مقاله تحقیقی

بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد موش با استفاده از FSH و تستوسترون در محیط کشت

نسرین قربانزاده .M.Sc*، منصوره موحدین .Ph.D*، تقی طریحی .Ph.D*، انوشیروان کاظم‌نژاد .Ph.D**

* گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

** گروه آمار حیاتی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۱، تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۸۲

چکیده

هدف: FSH و تستوسترون در شروع و بقای اسپرماتوژنزیس نقش اساسی را به عهده دارند. در این پژوهش اثر هورمونهای FSH و تستوسترون بر بلوغ سلولهای اسپرماتید گرد مطالعه شد.

مواد و روشها: برای این منظور سوسپانسیون سلولی از بیضه موش نژاد NMRI (با سن ۱۰-۸ هفته) تهیه و به دو قسمت تقسیم شد. بخشی از سوسپانسیون سلولی در محیط کشت حاوی DMEM & FBs ده درصد و بخش دیگر آن در محیط کشت حاوی DMEM & FBs ده درصد که به آن FSH و تستوسترون اضافه شده بود، به مدت ۹۶ ساعت کشت داده شد. سپس تعداد سلولهای اسپرماتید گرد، elongating و elongated قبل از کشت و روزانه به مدت ۹۶ ساعت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و ثبت شد. همچنین میزان درصد زنده ماندن انواع سلولهای اسپرماتید در طی ساعات ذکر شده با استفاده از آزمون تریپان‌بلو ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که در نمونه‌هایی 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، که به شکل معنی‌داری با گروه شاهد اختلاف داشت و در پایان کشت تعداد بیشتری از سلولهای گروه شاهد نسبت به گروه آزمون حیات خود را از دست داده بودند.

نتیجه گیری: این اطلاعات نشان می‌دهد که اسپرماتیدهای گرد در محیط کشت حاوی هورمون، فقط در ۲۴ ساعت اولیه کشت می‌توانند پیشرفت بلوغی را نشان دهند.

واژه‌های کلیدی: اسپرماتید گرد، بلوغ، موش

مقدمه

اسپرماتوژنزیس، یک پروسه سنجیده و دقیق است که در سن بلوغ آغاز شده و در سراسر زندگی تولیدمثلی ادامه می‌یابد و به موجب آن سلولهای بنیادی جنسی، تقسیمات و تمایزات وسیعی را پشت سر می‌گذارند [۱ و 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 که توانایی باروری دارند مبدل می‌شوند [۲]. در اکثریت افرادی که مبتلا به تومورهای بیضه‌ای هستند آزواسپرمیا مشاهده می‌شود [۳]. شیمی‌درمانی و رادیوتراپی در درمان سرطانها و تومورهای رایج در بیضه سبب آسیب به سلولهای جنسی و در نتیجه نقص در اسپرماتوژنزیس می‌شوند [۴ و ۵]. در انسان نقص و توقف مراحل اسپرماتوژنیکی یک حالت ناامیدکننده برای زوج‌هایی است که آرزوی داشتن فرزند را دارند [۲ و ۳]. ICSI[1] یک تکنیک امیدبخش برای درمان بیمارانی با قدرت باروری پایین

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵ Email:movahedm@hotmail.com

