروههای چهارگانه به مدت ۹۶ ساعت کشت شد. در ضمن در هر گروه، آزمایش ۵ بار تکرار شد.

※ معیار تشخیص انواع سلولهای اسپرماتیداز سایر سلولهای موجود در سوسپانسیون سلولی

تشخیص سلولهای اسپرماتید گرد از سایر انواع سلولهای گرد موجود در سوسپانسیون سلولی بر اساس چندین معیار است. اندازهٔ سلولها و اندازه و شکل هسته سلولهای اسپرماتید گرد یکی از مهمترین راههای تشخیص اسپرماتید گرد می‌باشد. به علاوه وجود چندین گرانول پرواکروزمی و یا یک وزیکول اکروزومی بزرگ منفرد، یک راه بسیار مناسب برای تشخیص اسپرماتیدهای گرد است، همچنین این سلولها دارای هسته تیره و دنسی بوده که در اکثر موارد مرکزی است (۱۴، ۱۵). در اسپرماتیدهای elongating هسته این سلولها از حالت گرد در آمده و شکل بیضی به خود می‌گیرد، سیتوپلاسم سلول به سمت عقب در ناحیه midlevel از هسته قرار می‌گیرد و سر سلول شروع به دراز شدن می‌کند. در اسپرماتیدهای elongated سر سلول دراز شده و سیتوپلاسم کاملاً در قسمت خلفی هسته قرار می‌گیرد، در این حالت سلول کاملاً دراز شده است (۱۴، ۱۵) (تصویر ۱).

※ شمارش سلولی و آزمون حیاتی

برای شمارش تعداد سلولهای اسپرماتید گرد elongating و elongated، حجم معلومی از محلول سوسپانسیون سلولی و محیط DEME را که به رقت ۱ به ۱۰ رسانده شده بود توسط پیپت پاستور برداشته و بر روی لام نئوبار ریخته شد سپس روی آن توسط یک لامل ۲۰×۲۰ پوشانده شد. سلولهای نامبرده در میدان دید لام نئوبار توسط میکروسکوپ نوری و با روش مشاهده مستقیم با عدسی ۴۰ شئی مشاهده و شمارش گردید.

برای شمارش تعداد سلولهای زنده و مرده از خاصیت نفوذپذیری غشاء سلولها به رنگ تریپان بلو استفاده شد. برای این منظور از روش مشاهده مستقیم و میکروسکوپ نوری استفاده گردید. تریپان بلو سلولهای مرده را رنگ می‌کند، اما در غشاء سلولهای زنده نفوذ نمی‌کند. بنابراین آنها رنگ نشده باقی می‌مانند (۱۶)، به این ترتیب سلولهای مرده به رنگ آبی پررنگ در می‌آیند (تصویر ۲).

※ بررسی آماری

پس از جمع آوری اطلاعات، داده‌ها توسط آزمون آماری repeated measure ANOVA با تعیین سطح معنی داری ما بین هر دو گروه (LSD) برای مقایسه تعداد سلولهای اسپرماتید گرد، elongating و elongated و همچنین مقایسه میزان درصد زنده ماندن سلولهای نامبرده بین گروههای آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند و معنی داری در حد $P<0.05$ تعیین شد.

