

مطالعه مورفولوژی و مورفومتری بیضه موش بالغ بدنبال تجویز مقادیر

مختلف بوسولفان

فهیمة محمدقاسمی (M.Sc.)^۱، جعفر سلیمانی راد (Ph.D.)^۲، احمد علی قنبری (Ph.D.)^۳.

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد، گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۳- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: داروهای ضد سرطان می‌توانند باعث اختلال اسپرماتوژنز شوند. آگاهی از نحوه عمل آنها برای جلوگیری از تخریب اپیتلیوم ژرمینال ضروری است. با توجه به اینکه یافته‌های کمی می‌توانند پاسخ مهمی برای سوالاتی در زمینه فیزیولوژی بیضه و همچنین کمک موثری برای درک بهتر و کاملتر اسپرماتوژنز باشند مطالعه حاضر با هدف بررسی مورفولوژیک و مورفومتریک بیضه، حجم و دانسیته حجمی پارامترهای بیضه، اندازه‌گیری اقطار لوله سمینیفروس و مطالعه کمی سلول‌های ژرمینال و سوماتیک در بیضه موش بدنبال تجویز دوزهای مختلف بوسولفان انجام گرفت.

روش بررسی: در مطالعه حاضر ۴۲ موش نژاد NMRI با سن ۶-۸ هفته مورد آزمایش قرار گرفتند. حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند. حیوانات در گروه‌های آزمایش اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک دوز mg/kg ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ بوسولفان و حیوانات کنترل فقط حلال بوسولفان را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. پس از گذشت ۳۵ روز، حیوانات را کشته و از بیضه آنها نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها جهت بررسی با میکروسکوپ نوری تحت پاساژ و رنگ‌آمیزی قرار گرفتند. سپس مطالعات مورفومتریک بیضه انجام شد و پس از آن، جهت تحلیل داده‌ها از آنالیز یکطرفه استفاده شد و $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز بوسولفان در هر سه دوز mg/kg ۲۰، ۱۰ و ۴۰ می‌تواند عمده پارامترهای مورفومتریک بیضه را کاهش دهد و با افزایش دوز، این اثرات واضح‌تر و شدیدتر می‌گردد. حجم بیضه، توبولها و اپیتلیوم ژرمینال در گروه‌های آزمایش به طور معنی‌دار کاهش ($p < 0/05$) و حجم و دانسیته حجمی بافت بینابینی افزایش یافت ($p < 0/05$). قطر توبولها و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال در گروه‌های آزمایش به طور معنی‌داری کاهش نشان داد، ضمن این که قطر مجاری سمی‌نیفروس دارای افزایش بود ($p < 0/001$). در شمارش سلولی، تمام سلول‌های ژرمینال کاهش داشتند؛ در حالی که تعداد سلول‌های سرتولی دچار تغییر نگردیده بود. تعداد سلول‌های لیدیک در گروه‌های تحت درمان با mg/kg ۱۰ و ۲۰ تغییری نداشت؛ ولی در گروه تحت درمان با mg/kg ۴۰، تعداد آنها به طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0/001$). در گروه تحت درمان با mg/kg ۵ چه از نظر مورفولوژی و چه از نظر مورفومتری تغییر خاصی در بافت بیضه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بوسولفان از طریق تأثیر بر سلول‌های ژرمینال و سوماتیک موجود در بیضه می‌تواند در تخریب اسپرماتوژنز و کاهش پارامترهای بیضه نقش داشته باشد و اثرات آن به صورت وابسته به دوز افزایش یابد. بنابراین ضمن استفاده از این دارو در بیماران سرطانی این عارضه نیز باید مدنظر قرار گیرد.

کلید واژگان: اسپرماتوژنز، بوسولفان، مورفومتری، موش، بیضه، سلول‌های ژرمینال، شیمی درمانی.

مسئول مکاتبه: فهیمة محمد قاسمی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، خیابان گلگشت، تبریز، ایران.