1- Intracytoplasmic Sperm Injection

است به گونه‌ای که تولدهای زنده و طبیعی به‌دنبال ICSI در انسان و برخی پستانداران مشاهده شده است [۶]. اخیراً تعداد کمی بارداری بعد از ROSI[1] با منشأ بیضه‌ای گزارش شده است [۷ و ۸]. این بدین معناست که اسپرماتیدهای گرد نیز می‌توانند منجر به باروری طبیعی شوند و جنینهایی با پتانسیل رشدی کامل را به وجود آورند [۹]. لکن میزان باروری و بارداری‌های که از طریق ROSI به دست آمده، بسیار پایین‌تر از آنهایی است که از اسپرماتوزوای بالغ و اسپرماتیدهای به دست آمده است [۱۰]. بنابراین بلوغ اسپرماتید گرد و حصول اسپرماتوزوا در افراد آزواسپرمیایی که توقف اسپرماتوژنزیس دارند یا افرادی که به تومورها و سرطانهای بیضه‌ای مبتلا بوده و برای درمان نیاز به رادیوتراپی و شیمی درمانی دارند، و در عین حال به دنبال داشتن فرزند، با استفاده از تکنیک درمانی ICSI هستند، ضروری به نظر می‌رسد. برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ در انسان تکمیل میتوز و آغاز اسپرماتوژنزیس به وسیله انکوباسیون قطعات لوله‌ای سمی نفروزی در محیط کشت به دست آمد [۱۱]. سپس در سال ۱۹۹۱ اسپرماتوژنزیس انسانی در محیط کشت با کشت همزمان کوتاه مدت از اسپرماتوسیت‌های پاکی تن و سلول‌های سرتولی خالص به دست آمد [۱]. در سال ۱۹۹۸ مشخص شد که سلول‌های ژرمینال انسانی وقتی به صورت in vitro کشت شوند و در محیط کشت آنها FSH و تستوسترون اضافه شود می‌توانند تمایزات در حین میوز و بعد از میوز را انجام دهند [۱۲]. با توجه به نیازی که برای بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد وجود دارد در این تحقیق کوشش شد تا سلول‌های اسپرماتید در محیط کشت حاوی هورمون کشت شوند و با سلول‌های اسپرماتید گردی که در محیط کشت عاری از هورمون کشت شده‌اند، هم از نظر تعداد و هم از نظر درصد زنده ماندن مقایسه شوند.

مواد و روشها

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

تهیه سوسپانسوین سلولی

بعد از کشتن حیوان، شکم آن از ناحیه خط وسط پاره و بیضه‌ها جدا شد و داخل پتری دیشهای محتوی محیط کشت DMEM حاوی سرم 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 شد و محتویات داخل آنها که شامل انواع سلول‌های جنسی و سلول‌های سرتولی و دیگر انواع سلول‌ها است به داخل محیط کشت تخلیه شد. پتری دیش محتوی محیط کشت و سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرارداده شد، تا به تعادل رسیده و سلول‌ها به‌طور 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 شد که به دنبال آن رسوب سلولی در ته لوله آزمایش تشکیل شد، رسوب حاصل با محیط کشت DMEM حاوی سرم به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق و برای انجام مراحل شمارش سلولی قبل از کشت و کشت سلولی به مدت ۹۶ ساعت استفاده 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 براساس چندین معیار است، اندازه سلولها و اندازه و شکل هسته سلولهای اسپرماتید گرد یکی از مهمترین راههای تشخیص اسپرماتید گرد است. به علاوه وجود چندین گرانول پرواکروزمی یا یک وزیکول اکروزومی بزرگ منفرد، یک راه بسیار مناسب برای تشخیص اسپرماتیدهای گرد است؛ همچنین این سلول‌ها دارای هسته تیره بوده که در اکثر موارد مرکزی است [۱۳] و در اسپرماتیدهای

1- Round Spermatid Injection

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.

شمارش سلولی و آزمون حیاتی

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

برای شمارش تعداد سلول‌های زنده و مرده از خاصیت نفوذپذیری غشای 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 غشای سلولهای زنده نفوذ نمی‌کند بنابراین آنها رنگ نشده باقی می‌مانند [۱۴]، به این ترتیب سلول‌های مرده به رنگ آبی پررنگ در می‌آیند.

گروههای مورد آزمایش

گروههای مورد مطالعه در این پژوهش شامل دو گروه شاهد و آزمون بود. در گروه شاهد، پلیت سلولی حاصل از سانتریفوژ با محیط کشت به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد، سپس در زیر هود و تحت شرایط استریل 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 بودند، اضافه شد. در گروه آزمون، 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 rFSH[1] (۷۵IU, Gonalf Serono-Holand) و ۱ میکرومول بر لیتر تستوسترون (شرکت ابوریحان، Testosterone) جایگزین شده بود منتقل شد. پس از کشت سلول‌ها، پتری دیش‌های محتوی سلول‌ها، داخل انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن به مدت ۹۶ ساعت گذاشته شد. در هر دو گروه، به فواصل ۲۴ ساعت محیط کشت تعویض شد.

