

Spermatogonial Kök Hücre

Spermatogonial Stem Cell

Sevinç Yanar, Şadiye Açıkgöz, Elvan Şahin, Aysun Sarıkaya

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya

Özet

Spermatogonial kök hücreler (SKH) testiste bulunan bir çeşit yetişkin kök hücre türüdür. Kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesine sahip olan bu hücreler pluripotent özellikte olup yetişkindeki diğer kök hücreleri arasında gelecek nesile genetik olarak katkı sağlayacak tek hücre çeşidi olması özelliği ile eşsizdir. Son yıllarda deney hayvanları ve insan SKH'nin izolasyonu, karakterizasyonu ve transplantasyonu üzerine yapılan pek çok çalışma bu hücrelerin biyolojisini anlamayı sağlamış, reproduktif ve rejeneratif tıptaki geniş kullanım alanlarına dikkat çekmiştir. Özellikle erkek infertilitesi tedavisi konusunda yapılmış olan araştırmalar umut vadeden niteliktedir. Ancak testiste bulunan SKH miktarının çok az olması hücre kültürü çalışmalarını daha önemli hale getirmektedir. Yüksek saflıkta ve canlılıkta hücreleri güvenli bir şekilde izole etmek ve nakledebilmek, karşılaşılan en büyük güçlükler olmakla birlikte bu süreçteki en önemli basamaklardır. İnsan SKH hattının geliştirilmesi ve kültürde tam bir başarı sağlanması yapılacak çalışmalarını hızlandıracak ve daha farklı bir boyuta taşıyacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sperm, Kök Hücre, İzolasyon, Spermatogenez, İnfertilite

Başvuru Tarihi / Received: 16.12.2016
Kabul Tarihi / Accepted : 21.03.2017

Giriş

Germ hücreleri türe özgü olan hücreleridir. Genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını ve türün devamlılığını sağlamaktadırlar. Germ hücrelerinin bu özelliklerinden dolayı yapılacak araştırmalar bu hücrelerin mekanizmasını anlama ve yeni tedavi yöntemleri oluşturabilme açısından önem taşımaktadır. Sperm ve ovum olmak üzere iki çeşit germ hücresi vardır. Sperm germ hücresinin oluşmasını sağlayan spermatogonial kök hücreler (SKH) ile son yıllarda yapılan çalışmalar SKH'nin fertilitate tedavisi ve rejeneratif tıptaki kullanım potansiyelinin önemini ortaya koymaktadır (1-3). SKH erkek testisinde seminifer tübüller içerisinde bulunmaktadır. SKH kendini yenileme ve farklılaşma kabiliyetine sahip yetişkin kök hücreleridir. Spermatogenez için temel oluşturan SKH milyonlarca sperm oluşumunu sağlamakla kalmayıp testiste germ hücre hattının bütünlüğünü de korumaktadır. Ayrıca SKH embriyonik kök hücre (EKH) benzeri olup pluripotent özelliklere sahiptir. Yapılan hayvan çalışmalarında; SKH'nin uygun ortamda indüklendikleri takdirde her üç germ yaprağından meydana gelen dokulara dönüşebileceği gösterilmiştir (4-7). Dişi germ hattındaki kök hücrelerin proliferasyonu doğumdan

Abstract

Spermatogonial stem cells (SSC) found in male testis is a kind of adult stem cell. These pluripotent cells having self-renewal and differentiation capacity are unique since they genetically contribute to the next generation. Recent studies which have been done on the isolation, characterization and transplantation of SSCs enabled to understand SSC biology and its usage in reproductive and regenerative medicine. Especially studies related to male infertility are quite promising. However, the low amount of SSCs in the testis makes cell culture studies more crucial. Isolating and transplanting cells at high purity and vitality are the most difficult challenges but also the most important steps. Development of a steady and reliable human SSC line and having success in the culture will accelerate SSC studies.

Keywords: Sperm, Stem Cell, Isolation, Spermatogenesis, Infertility

önce sona ermesi nedeniyle, SKH yetişkinlerde bulunan tek germ hattı kök hücreleridir (8).

SKH'ler yetişkin kök hücreleri olmalarından dolayı EKH kullanımında olduğu gibi etik tartışmalara neden olmamaktadır. EKH'ler pluripotensi özelliklerini koruyarak çoğalmalarına rağmen uzun süre kültür ortamında kaldıklarında karyotipleri değişmeye meyillidir ve germ hattı hücresi potansiyellerini de kaybedebilirler, bu nedenden dolayı transgenik model oluşturmada problemler meydana gelmektedir (9-11). SKH'ler germ hücresine dönüşmeye programlı olmaları nedeniyle de daha avantajlıdır. Ayrıca SKH'ler transplantasyon terapilerinde immün red reaksiyonlarını azalttığı için de daha avantajlı ve kullanışlıdır.

SKH genetik materyali bir nesilden sonrakilere aktarma özelliğine sahip olmaları ve diğer karakteristik özellikleri sayesinde transgenik erkek infertilitesinin tedavisi, hayvan elde edilmesi ve gen terapisi gibi pek çok alanda yeni başarılar ve gelişmeler elde etmek açısından büyük önem taşımaktadır. Embriyonik kök hücrelerin kısıtlı kullanımı da göz önünde bulundurulduğunda SKH üzerine yapılan araştırmalar giderek yaygınlaşmakta ve artmaktadır. Ancak temel araştırmaya ve klinik çalışmaların başarılı olabilmesi için SKH'nin tanımlanması, izolasyonu, kültürü ve SKH'nin oluşumlarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı bu makalede, SKH'nin tanımlanması, biyokimyasal fenotipi, izolasyonu, kültürü ve SKH'nin büyüme şekline odaklanılmıştır.