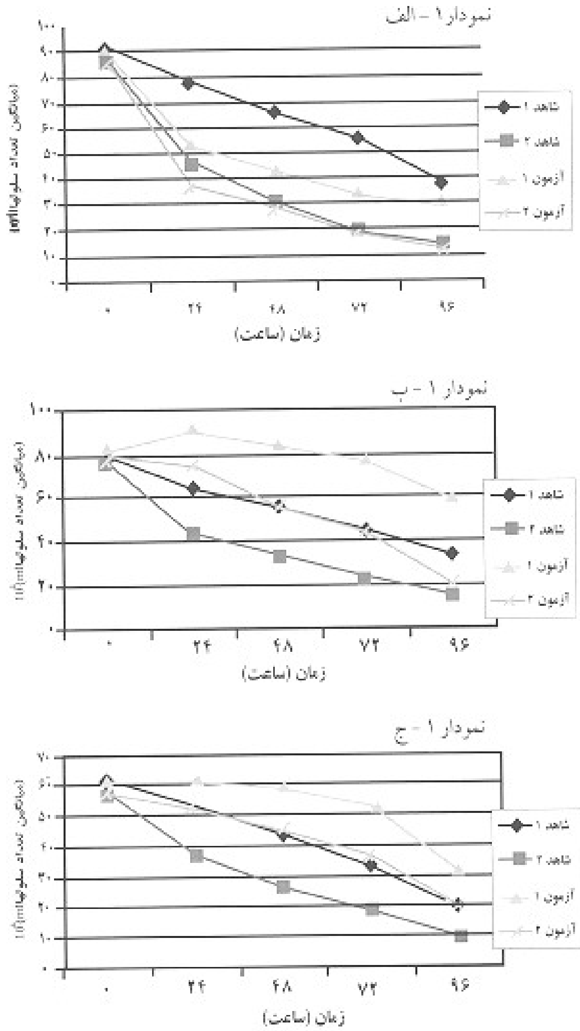
یافته‌ها

ارزیابی تعداد سلولهای اسپرماتید (گرد، elongating، elongated) در گروههای قبل از کشت و گروههای چهارگانه بعد از کشت (غیر انجمادی، انجمادی، غیر انجمادی - هورمونی و انجمادی- هورمونی) نشان داد که تعداد سلولهای اسپرماتید گرد در تمامی گروهها در عرض ۹۶ ساعت کشت کاهش یافت. این کاهش در گروه انجمادی-

---

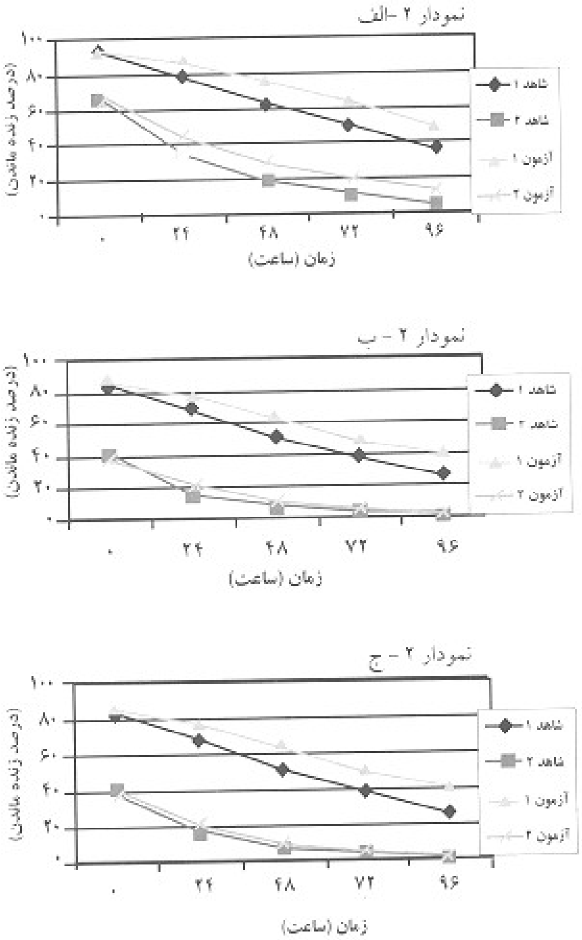
[1] Recombinant Follicles Stimulating Hormone

هورمونی در تمامی ساعات کشت در مقایسه با سایر گروهها بیشتر بود بعلاوه در ۲۴ ساعت اولیه کشت کاهش شدید تعداد سلولها بترتیب در گروههای انجمادی، غیر انجمادی - هورمونی و انجمادی - هورمونی وجود داشت (نمودار ۱). تعداد سلولهای اسپرماتید elongating بعد از ۲۴ ساعت در ۳ گروه غیر انجمادی، انجمادی و انجمادی - هورمونی کاهش یافت، که در این بین بیشترین کاهش در گروه انجمادی و کمترین کاهش در گروه انجمادی - هورمونی مشاهده شد. اما علی‌رغم کاهش تعداد سلولها در ۲۴ ساعت اول کشت در ۳ گروه نامبرده، در گروه غیرانجمادی - هورمونی، افزایش تعداد سلولها مشاهده گردید. بین ساعات ۲۴ تا ۹۶ در تمامی گروه‌ها کاهش تعداد سلولها وجود داشت (نمودار ۱).