بررسی آماری

پس از جمع‌آوری اطلاعات، داده‌ها توسط آزمون آماری repeated measure ANOVA با تعیین سطح معنی‌داری ما بین هر دو گروه (LSD) برای مقایسه تعداد سلولهای اسپرماتید گرد و همچنین مقایسه میزان درصد زنده ماندن سلولهای نامبرده بین گروههای شاهد و آزمون مورد ارزیابی قرار گرفتند که اختلاف آنها معنی‌دار بود ($P<0.05$).

یافته‌ها

ارزیابی تعداد سلول‌های اسپرماتید (گرد، elongated و elongating) در گروههای قبل از کشت و دو گروه بعد از کشت (شاهد و آزمون) نشان داد که تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد در هر دو گروه در عرض ۹۶ ساعت کشت کاهش یافت که با هم اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0.001$)، اما این کاهش در گروه آزمون (یعنی گروه هورمون) بیشتر از گروه شاهد (یعنی گروه عاری از هورمون) بود. این تفاوت در ۲۴ ساعت اولیه کشت مشهودتر بود (نمودار ۱).

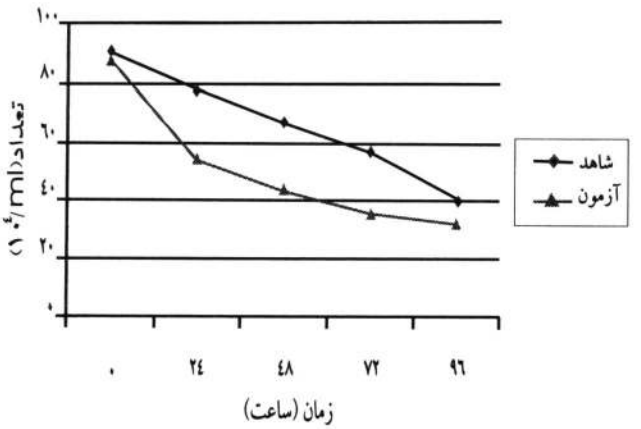
تعداد سلول‌های اسپرماتید بعد از ۲۴ ساعت در گروه آزمون افزایش یافته اما در گروه شاهد کاهش پیدا کرد که با گروه آزمون به صورت معنی‌داری تفاوت داشت ($P<0.001$). بین ساعات ۲۴ تا ۹۶ در هر دو گروه کاهش تعداد سلولها مشاهده شد (نمودار ۲).

تعداد سلول‌های اسپرماتید elongated در گروه شاهد در خلال زمان کشت کاهش یافت، در گروه آزمون در ۲۴ ساعت اولیه کشت افزایش ولی در سایر ساعات کشت کاهش یافت و

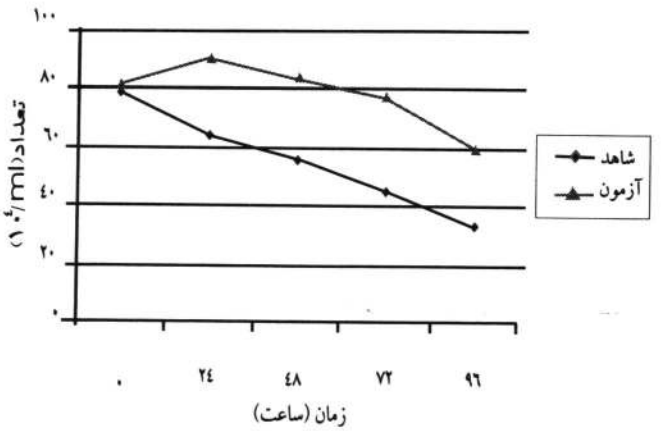
1- Recombinant Follicle Stimulating Hormone

به هر حال این اختلاف معنی‌دار بود (P<0.001) (نمودار ۳).