Adres / Correspondence : Aysun Sarıkaya
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya
e-posta / e-mail : sarikayaaysun.1990@gmail.com

Spermatogonial Kök Hücrelerin Oluşumu ve Spermatogenez

Spermatogenezis, SKH'nin kendilerini yenilemesini ve SKH'den spermatozoa oluşumunu kapsayan oldukça karmaşık bir süreçtir. Spermatogenezis farelerde postnatal dönemde 5 ile 7 gün arasında başlarken insanda 13 ile 15 yaşları arasında başlamaktadır. Embriyonik gelişimin ikinci haftası boyunca epiblastın içinde oluşan ve daha sonra dördüncü haftada yolk kesesine göç eden primordiyal germ hücreleri (PGH) erişkinde gamet hücrelerinin kökenini oluştururlar. PGH'nin mitoz bölünmeleri, yolk kesesinden gelişmekte olan gonadal kabartılara göçü esnasında ve gonadal kabartılara ulaşıncaya bir süre daha devam eder (12). Gonadal kabartılara ulaştıktan sonra PGH, gonositlere (prospematogonia) farklılaşırlar (13,14). Gonositler, seminifer seks kordları ile çevrelenirken iri bir nukleus ve belirgin bir nukleolus ile ayırt edici özellik kazanırlar. Mitotik olarak sessiz prospematogonia interselüler köprülerle bağlı gruplar halinde bulunurlar. İnterselüler köprülerin varlığı PGH'nin gonositlere farklılaşmasının işareti olarak görülmektedir (15).

Doğuma kadar prospematogonia bölünmeden kalır. Doğumu takiben birkaç gün içinde spermatogenez başlatan çoğalma kaldığı yerden devam eder. Bu hücreler seminifer tübüllerin bazal membranına göç ederek SKH'ye dönüşür (13,14). SKH hayat boyu kök hücre havuzunu sürdürmek için kendini yeniler, germ hücreye farklılaşır veya apoptozla hücre ölümü gerçekleşir (16). Yetişkin testiste normal spermatogenez ve fertilitenin sürdürülmesi, SKH yenilenmesi ve farklılaşması arasındaki dengeye dayanır. Bu iki süreç; kök hücre gen ekspresyonu ile intrinsik olarak ve niş denilen mikroçevreden gönderilen sinyaller ile ekstrinsik olarak kontrol edilir (17).

Niş denilen mikroçevreyi Sertoli hücresi, peritubuler miyoid hücre, Leydig hücresi oluştururlar. Sertoli hücresi, SKH'nin ve germ hücrelerinin beslenmelerini sağlarken spermatogenez destekleyen sinyalleri de yönetir. Sertoli hücresi, Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktörü (GDNF) ve bazik fibroblast büyüme faktörünü (bFGF) salarak in vitro SKH yenilenmesini destekler. Peritubuler miyoid hücre ve Leydig hücresi; koloni-stimulan faktör 1 (CSF1) üreterek GDNF ile sinerjistik etki gösterirler. Leydig hücresi aynı zamanda testosteron üretimi ile gonad gelişimini ve spermatogenezin sürdürülmesini tetikler.

İnsanda Tip A koyu (Adark) ve Tip A açık (Apale) spermatogonyum olmak üzere iki tip farklılaşmamış SKH tanımlanmıştır. Tip A koyu spermatogonyum, kök hücre yenilenmesini yapar veya Tip A açık spermatogonyumu oluşturur. Tip A açık spermatogonyum tip B spermatogonyumu

oluşturur. Tip B spermatogonyum ileri bölünmelerle primer spermatositleri oluşturur (18).

Spermatogonial Kök Hücrelerin Fenotipik Belirteçleri

SKH'nin fenotipik belirteçleri, SKH'nin izolasyonu ve tanımlanmasına katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarla farelerin SKH fenotipik belirteçleri hakkında oldukça fazla bilgi elde edilmiştir, ancak insan hücrelerindeki belirteçler hakkında insan testis dokusuna kısıtlı ulaşım olduğundan çok fazla bilgi mevcut değildir (35). Son yapılan çalışmalarda insan testisinde 10 tane proteinin hücresel lokalizasyonu ve ekspresyonu bulunmuştur. İnsan ve kemirgen SKH'de görülen belirteçlerin GPR125, ITGA6 (CD49f), PLZF, UCHL1, GFRA1 ve THY1 oldukları tespit edilmiştir. Ancak insan SKH; kemirgen spermatogonia ve SKH ile aynı fenotipik özelliğe sahip değildir. Bunun nedeni kemirici spermatogoniada ve SKH'de görülen POU5F1 (Oct4) belirteci insan erkek germ hücrelerinde görülmemektedir. Ayrıca KIT belirteci de insan spermatogoniasında bulunmamaktadır (19).

SKH'nin kendini yenileme ve pluripotensi özelliklerini sağlamada belirli büyüme faktörleri yer almaktadır. Örneğin, GDNF parakrin etkisi ile SKH yenilenmesini ve farklılaşmasını düzenleyen bir moleküldür (20). GDNF ailesi reseptörlerinden GFRA1 ve RET gibi ko-reseptörler SKH için belirteç olarak kullanılır. GFRA1 ve RET sinyalleri, Lin28 kök hücrelerin pluripotensi özelliği ile ilişkili bulunmuştur. Bu sinyaller hem fare hem insan SKH'de bulunmaktadır (21). UTF1 de spermatogonia için bir belirteçtir. SALL4 ve PGP 9.5 insan spermatogoniasında bulunurlarken NANOS2 insan spermatositlerinde bulunur (22-24). SOX3 de insan ve fare SKH'de bulunur ve spermatogonial farklılaşmayı göstermek için gereklidir (25,26).