پست الکترونیک: ghasemi.histolab@gmail.com

زمینه و هدف

اسپرمتوژنز فرآیندی بسیار پیچیده است که عوامل متعددی می‌تواند بر آن اثر کرده و منجر به ناباروری و یا کاهش باروری در فرد شود (۱). از جمله عوامل دارای آثار سوء بر اسپرمتوژنز شیمی‌درمانی است که با مکانیسم‌های مختلفی با اثر بر روند تقسیمات سلولی در لوله‌های سمی‌نیفروس در نهایت باعث ایجاد آواسپرمی و ناباروری می‌گردد (۲،۳). آواسپرمی به دنبال شیمی‌درمانی عارضه‌ای مهم و قابل توجه است که گاهی بسته به نوع و مقدار مصرف دارو سال‌های طولانی حتی ۲۰-۱۵ سال نیز به طول می‌انجامد (۴). علاوه بر شیمی‌درمانی، عوامل متعددی چون ضایعات پاتولوژی مادرزادی، آتروفی دفران و اپی‌دیدیم، وازکتومی دو طرفه، سندرم سلول سرتولی، توقف بلوغ اسپرم، سندرم کلاین فلتز، آتروفی بیضه در کریپتور-کیدیسم و همین‌طور توقف اسپرمتوژنز به دنبال عوامل دارویی از جمله فاکتورهای دخیل در ایجاد آواسپرمی هستند (۵). بوسولفان یکی از داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی است که دارای خاصیت آلکیل‌کنندگی بوده و عموماً جهت درمان لوسمی مزمن، کانسر تخمدان و همچنین قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی استفاده می‌شود (۶،۷). این دارو جزء گروه مواد دی‌استرهای متان سولفونیک اسید و تحت عنوان ۱ و ۴ بوتان‌دی‌متیل سولفونات می‌باشد (۸). براساس مطالعات انجام شده در جنین و یا نوزاد رت‌های متولد شده از مادران حامله که در دوران بارداری در معرض این دارو بوده‌اند، این دارو باعث اختلال کارکردی گناد و کاهش سلول‌های سوماتیک و ژرمینال بیضه می‌شود (۹،۱۰). استفاده از بوسولفان به صورت تک دوز با مقادیر بالا یعنی $40-50 \text{ mg/kg}$ در موش بالغ باعث القاء آواسپرمی می‌شود (۱۱،۱۲). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که در انسان درمان ترکیبی بوسولفان همراه با

سیکلو فسفاماید^۱ باعث کاهش فعالیت گنادها و اختلالات آندوکرینی می‌شود؛ ضمن این‌که در آن مطالعات هیچ‌گونه بیوپسی بیضه و مطالعه هیستوپاتولوژیک انجام نگرفته است (۱۵-۲،۱۳).

در ارتباط با اثرات توکسیک بوسولفان به تنهایی بر بیوپسی و هیستوپاتولوژی بیضه انسان گزارشات زیادی در دسترس نمی‌باشد. بیشتر مطالعات اثر توکسیک بوسولفان بر بیضه روی مدل‌های جوندگان مانند موش و رت بوده و مخصوصاً در سال‌های اخیر عمدتاً جهت القاء آواسپرمی قبل از پیوند سلول‌های ژرمینال به داخل بیضه در گونه‌های مختلف مطرح شده است (۱۱،۱۲).

به نظر می‌رسد که به دنبال مصرف بوسولفان اختلال ایجاد شده در اسپرمتوژنز، ناشی از خاصیت آلکیل‌کنندگی آن و اثرات عمده آن بر سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی باشد (۶،۷). تغییرات مورفومتریک بافتی مانند تغییرات حجم سلولها و پارامترهای بیضه و تعداد سلول‌های اپیتلیوم ژرمینال بیضه از جمله نکات قابل توجه در مطالعات فیزیولوژی و سم‌شناسی بافت بیضه محسوب می‌شوند و برای درک شروع و پیشرفت اختلالات اسپرمتوژنز و باروری حائز اهمیت می‌باشند (۱۶،۱۷).