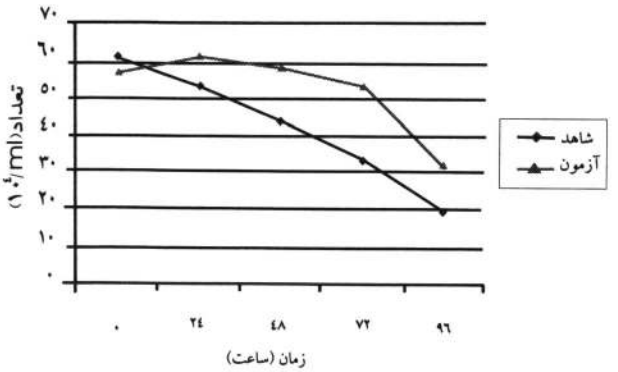
همچنین ارزیابی درصد زنده ماندن انواع سلولهای اسپرماتید در گروههای قبل از کشت و بعد از کشت، کاهش میزان درصد زنده ماندن سلولها در طی چهار روز کشت در هر دو گروه را نشان داد اما میزان از دست رفتن سلولها در محیط حاوی هورمون سیر نزولی تدریجی‌تری نسبت به محیط مشابه بدون هورمون داشت و با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود (اسپرماتید گرد (P<0.05)، اسپرماتید elongating (P<0.05)، و اسپرماتید elongated (P<0.001) (نمودارهای ۴، ۵ و ۶).



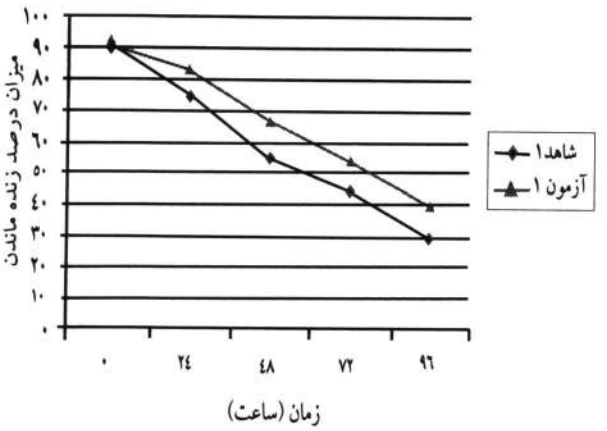
نمودار ۱. روند کشت سلولهای اسپرماتید گرد در طی ۹۶ ساعت کشت در دو گروه (مقایسه تعداد سلولها)، اختلاف دو گروه معنی‌دار است (P<0.001)



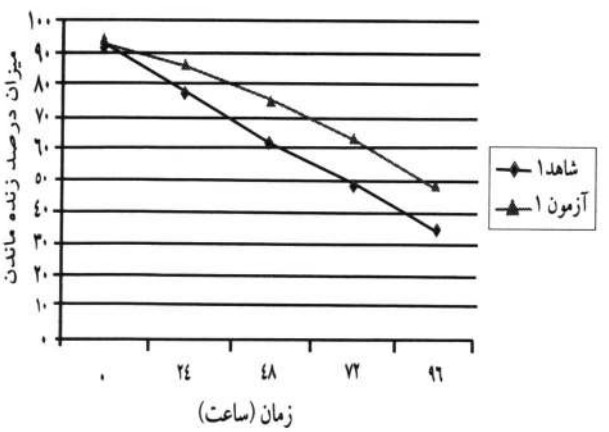
نمودار ۲. روند کشت سلولهای اسپرماتید elongating در طی ۹۶ ساعت کشت در دو گروه (مقایسه تعداد سلولها)، اختلاف دو گروه معنی‌دار است (P<0.001)



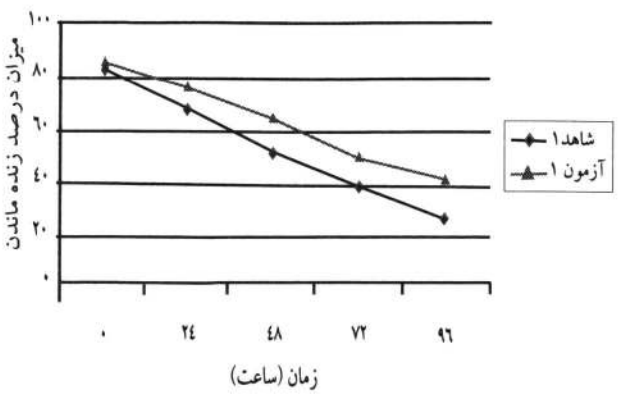
نمودار ۳. روند کشت سلولهای اسپرماتید elongated طی ۹۶ ساعت کشت در دو گروه (مقایسه تعداد سلولها)، اختلاف دو گروه معنی‌دار است (P<0.001)