Günümüzde fare ve insan SKH'nin ekspresyonu için birçok belirteç daha onaylanmamıştır.

Spermatogonial Kök Hücrelerin Klinik Uygulamada Yeri

SKH testislerden izole edilip saklandıkları ve otolog ya da ksenotransplantasyon ile tekrar testise nakledildikleri takdirde pek çok amaç için kullanılabilirler. Deneysel ve kliniğe yönelik olarak yapılan çalışmalar spermatogenezin daha iyi anlaşılabilmesi, transgenik hayvan elde edilmesi ve erkek infertilitesinin tedavisi için olanak sağlamaktadır (27). 1994 yılında SKH transplantasyonun ilk kez farelerde başarıyla gerçekleştirilmesinin ardından infertilite tedavisinde SKH kullanımının yerini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır.

SKH yetişkin vücudunda genetik bilgiyi gelecek nesillere aktarabilme özelliğine sahip tek kök hücre türüdür. SKH'nin biyolojisi ve her üç germ yaprağından meydana gelen dokulara dönüşebilme potansiyelleri bu hücrelerin rejeneratif tıpta kullanım olanaklarını arttırarak infertilite tedavisinin yanı sıra gen terapisi alanında da bu kök hücreleri klinik öneme sahip hale getirmektedir (1-3). Endokrin hastalıklar ve metabolik bozuklukların moleküler genetiği üzerine yapılan çalışmalar bir takım germ hattı hücrelerinde gen mutasyonları olduğunu göstermektedir (28). Doğumla gelen bu hastalıkların engellenmesi için SKH ile yapılacak germ hattı gen terapisi umut vadetmektedir. Germ hattı gen terapisi ayrıca kistik fibrozis, hemofili, orak hücre anemisi, fenilketonüri ve Tay-Sachs gibi pek çok genetik hastalığın tedavisinde de uygulanabilme potansiyeline sahiptir (8).

SKH ile yapılan çalışmalar; transgenik fare üretimi için dişi yumurta hücresi ya da erken embriyoların kullanımı yerine retroviral vektör ile in vitro genetiği değiştirilen SKH kullanımını yönteminin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ekzojen DNA SKH'nin kromozomuyla entegre olduğunda bu hücrelerden farklılaşacak sperm yabancu DNA'yı taşıyacaktır. Böylece yumurta yabancu DNA'yı taşıyan spermle döllendiğinde yavrular da bu geni taşıyabilecektir. Ayrıca bu çalışmalar SKH'deki belirli genlerin fonksiyonlarının araştırılması için de deneysel sistemlerin kurulmasını sağlayacak sağlam bir temel oluşturmuştur (9,29,30).

Spermatogonial Kök Hücrelerin Erkek İnfertilitesi Tedavisinde Kullanımı

Son yıllarda, özellikle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunu takiben, erkek infertilitesi tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Ancak halen pek çok genç ve yetişkin erkek edinsel ve genetik nedenlerden ötürü infertilite problemleriyle karşı karşıyadır. Erkek infertilitesinin başlıca sebepleri; anormal sperm üretimi veya fonksiyonu, obstrüktif azospermi ve bazı gonadotoksinlere aşırı maruziyet olarak görülmektedir (31). Kriptoorşidizm, testis kanseri ve kanser tedavilerinde uygulanan radyoterapi ve kemoterapi de erkek infertilitesinde önemli nedenler arasındadır.

Erkek germ hattı hücreleri yani SKH yetişkin hayatı boyunca sürekli olarak sperm üretme kapasitesine sahiptirler. Son yıllarda, antikanser tedavisi uygulanacak olan erkeklerde puberte öncesi, gençlik ve yetişkinlik dönemlerinde fertilitenin korunması için ya da başka nedenlerden dolayı infertil olan erkeklerde tedavi yöntemlerine ilişkin yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu metotların hepsi SKH kullanımını içermektedir (31,32).

İnsan testisi terapötik ajanlardan ya da zararlı çevresel faktörlerden kolaylıkla etkilenebilen bir

organdır. Fizyolojik apoptoz spermatogenez için yeterli miktarda hücre sayısını ayarlayacak şekilde germ hücrelerinin çoğalmasını kontrol eder. Herhangi bir testiküler toksine maruz kaldığı zaman apoptoz önemli derecede artar ve germ hücrelerinin zarar görmesine veya seminifer epitelin işlevsiz hale gelmesine neden olur (33).