تاکنون آزمایشات تجربی متنوعی در زمینه اثرات بوسولفان بر روی اسپرمتوژنز خصوصاً در موش و رت انجام شده است. این مطالعات هم در دوره جنینی و پره‌ناتال (۹،۱۰) و هم در دوره بزرگسالی (۲۱-۱۸) انجام گرفته است. استفاده از بوسولفان به‌عنوان روش دارویی مناسب جهت تخلیه لوله‌های سمی‌نیفروس قبل از پیوند سلول‌های ژرمینال به داخل بیضه به ویژه در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۱۱،۱۲). مطالعات در مورد اثرات بوسولفان عمدتاً به صورت کیفی و هیستوپاتولوژیک بوده است و در

1- Cyclophosphamide

درمان با دوز 40 mg/kg که از ده سر موش استفاده شد. حیوانات در گروه‌های آزمایش به ترتیب تحت درمان با دوزهای $20, 40, 80, 160 \text{ mg/kg}$ و 40 mg/kg بوسولفان (Sigma, USA) به صورت یک دوز داخل صفاقی تزریق شد. جهت حل کردن دارو مطابق مطالعه Udagawa و Xu از DMSO (Sigma, USA) استفاده شد (۲۳، ۲۴). برای این منظور ابتدا 10 mg پودر بوسولفان در 1 ml از DMSO حل نموده و بلافاصله پس از آن 1 ml آب مقطر نیز به آن اضافه شد تا محلولی با غلظت 5 mg/ml به دست آید. سپس براساس وزن حیوان موردنظر تزریقات انجام گرفت. با توجه به این که بوسولفان خیلی سریع رسوب می‌نماید، بنابراین باید این محلول به صورت کاملاً تازه تهیه شده و عمل تزریق نیز سریع انجام شود (۲۳). حیوانات گروه شاهد یک دوز DMSO به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. با توجه به سیکل کامل ۳۵ روزه اسپرما توژنز در موش (۲۵، ۲۶)، ۲۵ روز پس از درمان، حیوانات با کلروفورم بیهوش و پس از پرفیوژن قلبی، بیضه آنها از حفره شکمی خارج شد. نمونه‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در فیکساتیو بوئن در دمای اتاق غوطه‌ور شدند و سپس برای مطالعه با میکروسکوپ نوری (Zise, Germany) پاساژ داده شدند. جهت به حداکثر رساندن تعداد برش‌های مناسب لوله‌های سمی‌نیفروس در مقطع عرضی، بیضه‌ها در جهت محور طولی در پارافین قالبگیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, Germany) مقاطعی با ضخامت $5 \mu\text{m}$ و فواصل منظم $200 \mu\text{m}$ به صورت نمونه‌گیری تصادفی منظم و یکنواخت تهیه گردید. از هر بیضه ۸ اسلاید انتخاب و به طریق هماتوکسیلین ائوزین، رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد (۲۷).

تخمین حجم بیضه: برای اندازه‌گیری، تصاویر از یک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین تهیه و با استفاده از نرم‌افزار مخصوص تخمین حجم انجام گرفت. سپس

موارد مطالعات کمی نیز صرفاً به صورت شمارش سلولی بوده است (۲۰-۱۸). در این بررسیها پس از تجویز تنها یک دوز دارو مطالعات هیستولوژیک در زمان‌های مختلف انجام شده است و به عبارت دیگر مطالعه وابسته به زمان بوده است (۱۹، ۲۰). اگرچه Bucci و همکاران در سال ۱۹۸۷ ارزیابی وابسته به دوز داشته‌اند؛ ولی در ارزیابی خود صرفاً مطالعه هیستولوژیک کیفی لوله سمی‌نیفروس، مطالعه آنومالی کروموزومی اسپرم و موتاسیون‌های کشنده غالب در اسپرمها را انجام داده و در آن مطالعه اشاره‌ای به شمارش سلولی و ارزیابی کمی پارامترهای مختلف بیضه نشده است (۲۱). مطالعات کمی به ویژه در کنار مطالعات مورفولوژیک دارای ارزش و دقت بالاتری هستند (۱۷، ۲۲). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تاثیر بوسولفان به صورت وابسته به دوز از جهت کمی انجام نشده است؛ لذا مطالعه حاضر با هدف مطالعه حجم و دانسیته جمعی توبولها و بافت بینابینی بیضه با روش جدید مورفومتری، اندازه‌گیری اقطار توبولها و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال با کمک آنالیز کامپیوتری و همچنین شمارش سلول‌های ژرمینال و سوماتیک بیضه موش بالغ به دنبال تجویز دوزهای مختلف بوسولفان در کنار مطالعه مورفولوژیک صورت گرفت تا آثار تخریبی بیشترین دوز و کمترین دوز در بیضه مشخص شود.