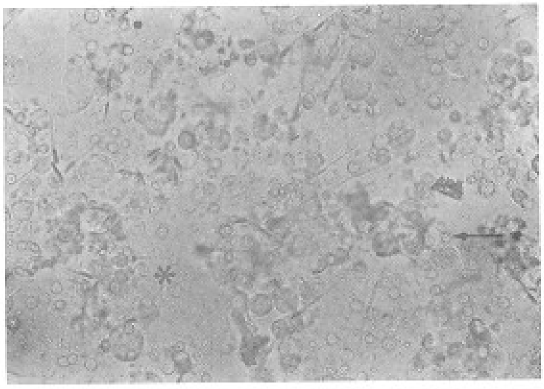


نمودار ۱: مقایسه تعداد سلولهای اسپرماتید گرد، Elongating و Elongated مابین سه گروه، ۱ـ الف: اسپرماتید گرد ۱ـ ب: Elongating، ۱ـ ج: Elongated

تعداد سلولهای اسپرماتید elongated پس از ۲۴ ساعت کشت در تمامی گروهها بجز گروه غیر انجمادی - هورمونی (که افزایش تعداد سلولها را نشان می‌دهد) کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش در گروه انجمادی مشاهده گردید.



نمودار ۲: مقایسه میزان درصد زنده ماندن سلولهای اسپرماتید گرد، Elongating و Elongated مابین سه گروه ۲ـ الف: اسپرماتید گرد ۲ـ ب: Elongating، ۲ـ ج: Elongated



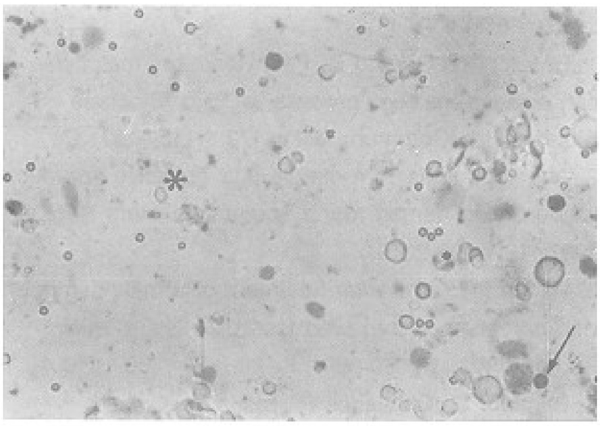
شکل ۱: سوسپانسیون سلولی حاصل از بیضه موش (Fresh) در تصویر، اسپرماتید گرد (←)، Elongating (n) و Elongated (*) مشخص شده است بزرگنمایی ۴۰۰×

(تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۷)

پس از ۲۴ ساعت کشت در تمامی گروهها کاهش تعداد سلولهای مشاهده شد که بیشترین کاهش در گروه انجمادی بود. همچنین

ارزیابی درصد زنده ماندن انواع سلولهای اسپرماتید در گروههای قبل از کشت و گروههای چهارگانه بعد از کشت نشان داد که میزان درصد زنده ماندن سلولها، طی چهار روز کشت در تمامی گروهها کاهش یافت (نمودار ۲).

اما میزان از دست رفتن سلولها در محیط حاوی هورمون سیر نزولی تدریجی‌تری نسبت به محیط مشابه بدون هورمون داشت. بعلاوه میزان از دست رفتن سلولها در گروههای انجمادی نسبت به گروههای غیر انجمادی بیشتر بود (نمودار ۲).



شکل ۲: سوسپانسیون سلولی حاصل از بیضه موش پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو. در تصویر، یک اسپرماتید گرد (→)، Elongated (⊕) مرده و یک Elongating (*) زنده مشاهده می‌شود. بزرگنمایی ۴۰۰× (تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۹)