نمودار ۴. مقایسه درصد زنده ماندن سلولهای اسپرماتید گرد طی ۹۶ ساعت کشت در دو گروه، اختلاف دو گروه معنی‌دار است (P<0.05)



نمودار ۵. مقایسه درصد زنده‌ماندن سلولهای اسپرماتید elongating طی ۹۶ ساعت کشت در دو گروه، اختلاف دو گروه معنی‌دار است (P<0.05)



نمودار ۶. مقایسه درصد زنده ماندن سلولهای اسپرماتید elongated طی ۹۶ ساعت کشت در دو گروه، اختلاف دو گروه معنی‌دار است (P<0.001)

بحث

این تحقیق نشان‌دهنده آن است که سلولهای اسپرماتید گرد در محیط کشتی که محتوی غلظتهایی از FSH و تستوسترون است می‌توانند مراحل اسپرمیوژنزیس را طی ۲۴ ساعت بعد از کشت پشت سربگذارانند. کاهش مشخص و شدیدتر تعداد سلولهای اسپرماتید گرد موجود در سوسپانسیون سلولی حاصل از بافت بیضه در محیط کشت حاوی مقادیر بالای FSH(50Iu/l) و تستوسترون (1μmol/l) ۲۴ ساعت پس از کشت، نسبت به زمانی که این نوع سلولها در محیط کشت بدون هورمون کشت داده می‌شوند همچنین افزایش محسوس تعداد سلولهای اسپرماتید elongated, elongating در مدت زمان ذکر شده در محیط کشت حاوی هورمون، برخلاف کاهش مشخص آنها در محیط بدون هورمون نشان‌دهنده 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 غلظت‌هایی از FSH و تستوسترون کشت داده می‌شوند، می‌توانند اسپرماتوژنزیس را طی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از کشت به دست آورند [۱۲ و ۱۵]. غلظت FSH و تستوسترون مورد استفاده در این تحقیق به ترتیب 50IU/l و 1μmol/l بود. زیرا بر اساس تحقیقات انجام گرفته توسط Mendoxa, Tesarik غلظتهای بالایی از این هورمونها در محیط کشت، برای تحریک اسپرماتوژنزیس در سلولهای جرم نیاز است [۱۲]. تأثیرات FSH و تستوسترون روی مراحل اسپرماتوژنیک ابتدایی و انتهایی با واسطه سلولهای سرتولی انجام‌پذیر است [۱۶]. به‌طور کلی پذیرفته شده که حضور سلولهای سرتولی برای حفظ حیات سلولهای جرم ضروری است در این حال برخی از سلولهای جرم در توده‌های سلولی جرم - سرتولی غوطه‌ور می‌باشند. بنابر نظر Tesarik و همکارانش [۱۷] تأثیرات سلول سرتولی برروی سلولهای جرمی که هم اکنون به صورت مجزا در محیط کشت قرار داند (یعنی فاقد یک تماس فیزیکی مستقیم با سلولهای سرتولی هستند) به صورت یک عملکرد غیرتماسی و از طریق مدیاتورهای هومورال انجام می‌پذیرد. در شرایط کشت آزمایشگاهی، سلولهای سرتولی که به وسیله یک تماس مستقیم با سلولهای جرم در توده‌های چند سلولی بزرگ تحریک می‌شوند، ممکن است مواد هومورال تنظیم کننده و تحریک کننده رشد را ترشح نمایند که این مواد می‌توانند حیات و تمایز سلولهای جرم را در همان قطره کشت تحت تأثیر قرار دهند، پس هر چقدر سلولهای جرم برای رسیدن به مراحل بعدی رشد بیشتر فراهم می‌شود که این نتیجه حتی بدون تماس مستقیم با سلولهای سرتولی نیز می‌تواند حاصل شود [۱۷]. در این پژوهش، بلوغ سلول‌های اسپرماتید گرد که با افزایش تعداد سلول‌های elongated, elongating در ۲۴ ساعت اول کشت دیده می‌شود را می‌توان از طریق مکانیسم تماس غیرمستقیم سلول جرم - سرتولی و تأثیر FSH روی آنها توضیح داد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت اولیه کشت، پیشرفت بلوغی مشاهده نمی‌شود که دو دلیل را می‌توان برای آن ذکر کرد، اولاً آنکه؛ میزان جدایی سلول سرتولی - جرم به دنبال تعویضهای مکرر محیط افزایش یافته، بنابراین تأثیرات هورمون‌ها از طریق تماسهای سلول سرتولی - جرم در توده‌های سلولی کاهش یافته در نتیجه موجبات فساد و خرابی سلولهای جرم فراهم آمده و از پیشرفت بلوغی آنها جلوگیری به عمل می‌آید. قابل ذکر است که به علت کم بودن نیمه عمر هورمون FSH در محیط کشت، محیط قطرات کشت به‌طور روزانه تعویض شد. ثانیاً؛ از آنجایی که سوسپانسیون سلولی به کار رفته در این تحقیق شامل همه انواع سلول‌های بیضه‌ای بود (نه فقط سلولهای سرتولی و جرم)