روش بررسی

در این مطالعه از موش‌های نر نژاد NMRI با سن ۸-۶ هفته استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد حیوانخانه با دسترسی کافی به آب و غذا و دمای مناسب $21 \pm 3^\circ \text{C}$ و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه شامل چهار گروه آزمایش و یک گروه کنترل تقسیم گردیدند. تعداد حیوانات در همه گروهها ۸ سر بود؛ مگر در گروه تحت

اندازه) در هر بیضه انتخاب شد. در هر لوله تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های اولیه، اسپرماتیدهای دراز و گرد مورد شمارش قرار گرفتند. همچنین در بافت بینابینی مربوط به هر بیضه در ۲۰ میدان میکروسکوپی تعداد سلول‌های لیدیگ شمارش شد. جهت شمارش سلولی از میکروسکوپ نوری زایس با بزرگنمایی ۴۰۰ و همچنین مشخصات مورفولوژیک سلولی استفاده می‌گردید (۳۰).

سلول‌های ژرمینال سرتولی در داخل لوله سمی نیفروس و سلول‌های لیدیگ در بافت بینابینی قرار دارند. سلولها از نظر مورفولوژی به صورت زیر گروه‌بندی می‌شدند:

سلول سرتولی: هسته این سلولها کاملاً متفاوت از سلول‌های ژرمینال است. هسته اغلب مثلثی، هرمی نامنظم و یوکروماتین می‌باشد و این سلولها حاوی یک هستک واضح می‌باشند.

اسپرماتوگونی: این سلولها بر روی غشاء پایه قرار دارند و دارای هسته یوکروماتین بیضوی شکل همراه با یک یا ۲ هستک هستند این سلولها دارای دو گروه تیره و روشن هستند و در این مطالعه هر دو نوع سلول تحت یک عنوان بررسی شد.

اسپرماتوسیت اولیه: بین غشاء پایه و سلول‌های گرد کوچک اسپرماتید گرد، در چند طبقه سلول‌های درشت‌تری بنام اسپرماتوسیت اولیه به چشم می‌خورد که هسته آنها در مراحل مختلف میوز، لپتوتن، زیگوتن، پاکوتن، دیپلوتن دیاکینز بودند و در مطالعه ما همه آنها تحت یک گروه اسپرماتوسیت اولیه بررسی می‌شدند.

اسپرماتیدها: این سلولها براساس موقعیت قرارگیری و سایشان به راحتی از اسپرماتوسیت‌های اولیه قابل تشخیص بودند. اسپرماتیدها به لومن نزدیکتر بودند و اندازه کوچکتری داشتند ضمن این‌که فاقد هتروکروماتین بودند به‌طور کلی این سلولها به ۳ دسته قابل تقسیم هستند.

(۱) اسپرماتیدهای گرد که شکل سلولها کاملاً گرد است.

با بزرگنمایی $165 \times$ ، شبکه نقاط گرید استاندارد متشکل از شبکه صلیبی به صورت کاملاً تصادفی و بدون هیچ‌گونه سوگرایی^۱ روی تصاویر بافتی منتقل شد و سپس با شمارش نقاط برخورد گرید با شاخص‌های مورد نظر با استفاده از قانون کوالیری مطابق فرمول $estv = \frac{\sum P \cdot a(p) \cdot t}{M^2}$ حجم بیضه به دست آمد (۳۱،۳۰).

در این فرمول $\sum p$ تعداد نقاط برخورد گرید با شاخص مورد نظر، $a(p)$ مساحت مربوط به اطراف هر نقطه در شبکه، t متوسط ضخامت مقاطع و M^2 مربع بزرگنمایی نهائی می‌باشد (۲۹،۲۸).