Onkolojik tedavi görecektir yetişkin erkeklerin tedavi öncesinde kriyopreservasyon ile sperm saklama seçenekleri bulunsada az sayıda erkek bu yöntemi tercih edilir. Puberte öncesindeki erkek çocuklar henüz sperm üretimine başlamadıkları için bu olanağa sahip değillerdir (34). Ancak genç hastaların testislerinde puberte döneminde sperm üretimini başlatmaya hazırlanan SKH'ler bulunur. Yeni yapılan çalışmalarla insanda bu hücrelerin saklanıp fertilitenin korunması amaçlanmaktadır (35). Şimdiye kadar SKH transplantasyonu; fare, sıçan, domuz, koyun, köpek ve maymunlar dahil pek çok hayvan türünde başarılı bir şekilde yapılmıştır (30,36-48). Çeşitli hayvan çalışmaları, farklı yaş gruplarındaki donörlerden alınan SKH'nin kriyopreservasyon ile başarıyla saklanabileceğini, çözünme ve transplantasyon sonrası spermatogenik potansiyellerini koruyarak spermatogenez geçirip fonksiyonel spermler üretebileceğini göstermektedir (36,37,49). Shetty ve arkadaşlarının yakın zamanda kemoterapi alan maymunlarda yaptıkları çalışmada; dondurulup saklandıktan sonra transplante edilmiş SKH'de, GnRH antagonisti ile yapılan hormon süpresyonu sonucu spermatogenezin arttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu ilerleme insanlarda SKH transplantasyonun uygulanabilirliğini arttırmakta ve infertilite tedavisi için umut ışığı olmaktadır (50).

İzolasyon, Saflaştırılma ve Kültür

İnsandan ilk kez SKH izolasyonu 6 infertil erkekte gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada izole edilen hücreler dondurma çözme işleminden sonra 6 ay boyunca alıcı fare testisinde kolonize olmayı başarmıştır. 2 ayın sonunda sayılarında azalma gerçekleşen hücrelerde mayotik farklanma gözlemlenmemiştir (51).

Hayvan ve insan hücreleriyle yapılan çalışmalar sonucunda birçok SKH izolasyon prosedürü belirtilmiştir. Fareler ile yapılan çalışmalar her bir farenin 2 x10⁴ veya 3x10⁴ SKH'ye sahip olduğunu, bu yüzden bu hücrelerin tecriidinden sonra saflaştırılmasının ve zenginleştirilmesinin önemli olduğunu göstermektedir (52). SKH'nin izolasyonu için öncelikle testisten alınan doku parçaları mekanik işlemlerle parçalara ayrılır ve daha sonra enzimler yardımıyla ayrıştırılır. 1973 yılında Meistrich ve arkadaşlarının tripsin ve DNaz I kullanımını takip eden yıllarda iki basamaklı enzimatik parçalama yöntemi gündeme geldi (53,54). Genellikle kollajenaz I veya 4, tripsin, hyaluronidaz ve DNaz I enzimlerinin birlikte

kullanıldığı iki basamaklı parçalama işleminden sonra testis dokusundan germ hücre süspansiyonu elde edilir. Sonraki aşamada saflaştırma metodlarından biri ya da daha fazlasının kombinasyonu uygulanır (54).

Saflaştırma hücre karakteristiklerindeki büyüklük, yoğunluk ve yüzey markırları gibi farklılıklara dayanarak yapılır. Temelde iki çeşit saflaştırma yöntemi vardır. Magnetik Aktive Hücre Ayırma (MACS) ve Floresan Aktive Hücre Ayırma (FACS) gibi bir grup yöntem SKH fenotipine göre yapılırken diğerleri fiziksel metotlardan yararlanır. Ekstraselüler matriksi seçimi (55) santrifüj ile ayırma (56), Percoll içerisinde dansiteye bağlı santrifüj (57), sedimentasyon hızı (58) bu metotlar arasındadır. Her metodun avantajlarının yanı sıra dezavantajları bulunması sebebiyle araştırmacılar bu yöntemleri kombinleyerek saflaştırma verimini arttırmayı amaçlamaktadır (59). SKH'lar testis içerisinde kendilerini yenileme potansiyeline sahiptirler. Ancak primer kültür ortamında kendini yenileme ve hayatta kalma ile ilgili gerekli faktörlerin bulunmaması sebebiyle bir haftadan fazla yaşayamazlar (60). Yapılan çalışmalarda araştırmacılar GDNF'nin, SKH proliferasyonunda sahip olduğu önemin anlaşılması ile uzun yaşam ömürlü bir hücre hattı kurmayı başarmışlardır (20). Yeni doğan farelerin testiküler hücrelerinin GDNF varlığında embriyonik fibroblastlardan oluşan besleyici (feeder) tabaka üzerinde aylarca yaşayabilmiştir. İnfertil bir fareye transplante edildiğinde de spermatojenik koloniler oluşturduğu ve yavruların meydana geldiği görülmüştür (61). Besleyici tabaka kök hücrelerin yaşayabilmesi için gerekli önemli büyüme faktörlerini salgılamaktadır. Bu amaçla Ver0 hücre kültürü ve embriyonik fibroblastlardan oluşan besleyici tabaka olan STO sıklıkla kullanılmaktadır (62). Kültür ortamına eklenen serum da önem taşımaktadır. Serum eklenen ortamda spermatogonyumların %80'i 2 hafta boyunca canlı kalırken serum olmayan ortamda ancak %20-60 hücrenin hayatta kaldığı görülmüştür (63).

Hou ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada stabil bir insan SKH hattı kurabilmeyi başarmışlardır. RT-PCR, immünohistokimya ve Western blot deneyleri bu hücre hattının insan SKH karakteristiklerine sahip olduğunu kanıtlamıştır. Yaptıkları transplantasyon testleri de bu insan SKH hattının kolonize olmayı başarıp alıcı farede in vivo çoğalabildiğini göstermiştir. Limitsiz proliferasyon yeteneğine sahip ve tümör oluşturmeyen bu hücre hattı SKH mekaniği ve translaşyonel tıp üzerine yapılacak çalışmalar için büyük bir kaynak oluşturacaktır (64).