بحث

این تحقیق بیانگر آن است که سلولهای اسپرماتید گرد در محیط کشتی که محتوی غلظت هایی از FSH و تستوسترون است می‌توانند مراحل اسپرمیوژنزیس را طی ۲۴ ساعت بعد از کشت پشت سربگذارند. کاهش مشخص و شدیدتر تعداد سلولهای اسپرماتید گرد موجود در سوسپانسیون سلولی حاصله از بافت بیضه در محیط کشت حاوی مقادیر بالای FSH(۵۰lu/l) و تستوسترون (۱μmol/l) بعد از ۲۴ ساعت از کشت نسبت به زمانی که این نوع سلولها در محیط کشت بدون هورمون کشت داده می‌شوند و بر عکس، افزایش محسوس تعداد سلولهای اسپرماتید elongating و elongated در مدت زمان ذکر شده در محیط کشت حاوی هورمون، بر خلاف کاهش مشخص تعداد این سلولها در محیط بدون هورمون موید این نتیجه است. Tesarik و همکارانش به دنبال کشت نمونه‌های بیوپسی بیضه انسانی دریافتند که سلولهای جرم از برخی مردان با توقف بلوغی، وقتی با غلظت هایی از FSH و تستوسترون کشت داده می‌شوند، می‌توانند اسپرماتوژنزیس را طی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کشت بدست آورند (۱۷ و ۱۱). درصد زنده ماندن انواع سلولهای اسپرماتید با استفاده از آزمون تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت، که بر اساس آن میزان درصد زنده ماندن سلولها در طول ۲۴ ساعت اولیه کشت در هر دو محیط یعنی محیط حاوی و عاری از هورمونهای FSH و تستوسترون به طور تدریجی کاهش می‌یابد. بعد از گذشت این زمان در هر دو نوع محیط بر میزان سرعت از دست رفتن سلولها افزوده می‌شود به گونه‌ای که بعد از ۹۶ ساعت ٦۰ تا ۷۰ درصد از سلولها از بین می‌روند، میزان از دست رفتن سلولها در ۲۴ ساعت اول کشت در محیط حاوی هورمون با سیر تدریجی‌تری نسبت به محیط بدون هورمون می‌باشد علت را می‌توان حفظ حیات این سلولها در محیط کشت توسط هورمونهای FSH و تستوسترون و از طریق سلولهای سرتولی دانست. بخش دیگر از این تحقیق بیانگر آن است که سلولهای اسپرماتید گرد منجمد - ذوب شده در محیط کشتی که محتوی غلظتهای بالایی از FSH و تستوسترون است می‌توانند مراحل بلوغی را در ۲۴ ساعت اول کشت تا حدی پشت سر بگذارند. ترکیب ضدیخ رافینوز- شیر خشک در انجماد اسپرم موش ترکیب مناسبی محسوب می‌شود (۱۸). بنابراین در این پژوهش از این ضد یخ جهت انجماد سوسپانسیون سلولی استفاده شد. تعداد سلولهای اسپرماتید گرد منجمد - ذوب شده که در محیط حاوی هورمون کشت شده بود در ۲۴ ساعت اول کشت شدیداً کاهش می‌یابد و در محیط بدون هورمون در همین مدت زمان این کاهش با شدت کمتری انجام می‌گیرد، از طرفی تعداد سلولهای اسپرماتید elongating و elongated در عرض ۲۴ ساعت کشت تغییر چندانی نمی‌کند، در حالیکه در شرایط مشابه در محیط کشت بدون هورمون تعداد سلولهای اسپرماتید elongating و elongated به مقدار زیادی کاهش می‌یابد. کاهش شدیدتر تعداد سلولهای اسپرماتید گرد در محیط حاوی هورمون، در ۲۴ ساعت اول کشت و بیشتر بودن تعداد سلولهای elongating و elongated (بعبارتی تغییر نکردن تعداد سلولها) نسبت به محیط بدون هورمون، دال بر پیشرفت بلوغی سلولهای اسپرماتید گرد می‌باشد. بنابه نظر Tesarik و Mendoza (۱۹)، سلولهای جرم بدون انجماد در محیط کشت حاوی هورمونهای FSH و تستوسترون می‌توانند تا ۴۸ ساعت به روند پیشرفت بلوغی خود ادامه دهند و این در حالی است که کشت نمونه‌های بیوپسی بیضه‌ای منجمد - ذوب شده در همان محیط کشت اجازه پیشرفت بلوغی را به سلولهای جرم فقط برای مدت ۲۴ ساعت از کشت می‌دهد. آنها اختلاف موجود در مدت زمان بلوغ را در ارتباط با حیات نسبتاً ضعیف سلولهای سرتولی منجمد - ذوب شده در محیط کشت در مقایسه با کشت نمونه‌های بیوپسی بیضه‌ای تازه می‌دانند. در مطالعه حاضر علی رغم مشخص نمودن تمایزات اسپرمیوژنزیس، تعداد سلولهای اسپرماتید elongating و elongated افزایش مشخصی را نسبت به تعداد اولیه خود نشان نمی‌دهد، علت را می‌توان مطابق با نظر Tesarik و Mendoza (۱۱)، آسیب سلولهای سرتولی بدنبال مراحل انجماد - ذوب و بنابراین عدم تاثیر کافی FSH روی سلولهای جرم دانست به علاوه همانطور که Tesarik به آن اشاره می‌کند، پروتکل‌های انجمادی - ذوبی برای سلولهای جرم توسعه یافته‌اند نه برای سلولهای سرتولی. بنابراین حفاظت کافی برای سلولهای سرتولی در خلال انجماد - ذوب بوجود نمی‌آید. از طرفی مراحل انجماد - ذوب ممکن است سبب نقایص عملکردی برای سلولها ی جرم شود. این نقایص ممکن است بلافاصله بعد از ذوب نمایان نشوند ولی ممکن است به تمایزات سلولهای جرم در خلال دوره زمانی انکوباسیون بعد از ذوب آسیب وارد کند. بنابر نظر Aslam و همکارانش وقتی مخلوطی از سلولهای بیضه‌ای منجمد می‌شوند، تعداد