برای تخمین چگالی حجمی لوله سمی نیفروس و بافت بینابینی بیضه و نیز محاسبه دانسیته حجمی هر یک از شاخص‌های مورد نظر نیز از تکنیک شمارش نقطه‌ای استفاده شد. مجموع تعداد نقاطی که روی ناحیه مورد نظر قرار می‌گرفت $P(y)$ بر تمام نقاطی که بر کل بیضه منطبق می‌گردید $P(ref)$ تقسیم و پس از ضرب در عدد ۱۰۰، به صورت درصد بیان شد (۲۹،۲۸).

$$Vv_{(y,ref)} = \frac{P(y) \times 100}{P(ref)}$$

اندازه‌گیری قطر مجرا و لوله سمی نیفروس با استفاده از تصاویر حاصل از یک میکروسکوپ نوری (Olympus, Germany) مجهز به دوربین و با استفاده از نرم افزار ویژه انجام گرفت. پس از نخیره تصاویر بافتی، با بزرگنمایی ۱۶۵ برابر در هر مقطع سه میدان و حداقل تعداد ۲۰ لوله در مقطع عرضی در هر بیضه به صورت تصادفی انتخاب و ابتدا اقطار بزرگ و کوچک عمود بر هم در هر لوله اندازه‌گیری و میانگین اقطار بر حسب میکرون ثبت شد. ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال نیز به صورت غیرمستقیم و با کسر قطر مجرای داخلی لوله از قطر لوله سمی نیفروس محاسبه گردید (۲۷).

شمارش سلول‌های ژرمینال، سرتولی و لیدیگ: برای این منظور مقطع عرضی ۲۰ لوله سمی نیفروس (تقریباً یک

توجهی برخوردار و سر حد مجاری لوله منظم بود. همچنین در بافت بینابینی تجمعاتی از سلول‌های لیدیک به همراه عروق و سایر سلول‌های همبندی مشهود بود (شکل ۲). در گروهی که به میزان 5 mg/kg بوسولفان دریافت نموده بودند مشخصات هیستولوژی مشابه گروه کنترل و دارای اسپرماتوژنز فعال بودند و تفاوت خاصی از نظر مورفولوژی با گروه کنترل و مشاهده نداشت و شمارش سلولی نیز در این گروه تفاوت خاصی در تعداد سلول‌های ژرمینال و سوماتیک در مقایسه با کنترل مشاهده نگردید (جدول ۱). در حالیکه در گروه‌های تحت درمان با دوزهای 10 و 20 و 40 mg/kg بوسولفان، درجات متفاوتی از تخریب لوله‌های سمینیفروس، دژنره شدن سلول‌های ژرمینال و ناپدید شدن اسپرم‌های بالغ و اکثر سلول‌های اسپرماتوگونی دیده شد. هسته سایر سلول‌های موجود نیز به صورت پیکنوتیک یا قطره‌ای مشاهده گردید و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال به طور مشخصی کاهش داشت. ضمن این که در ضخامت آن، واکوئل‌های بزرگی (جای خالی سلول‌های ژرمینال از بین رفته) دیده شد. حاشیه مجاری لومن نامنظم بود. همچنین مورفولوژی سلول‌های سرتولی به نظر نامنظم‌تر می‌رسید. با افزایش دوز دارو تغییرات هیستوپاتولوژیک افزایش می‌یافت که این تغییرات در گروه تحت درمان با

اسپرماتید در حال دراز شدن^۱ که شکل آنها نه کاملاً گرد و نه کاملاً دراز می‌باشد. اسپرماتیدهای دراز^۲ دارای هسته کشیده و دم هستند که در مطالعه حاضر اسپرماتیدها در دو گروه یعنی اسپرماتید گرد و اسپرماتید دراز بررسی شدند. سلول‌های لیدیک: این سلولها برخلاف سایر سلول‌های ذکر شده در خارج سمینیفروس و در بافت بینابینی و اغلب به صورت گروهی قابل رویت بودند. سلول‌های لیدیک اسیدوفیل دارای هسته گرد با موقعیت مرکزی و یک یا دو هسته مشخص می‌باشند. آنالیز آماری: به منظور مقایسه آماری، یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد تحلیل قرار گرفتند. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد و مقادیر $p \leq 0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