Spermatogonial Kök Hücrelerin Transplantasyonu

SKH'nin transplantasyonu ilk kez başarıyla 1994 yılında farelerde gerçekleştirilmiştir. Brinster

ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada donör farenin testisinden alınan hücre süspansiyonu içindeki SKH infertil konak fareye enjekte edildiğinde spermatogenez geçirmişlerdir. Dişi fare ile çiftleştirildiğinde de donör farenin genetik özelliklerini taşıyan yavrular meydana geldiği görülmüştür (1). Bu öncül çalışmadan sonra homolog türler arasında olmak üzere sıçan, domuz, keçi, koyun, köpek ve maymun gibi başka hayvanlar üzerinde de bu transplantasyon tekniği uygulanmış ve başarı elde edilmiştir (65).

Homolog türler arasında yapılan çalışmaların yanı sıra farklı türler arasında SKH nakillerinin de (ksenojenik SKH transplantasyonu) yapılabileceği gösterilmiştir. Fare testisine ksenojenik SKH transplantasyonu da pek çok araştırmacı tarafından denenmiştir (66). İlk yapılan çalışmada farklı bir türden (sıçandan) alınan SKH fare semifer tübüllerinde kolonize olmayı başarmış ve farklılaşarak normal sıçan spermi üretebilmişlerdir (67). Yine aynı şekilde, hamster SKH'si de fare testisine başarıyla transplante edilmiştir (68). Diğer donör hayvan türleriyle yapılan çalışmalar hayvan türleri arasındaki filogenetik farklılık arttıkça transplante edilen hücrelerin spermatogenez geçirip farklılaşma miktarlarının azaldığını göstermiştir (66).

SKH transplantasyonu insanda ilk kez Radfort ve arkadaşları tarafından 1999 yılında gerçekleştirilmiştir. Manchester'da yapılan çalışmada 12 erkek non-Hodgkin lenfoma hastasının testiküler dokuları hücre süspansiyonu olarak kemoterapiden önce kriyoprezervasyon yöntemi ile saklanmıştır (69). İlerleyen zamanlarda hastaların yedi tanesinin testislerine hücreler geri verilmiştir (70,71). Bugüne kadar bu hastaların fertilitite durumlarını belirten devam niteliğinde bir çalışma yayınlanmamıştır. Hücrelerin transplante edildiği erkekler çocuk sahibi olsalar bile bunların geri verilmiş kök hücrelerden meydana gelen spermallerden mi yoksa tedavi sonrası hayatta kalmayı başarmış endojen kök hücrelerden mi meydana geldiğini göstermek zor olacaktır. 1999 yılından bu yana insanda SKH transplantasyonu ile ilgili başka çalışma bulunmamaktadır. Buna rağmen bu öncül çalışma hastaların fertilitenin sağlanması için deneysel kök hücre yaklaşımlarını takip ettiği ve desteklediğini göstermektedir (69,71). Bugüne kadar yayınlanan raporlar dünya genelinde puberte öncesi ve yetişkin 150'den fazla erkeğin testiküler doku ya da hücrelerinin kriyoprezervasyon ile saklandığını göstermektedir (69,71-74).

Ksenojenik SKH transplantasyonu çalışmaları insan SKH'si kullanılarak da yapılmıştır. Fare testislerine başarıyla nakledilen insan SKH'si burada sağlıklı bir şekilde çoğalabilmiş ve 6 ay canlı kalabilmişlerdir (51). Ancak burada differensiyasyon olmamış kök hücreler 1 ay sonra spermatogonyumlara dönüşmüş olsalar da daha fazla ilerleme gösterememişler, mayoz geçirememiş

ve apoptoza uğramışlardır. Her ne kadar beklenen başarıya ulaşılamamış olursa da bu çalışma bir takım önemli bilgiler sunmuştur. Transplante edilen insan hücreleri fare Sertoli hücreleri tarafından tanınmış, nakledilen hücreler doğru yere göç edebilmiş, kısa da sürse çoğalabilmiş ve yaşayabilmişlerdir. Gerekli bazı insan büyüme faktörleri ya da insan Sertoli hücrelerinin de fare testisine nakledilmeleri sonucu daha başarılı hale getirebilecektir. Bu yöntemler yardımıyla sitotoksik tedavi alacak erkeklerin SKH'si alıcı testise nakledilebilir ve belki daha uygun bir ortama geçmiş oldukları için daha sağlıklı çoğalarak mayozu girebilir ve burada olgunlaştıktan sonra donör hastaya geri verilebilir (27,51).

Fareler ve sıçanların kullanıldığı çalışmalarda donör kök hücreleri testislere vermek için 3 yöntem geliştirilmiştir. Birinci yöntemde hücreler bir mikropipet kullanılarak seminifer tübüllere verilir ve hücreler rete testisten geçerek diğer tübüllere ulaşır. İkinci yöntemde hücreler mikropipet ile direkt olarak rete testise verilir. Üçüncü yöntemde ise donör hücreler rete testise giden büyük bir efferent kanala enjekte edilir (75). Ancak sığır, maymun gibi büyük hayvanlar ve hatta insan kadavrası üzerinde yapılan çalışmalar seminifer tübül ya da efferent kanallara yapılan enjeksiyonların başarılı olmadığını göstermiştir (76). Bunun sebebi lamina propriyanın yüksek rezistansı ve büyük hayvanlardaki sarmal seminifer tübüllerdir. İnsan testisine SKH enjeksiyonunun en gelecek vadeden yöntemi ultrason eşliğinde rete testise enjeksiyondur (76,77). Kök hücrelerin testis içine enjeksiyonunun başarıyla yapılıp yapılamadığını görmek için ya tek başına ya da hücre süspansiyonu ile birlikte triptan mavisini de testise enjekte edilir. Transplantasyondan sonra testisteki donör kök hücrelerinin çoğalmaları da histolojik muayene ile incelenir. Bilgisayarlı görüntüleme yöntemleri de bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır (78).