بیشتری از سلولها حیات خود را از دست می‌دهند تا وقتی که سلولهای اسپرماتوژنیک ایزوله شده هموژنوس منجمد شوند، علت می‌تواند عدم تحمل نسبت به انجماد، لیز سلولی و یا مواد سمی باشد که بوسیله سلولهای غیر اسپرماتوژنیک در سوسپانسیون سلولی بیضه ترشح می‌شود (۲۰).

لازم به ذکر است که در بسیاری از تحقیقات از جمله Tesarik و Mendoza (۱۹) عنوان شده است که برای دست یابی به نتیجهٔ بهتر، سلولها باید در محیط کشتی با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت شوند، اما در تحقیق حاضر، دمای کشت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شده بود، بنابراین لازم است مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد به سلولهای elongating و elongated فقط در ۲۴ ساعت اولیه در نمونه‌های تازه و منجمد - ذوب شده‌ای که در محیط کشت حاوی هورمونهای FSH و تستوسترون کشت شده‌اند حاصل می‌گردد و در عین حال ضروری است مقادیر دیگری از هورمونهای فوق به محیط کشت افزوده شده و اثرات آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

◆ ◆ ◆ ◆ ◆ ◆ ◆ ◆ ◆

References

1. Batistoni N, Gerand B: Pachytene spermatocytes can achieve meiotic process in- vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1991; 179: 1115-1121

2. Angelopoulous T: A simple and objective approach to identifying human round spermatids. Hum Reprod 1997; 12: 2208-2216

3. Worne NE: Birth after treatment of a male semnoma with cryopreserved thawed testicular tissue. Hum Reprod 1973; 15:860-869

4. Bahadur G, Chatterjee R: Testicular tissue cryopresservation in boys: ethical and legal issues. Hum Reprod 2000; 15:1416-1420

5. Hovatal O: Cryopreservation of testicular of tissue in young cancer patients. Hum Reprod 2001; 7:378-381

6. Van Steirghem AC, Nagy Z, Joris H: High fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8: 1061-1066

7. Antinori S, Vesaci C: Fertilization with testicular spermatids: four successful pregnancies. Hum Reprod 1997; 12: 286-291

8. Fishel S, Green S, Hanter A: Human fertilization with round and elongated spermatids. Hum Reprod 1997; 12: 336-340

9. Veheyen G, Joris H, Van Steirteghen A: Simple and reliable identification of the human round spermatid by inverted phase- contrast microscopy. Hum Rrprod 1998; 13(6): 1570-1577

10. Amer M, Soliman E: Is complete spermiogenesis failure a good indication for spermatid conception? Lancet 1997; 350: 116-117

11. Tesarik J, Mendoza C: In vitro differentiation of germ cells from frozen testicular biopsy specimens. Hum Reprod 2000; 15: 1713-1716

12. Parvinen M, Wright WW: Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogenesis. Endocrin 1983; 112: 1150-1152

13. Nakagata N: Cryopreservation of mouse spermatozoa. Mam Gen 2000; 11: 572-576

14. Mendoza C, Tesarik J: The occurrence and identification of round spermatid in the ejaculate of men with non obstructive azoospermia. Fertil Steril 1996; 77(5): 829-829

15. Shostak S: Gametogenesis in Embryology: An introduction to developmental biology. Harper Collins Publishers, New York, 1991; 171-185

16. Talbot P, chacon RS: A triple stain technique for evaluting normal acrosome reaction of human sperm. J Exp Zool 1981; 215: 208-208

17. Tesarik J, Guido M, Mendoza C: Human spermatogenesis in vitro: Respective effect of follicle stimulating hormone andtestosterone on meiosis, spermiogenesis and sertoli cell appoptosis. J clin Endocrinol Metab 1998; 83: 4467-4473

۱۸. حاتمی لیلی: اثرات دو ضد یخ مختلف بر قدرت باروری اسپرم موش. پایان نامه کارشناسی ارشد، کتابخانه دانشگاه تربیت مدرس، سال ۱۳۸۰

19. .Tesarik J, Mendoza C: Differentiation of spermatogenic cells during in vitro culture of testicular biopsy samples frompatients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod 1998; 43: 2772-2781

20. Aslam I, Fishel S: Short term in vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in vitro conception. Hum Reprod 1998; 13: 634-638