در بررسی هیستولوژیک گروه کنترل، اسپرماتوژنز فعال در لوله‌های سمینیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در داخل لوله‌ها رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف تقسیم به همراه سلول‌های سرتولی دیده شدند. در این لوله‌ها اپیتلیوم ژرمینال از ضخامت قابل

جدول ۱ - مقایسه میانگین تعداد سلول‌های ژرمینال، سرتولی و لیدیک در گروه‌های تحت درمان با بوسولفان و گروه کنترل

گروه‌های مورد مطالعه (M \pm SD)	کنترل	تحت درمان با 5 mg/kg	تحت درمان با 10 mg/kg	تحت درمان با 20 mg/kg	تحت درمان با 40 mg/kg
شاخص مطالعه					
اسپر ما توگونی	$3/82 \pm 0/8$	$2/22 \pm 1/20$	$2/80 \pm 1/7$	$1/36 \pm 0/5^*$	$0/58 \pm 0/2^*$
سلول سرتولی	$11/08 \pm 1/36$	$10/57 \pm 1/35$	$10/35 \pm 1/60$	$10/46 \pm 1/71$	$10/04 \pm 1/20$
اسپرماتوسیت اولیه	$63/9 \pm 8/3$	$57/86 \pm 6/60$	$33/0 \pm 8/1^*$	$17/8 \pm 3/5^*$	$8/9 \pm 1/8^*$
اسپرماتید گرد	$140/50 \pm 30/26$	$120/18 \pm 22/26$	$69/16 \pm 14/96^*$	$60/89 \pm 11/74^*$	$4/98 \pm 6/08^*$
اسپر ما توزوا	$139/8 \pm 40/77$	$135/8 \pm 21/29$	$34/66 \pm 16/9^*$	$28/22 \pm 9/26^*$	$1/01 \pm 2/86^*$
سلول لیدیک	$23/76 \pm 7/67$	$21/62 \pm 6/81$	$24/97 \pm 6/41$	$28/86 \pm 9/28$	$48/92 \pm 7/43^{**}$

* مقادیر از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.01$). ** ($p < 0.001$)

- 1- Elongating
2- Elongated

جدول ۲- مقایسه میانگین اقطار لوله و لومن سمینی فرس و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال در گروه‌های تحت درمان با بوسولفان و گروه کنترل

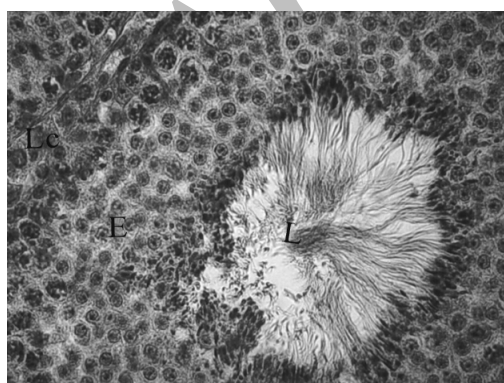
گروه‌های مورد مطالعه (M±SD)	کنترل	تحت درمان با ۵mg/kg	تحت درمان با ۱۰mg/kg	تحت درمان با ۲۰ mg/kg	تحت درمان با ۴۰mg/kg
قطر لومن (μm)	۵۰/۶۷±۵/۶۷	۴۸/۲۸±۵/۱	۵۸/۳±۳/۷*	۶۷/۵±۴/۲*	۷۲/۲±۵/۱۶*
قطر لوله (μm)	۱۶۴/۶±۱۳/۴۷	۱۶۰/۷۸±۱۲/۳۵	۱۳۹/۴±۹/۵*	۹۹/۹۶±۸/۰۱*	۸۴/۴۶±۷/۳۱*
ضخامت اپیتلیوم (μm)	۱۱۶/۷۶±۱۰/۹۷	۱۱۲/۴۹±۱۴/۲۲	۸۰/۷۰±۹/۴۷*	۳۲/۴۲±۸/۲۹*	۱۳/۱۳±۶/۲۰*

* مقادیر از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند (p<۰/۰۰۱).