Araştırmacılar iki farklı transplantasyon stratejisi üzerinde çalışmaktadır: SKH'nin enjeksiyonu ya da testiküler dokunun greftlenmesi. Testiküler dokunun izole edilip saklanması diğer seçeneğe göre daha avantajlıdır, çünkü bu sayede SKH kendi doğal nişlerinde kalabilecek ve böylelikle germ hücreleri ve destekleyici hücreler arasındaki ilişkiyi koruyabileceklerdir. Bu sebepten bu stratejinin öncelikli olarak kullanılması daha avantajlı olacaktır (79).

Spermatogonial Kök Hücrelerin Dondurulması

Sitotoksik tedavi sonrası SKH transplantasyonu yaptırmak isteyen hastaların kök hücrelerini saklamak için en iyi yöntem kriyoprezervasyon ile hücrelerin saklanmasıdır. Dondurularak saklama yöntemi şimdiye kadar pek çok hayvan türünde ve insanda denenmiş olup başarılı sonuçlar elde

edilmiştir (55). Dondurma işleminde kullanılan yöntem somatik hücreler için kullanılan ile benzerlik göstermektedir. Kontrollü yavaş dondurma protokolünde kriyoprotektan olarak hücrelerin üzerine çok yavaş DMSO eklenir, -70°C'de dondurulur ve sıvı nitrojen içinde saklanır (80). Çözülme takiben hücrelerin yaklaşık %60'ı canlı kalmakta ve kaybolanlar da çıkarıldığında hücrelerin yaklaşık %30'u geriye kalmaktadır. Hamsterlarla yapılan çalışmada kök hücrelerin çözülmesini takiben hücrelerin %43'ü canlı elde edilebilmiştir (68). İnsan testisinden alınan ve DMSO ile dondurulmuş SKH'nin fare seminifer tübüllerine ksenotransplantasyonunda da başarılı sonuç elde edilmiştir (81). Aynı saklama yöntemi kullanılarak fare SKH'lerinin 14 yıldan uzun bir süre korunabildiği gösterilmiştir (82).

Kontrollü yavaş dondurma protokolü zaman alıcı ve pahalı teçhizatlar gerektirdiğinden bu yöntem alternatif olarak kontrolsüz yavaş dondurma protokolü geliştirilmiştir. Fare modelinde başarılı sonuçlar elde edildikten sonra 1.5 M DMSO ve 0.1 M sükröz kullanılarak yetişkin insan testis dokusu üzerinde de denenmiş ve başarılı olmuştur (83). Bu protokol seminifer epitel ve intersitisyel bölümleri ultrastrüktürel seviyede korumanın yanı sıra spermatogonyumların bölünme potansiyelini de korumaktadır. Ancak yöntemin doğrulanması ve güvenilirliğini kanıtlanması için puberte öncesi insan kök hücreleri üzerinde de denenmesi gerekmektedir (79).

Geleneksel dondurma yöntemlerine bir alternatif de vitrifikasyon yöntemidir. Daha yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan kullanılan bu yöntemde buz kristalleri oluşumunu engellemek için ultra hızlı dondurma işlemi yapılır. Yakın zamanda bu yöntem immatür insan testiküler dokusu üzerinde denenmiştir ve sonuçlar, tübüler bütünlüğün ve spermatogonyumların çoğalma potansiyelinin korunabileceğini göstermektedir (84).

Spermatogonial Kök Hücrelerin Klinik Kullanımıyla İlgili Güçlükler

Çeşitli hayvanlar üzerinde SKH transplantasyonunun başarıyla gerçekleştirilmesi bu hücrelerin klinik kullanımda önemli bir yere sahip olacağını göstermektedir. Ancak halen daha SKH ile ilgili üstesinden gelinmesi gereken bir takım güçlükler ve problemler bulunmaktadır. Öncelikle puberte öncesi bir çocuktan biyopsi ile alınan az miktardaki doku parçası çok az sayıda kök hücre içermektedir. Diğer bir problem ise kanser hastalarından alınan dokuda malign kontaminasyon olabileceği gerçeğidir.

Kemirgen hayvanlar ile yapılan çalışmalarda; SKH kültür ortamında başarıyla çoğaltılmışlar ve transplantasyonu takiben spermatogenez geçirip fertilite tedavisinde etkin olmuşlardır. İnsan

SKH'sini kültür ortamında çoğaltmak ve stabil hücre hatları oluşturmak üzere yapılan çalışmalar hızla devam etmekte ve gelecek vadetmektedir (64,74,81,85). Kültürde başarılı olduğu takdirde biyopsi ile alınan az miktardaki hücre çoğaltılabilecek ve ayrıca malign kontaminasyon tespiti de daha kolay yapılabilecektir (64,65).

Testiküler dokuda olabilecek malign kontaminasyon hastalar için büyük endişe uyandırmaktadır. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalar göstermiştir ki heterojen testiküler hücre süspansiyonundan kök hücreleri izole edip malign hücreleri uzaklaştırmak; FACS yöntemi ve germ hücresi veya kanser hücresi belirteçlerinin kombinasyonu ile mümkün olabilmektedir (86-91). Olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, çok az seviyedeki kontaminasyon durumlarında bile tekrar kansere neden olabilmektedir. O yüzden kontaminasyonun tespiti ve temizlenmesi için alternatif ve daha güvenilir yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir (71,92).