بنابراین ممکن است سلولهای سوماتیک غیرسرتولی سبب تغییراتی در مدیاتورهایی که توسط سلولهای سرتولی ترشح می‌گردند، شوند و این تولیدات تغییر یافته در تأثیرات FSH دخالت کنند. میزان درصد زنده ماندن انواع سلولهای اسپرماتید با استفاده از آزمون تریپان بلو بررسی شد. که براساس آن میزان درصد زنده ماندن سلول‌های 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 کشت این زمان در هر دو نوع محیط بر میزان سرعت از دست رفتن سلولها افزوده می‌شود به گونه‌ای که بعد از ۹۶ ساعت ۶۰ تا ۷۰ درصد از سلولها از بین می‌روند. میزان از دست رفتن سلول‌ها در ۲۴ ساعت اول کشت در محیط حاوی هورمون نسبت به محیط بدون هورمون تدریجی تروکندتر است که می‌تواند به دلیل حفظ حیات این سلول‌ها در محیط کشت توسط هورمون‌های FSH و تستوسترون و از طریق سلول‌های سرتولی باشد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بلوغ سلولهای اسپرماتیدگرد به سلولهای elongated, elongating فقط در ۲۴ ساعت اولیه کشت در نمونه‌هایی که در محیط کشت حاوی هورمون‌های FSH و تستوسترون کشت شده‌اند حاصل می‌شود.

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. **Wome N.E.** 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 Human. Reprod. 2001; 7: 378-381
6. **Van Steirghem AC, Nagy Z, Joris H.** High fertilization rates 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, Lisi S, Rinaldi L, Lisi R, McDermott H.** Human fertilization with round and elongated spermatids. Hum Reprod. 1997; 12: 336-340
9. **Veheyen G, Joris H, and Van steirteghen A.** Simple and reliable identification of the human round spermatid by inverted phase-contrast microscopy. Hum Reprod. 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. **Parvinen M, Wright WW.** Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogenesis. Endocrinol. 1983; 112: 1150-1152
12. **Tesarik J, Mendoza C.** In vitro differentiation of germ cells from froen testicular biopys specimens. Hum Reprod. 2000; 15: 1713-1716
13. **Mendoza C, Tesarik J.** The occurrence and identification of round spermtid in the ejaculate of men with non obstructive azoospermia. Fertil Steril. 1996; 77(5): 829-829
14. **Talbot P, Chacon R.S.** A triple-stain technique for evaluting normal acrosome reaction of human sperm. J Exp Zool. 1981; 215: 208-208
15. **Tesarik J, Guido M, Mendoza C, Greco E.** Human spermatogenesis in vitro Respective effect of follicle stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis and sertoli cell appoptosis. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83: 4467-4473
16. **Meachem S.J, Wreford N.G.** Androgen action onthe restoration of spermatogenesis in adult rats. J Int Andro. 1997; 20: 70-90
17. **Tesarik J, Mendoza C.** Differentiation of spermatogenic cells during in vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod. 1998; 43: 2772-2781