که در گروه تحت درمان با ۴۰mg/kg، تعداد سلول‌های لیدیک به طور معنی‌داری افزایش داشت (p<۰/۰۱)، ضمن اینکه هیچ‌گونه تفاوتی در تعداد سلول‌های سرتولی در هیچ یک از گروه‌ها دیده نمی‌شد (جدول ۲). براساس یافته‌های مورفومتریک که در جدول ۲ خلاصه آنها ارائه شده است، در گروه تحت درمان با ۵ mg/kg تفاوت خاصی در اندازه اقطار لوله‌ها مشاهده نگردید (البته لازم به ذکر است حجم پارامترهای بیضه در این گروه ارزیابی نشد)؛ در حالیکه میانگین قطر لوله‌ها و ضخامت اپیتلیوم در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۴۰ mg/kg، ۲۰ و ۱۰ به طور معنی‌داری کاهش نشان می‌داد و این کاهش با افزایش دوز افزایش می‌یافت (p<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر یافته‌های مورفومتریک موید یافته‌های مورفولوژیک بود.

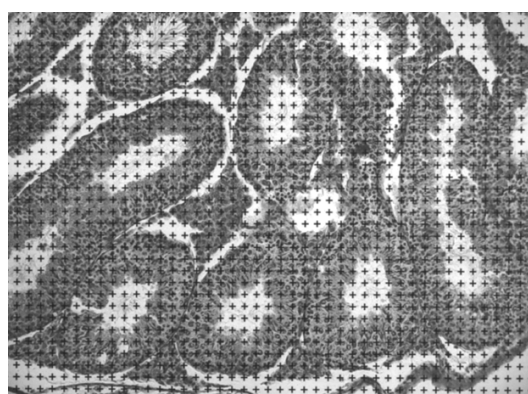
همچنین براساس یافته‌های حجمی که در جدول شماره ۳ خلاصه آنها ارائه شده است، حجم لوله‌های سمی‌نیفرس، حجم اپیتلیوم ژرمینال و دانسیته حجمی

۴۰mg/kg در میزان حداکثر بود. در این گروه در بسیاری از لوله‌ها عمدتاً سلول سرتولی وجود داشت و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال بسیار کاهش یافته بود. ضمناً در گروه تحت درمان با ۴۰ mg/kg تعداد دو حیوان در طی مطالعه در روزهای ۱۹ و ۳۰ از شروع درمان از بین رفتند و از مطالعه خارج شدند (شکل ۳). در گروه‌های ذکر شده در بافت بینابینی تفاوت قابل ملاحظه مورفولوژیکی در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد؛ ولی تعداد سلول‌های بافت بینابینی در گروه تحت درمان با ۴۰ mg/kg بیشتر بود. در مطالعه کمی در گروه تحت درمان با ۱۰mg/kg، به جز سلول‌های اسپرماتوگونی سایر سلول‌های ژرمینال کاهش معنی‌داری داشتند. تعداد تمامی سلول‌های ژرمینال در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۴۰ mg/kg و ۲۰ در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). تعداد سلول‌های لیدیک در گروه‌های تحت درمان با ۴۰ mg/kg و ۲۰ و ۱۰ در مقایسه با کنترل تغییر نداشت؛ در حالی



شکل ۲- فوتومیکروگراف از لوله سمی‌نیفرس موش گروه کنترل. به اسپرماتوژنز فعال در لوله‌ها و حضور سلول‌های متنوع ژرمینال توجه نمایند. مجرا (L) و سلول لیدیک (Lc)، اپیتلیوم ژرمینال (E)، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین.