Sonuç

SKH kendini yenileme ve farklanma kapasitesine sahip, gelecek nesillere genetik olarak katkı sağlayacak pluripotent kök hücrelerdir. Yapılan birçok çalışmaya rağmen hala SKH'ler hakkında yeterli bilgiye sahip olunmamaktadır. Son 10 yıl içerisinde SKH'lerin karakterizasyonu, kültürü, genetik modifikasyonu konularında önemli ilerlemeler gerçekleşmiş olmasına rağmen bunlar yeterli düzeyde değildir. Klinik çalışmaların ilerleyerek SKH'ların infertilitede kullanılacak bir tedavi seçeneği haline gelebilmesi için SKH biyolojisi hakkında yeterli bilgiye sahip olunması gerekmektedir. İlerleyen dönemlerde bu çalışmalar ışığında SKH'ların erkek infertilitesinde alternatif bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. Brinster RL and Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91:11298-302.
2. Brinster RL and Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91:11303-7.
3. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:16489-94.
4. Glaser T, Opitz T, Kischlat T, et al. Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. Stem Cells. 2008; 26:2434-43.
5. Izadyar F, Pau F, Marh J, et al. Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. Reproduction. 2008; 135:771-84.
6. Seandel M, James D, Shmelkov SV, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+germline progenitors. Nature. 2007; 449:346-50.

7. Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature. 2006; 440:1199-203.
8. Kubota H, Brinster RL. Technology Insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006; 2:99-108.
9. Liu X, Wu H, Loring J, et al. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. Dev Dyn. 1997; 209:85-91.
10. Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi P. P. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. Transgenic Res. 1997; 6:321-8.
11. Humpherys D, Eggen K, Akutsu H, et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. Science. 2001; 293:95-7.
12. T.W.Sadler. Gametogenez: Germ hücrelerinin Erkek ve Dişi Gametlere Dönüşmesi. Langman Medikal Embriyoloji. 2011; 11. baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık.
13. McCarrey JR. Development of the germ cell. In: Cell and Molecular Biology of the Testis. 1993; pp 58-89. Oxford University Press, Oxford, UK.
14. Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. Lab Invest. 2006; 86:654-63.
15. Massimo De Felici. Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. G. Coticchio et al. eds. Oogenesis. 2013; pp 19-37. Springer London.
16. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91:11287-9.
17. Dadoune JP. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? Folia Histochem. Cytobiol. 2007; 45:141-147.
18. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. Birth Defects Res. 2009; 87:27-34.
19. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. Biol Reprod. 2010; 82:363-72.
20. Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. Science. 2000; 287:1489-93.
21. Zheng K, Wu X, Kaestner KH, Wang PJ. The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. BMC Dev Biol. 2009; 9:1-11.
22. van Bragt MP, Roepers-Gajadien HL, Korver CM, et al. Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. Reproduction. 2008; 136:33-40.
23. Gassei K, Orwig KE. SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. 2013; PLoS ONE. 8:e53976.
24. Wang YL, Liu W, Sun YJ, et al. Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. Mol Reprod Dev. 2006; 73:40-9.
25. Raverot G, Weiss J, Park SY, Hurley L, Jameson JL. Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. Dev Biol. 2005; 283:215-25.
26. Chen B, Wang YB, Zhang ZL, et al. Xeno-free culture of human spermatogonial stem cells supported by human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells. Asian J Androl. 2009; 11:557-65.
27. Prof. Dr. Kaan AYDOS. Androloji'nin yeni bir uğraş alanı; Spermatogonial Kök Hücre Nakli. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Infertilite Araştırma ve Uygulama Merkezi
28. Barzon L et al. New perspectives for gene therapy in endocrinology. Eur J Endocrinol. 2000; 143:447-66
29. MIAO Xiang-yang. Production of Transgenic Animals Using Spermatogonial Stem Cells. Agricultural Sciences in China. 2011; 10(5):762-8.

30. Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:13090–5.
31. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Med*. 2008; 14(11):2197–213.
32. Itman C, Mendis S, Barakat B, Loveland KL. All in the family: TGF- β family action in testis development. *Reproduction*. 2006; 132(2):233–46.
33. Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005; 34:6–8.
34. L.R. Schover, K. Brey, A. Lichtin, L.I. Lipshultz, S. Jeha. Knowledge and experience regarding cancer, infertility, and sperm banking in younger male survivors. *J Clin Oncol*. 2002; 20:1880–9.
35. Guo Y, Hai Y, Gong Y, Li Z, He Z. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol*. 2014; 229(4):407-13.
36. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*. 2000; 6:29–34.
37. Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*. 2012; 11:715–26.
38. Richardson TE, Chapman KM, Tenenhaus Dann C, Hammer RE, Hamra FK. Sterile testis complementation with spermatogonial lines restores fertility to DAZL-deficient rats and maximizes donor germline transmission. *PLoS One*. 2009; 4:6308.
39. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock ME, Brinster RL. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:6186–91.
40. Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod*. 2003; 69:412–20.
41. Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, et al. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod*. 2003; 69:1260–4.
42. Izadyar F, Den Ouden K, Stout T, et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2003; 126:765–74.
43. Mikkola M, Sironen A, Kopp C, et al. Transplantation of normal boar testicular cells resulted in complete focal spermatogenesis in a boar affected by the immotile short-tail sperm defect. *Reprod Domest Anim*. 2006; 41:124–8.
44. Kim Y, Turner D, Nelson J, Dobrinski I, McEntee M, Travis AJ. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction*. 2008; 136:823–31.
45. Herrid M, Olejnik J, Jackson M, et al. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biol Reprod*. 2009; 81:898–905.
46. Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Hum Reprod*. 2002; 17:55–62.
47. Jahnukainen K, Ehmcke J, Quader MA, et al. Testicular recovery after irradiation differs in prepubertal and pubertal non-human primates, and can be enhanced by autologous germ cell transplantation. *Hum Reprod*. 2011; 26:1945–54.
48. Kanatsu-Shinohara M, N. Ogonuki, K. Inoue, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*. 2003; 69:612–6.
49. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev*. 2000; 57:270–9.
50. G. Shetty, Uthamantil RK, W. Zhou, et al. Hormone suppression with GnRH antagonist promotes spermatogenic recovery from transplanted spermatogonial stem cells in irradiated cynomolgus monkeys. *Andrology*. 2013; 1:886–98.
51. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril*. 2002; 78:1225-33.
52. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Morimoto T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. *Biol Reprod*. 2003; 68:1801–7.
53. Meistrich ML, Bruce WR, Clermont Y. Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Exp Cell Res*. 1973; 79:213-27.
54. Barcellona WJ, Meistrich ML. Ultrastructural integrity of mouse testicular cells separated by velocity sedimentation. *J Reprod Fertil*. 1977; 50:61-8.
55. Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*. 2014; 147:R65–R74.
56. Grabske RJ, Lake S, Gledhill BL, Meistrich ML. Centrifugal elutriation: separation of spermatogenic cells on the basis of sedimentation velocity. *J Cell Physiol*. 1975; 86:177-89.
57. Meistrich ML, Trostle PK. Separation of mouse testis cells by equilibrium density centrifugation in renografin gradients. *Exp Cell Res*. 1975; 92:231-44.
58. Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol*. 1977; 74:68-85.
59. Pedro Manuel Aponte. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2015; 26; 7(4):669–80.
60. Orwig, KE, Avarbock MR, Brinster RL. Retrovirus-mediated modification of male germline stem cells in rats. *Biol Reprod*. 2002; 67:874–9.
61. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, et al. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*. 2005b; 132:4155–63.
62. Jeong D, McLean DJ, Griswold MD. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells. *J Androl*. 2003; 24:661-9.
63. 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; 61:225-30.
64. Hou J, Niu M, Liu L, et al. Establishment and Characterization of Human Germline Stem Cell Line with Unlimited Proliferation Potentials and no Tumor Formation. *Sci Rep*. 2015; 20; 5:16922.
65. Hanna Valli, Bart T. Phillips, Kyle E. Orwig, Kathrin Gassei, Makoto C. Nagano. Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Fourth Edition. Pages 595-635.
66. Honaramooz A, Yang Y. Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals. *Vet Med Int*. 2010; 2011: pii: 657860.
67. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*. 1996; 381:418–21.
68. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod*. 1999; 60:515-21.
69. Radford J, Shalet S, Lieberman B. Fertility after treatment for cancer. *BMJ*. 1999; 319:935–6.
70. Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*. 2001; 75:269–74.

71. Radford J. Restoration of fertility after treatment for cancer. *Horm Res.* 2003; 59(Suppl 1):21–3.
72. Wyns C, Curaba M, Petit S, et al. Management of fertility preservation in prepubertal patients: 5 years' experience at the Catholic University of Louvain. *Hum Reprod.* 2011; 26:737–47.
73. Ginsberg JP. New advances in fertility preservation for pediatric cancer patients. *Curr Opin Pediatr.* 2011; 23:9–13.
74. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA.* 2009; 302:2127–34.
75. Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol.* 1997; 41:111–22.
76. Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod.* 1999; 14:144–50.
77. Faes K, Tournaye H, Goethals L, Lahoutte T, Hoorens A, Goossens E. Testicular cell transplantation into the human testes. *Fertil Steril.* 2013; 100:981–8.
78. Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod Dev.* 1999; 53:142–8.
79. Goossens E, Van Saen D, Tournaye H. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Hum Reprod.* 2013; 28 (4): 897–907.
80. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med.* 1996; 2:693–6.
81. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AM. In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA.* 2011; 305:2416–8.
82. Wu X, Goodyear SM, Abramowitz LK, et al. Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Hum Reprod.* 2013; 27:1249–59.
83. Baert Y, Goossens E, van Saen D, Ning L, In't Veld P, Tournaye H. Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol. *Fertil Steril.* 2012; 97:1152–7.
84. Curaba M, Poels J, van Langendonck A, Donnez J, Wyns C. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification. *Fertil Steril.* 2011; 95:2123.
85. Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, et al. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:21672–7.
86. Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, et al. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest.* 2005; 115:1855–61.
87. Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, et al. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer Res.* 2006; 66:11166–71.
88. Hou M, Andersson M, Zheng C, Sundblad A, Soder O, Jahnukainen K. Decontamination of leukemic cells and enrichment of germ cells from testicular samples from rats with Roser's T-cell leukemia by flow cytometric sorting. *Reproduction.* 2007; 134:767–79.
89. Dovey SL, Valli H, Hermann BP, et al. Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells. *J Clin Invest.* 2013; 123:1833–43.
90. Hermann BP, Sukhwani M, Salati J, Sheng Y, Chu T, Orwig KE. Separating spermatogonia from cancer cells in contaminated prepubertal primate testis cell suspensions. *Hum Reprod.* 2011; 26:3222–31.
91. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat.* 1966; 118:509–24.
92. 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; 22:733–42.