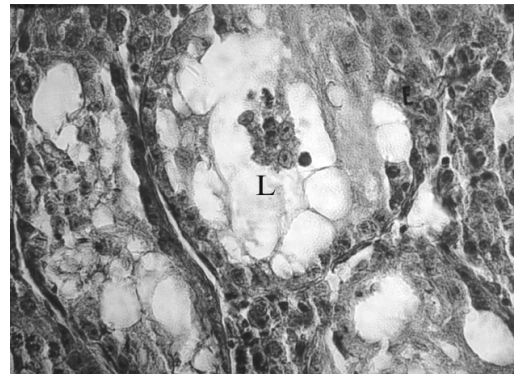
بزرگنمایی ×۶۶.



شکل ۱- بافت بیضه موش کنترل همراه با شبکه نقاط با علامت صلیبی روی آن که برای محاسبه حجم مورد استفاده قرار می‌گیرد بزرگنمایی ×۱۶۵.

یکنواخت است بنابراین همه اجزای موجود در بیضه دارای شانس یکسانی برای نمونه‌برداری هستند. (۲) در این روش نمونه‌برداری به صورت بدون سوگیری^۱ است چرا که هیچ گونه پیش فرض قبلی در مورد شکل اندازه و یا جهت قرارگیری سلول‌های موجود در بافت وجود ندارد (۱۶،۱۷).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که درمان با دوز پائین بوسولفان (5 mg/kg) تغییر خاصی از نظر مورفولوژیک و مورفومتریک در بیضه موش بالغ ایجاد نمی‌کند در حالیکه حیوانات تحت درمان با 40 mg/kg ، 20 و 10 بوسولفان دچار اختلال اسپرماتوژنز و آرواسپرمی می‌شوند که این یافته‌ها با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد (۱۱،۱۲،۲۰) که این اثر ناشی از خاصیت آکلیه‌کنندگی DNA توسط این دارو بوده و مکانیسم اثر آن روی سلول‌هایی است که قدرت تکثیری^۲ زیادی دارند لذا بدیهی است که می‌تواند با تخریب شدید سلول‌های اسپرماتوگونی همراه باشد با تخریب سلول‌های اسپرماتوگونی تعداد کل سلول‌های ژرمینال و در نتیجه ضخامت اپیتلیوم لوله‌ها کاهش می‌یابد. در مطالعه حاضر در گروه تحت درمان با 10 mg/kg علیرغم این که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تغییری نیافت ولی سایر سلول‌های ژرمینال به طور معنی‌داری کاهش یافتند که علت احتمالی آن توقف رشد سلولها در مرحله میوز I است و در نتیجه سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد و دراز دچار کاهش معنی‌دار شده‌اند. در گروه تحت درمان با 5 mg/kg هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در تعداد و مورفولوژی سلول‌های ژرمینال و بیضه ایجاد نشد. تجربه حاضر نشان داد که با افزایش دوز دارو میزان تخریب بافت و اختلالات اسپرماتوژنز شدیدتر می‌گردد. در مطالعه حاضر علیرغم این که تعداد کل سلول‌های ژرمینال کاهش یافت اما تعداد سلول‌های سرتولی



شکل ۳- فوتومیکروگراف از لوله سمی‌نیفروس موش بدنبال درمان با 40 mg/kg بوسولفان. به کاهش قطر توبولها، کاهش ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال و افزایش قطر مجرا و تخریب سلول‌های ژرمینال توجه شود. مجرا (L)، بافت بینابینی (I)، سلول لیدیک (LC)، اپیتلیوم ژرمینال (E). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین. بزرگنمایی $\times 160$.

توبولها در گروه‌های تحت درمان با دوزهای 40 mg/kg ، 20 و 10 به صورت معنی‌داری کاهش یافته است؛ در حالی که حجم و دانسیته حجمی بافت بینابینی در گروه‌های تحت درمان با دوزهای 40 mg/kg و 20 افزایش معنی‌دار داشته است.

بحث

بوسولفان دارویی است که در کلینیک جهت درمان لوسمی و قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران استفاده می‌شود (۶،۷). ضمن اینکه در آزمایشات تجربی جهت پیوند سلول‌های ژرمینال نیز استفاده می‌شود (۱۱،۱۲). در مطالعه حاضر جهت بررسی مطالعه کمی و حجم پارامترهای بیضه از نمونه‌برداری تصادفی ساده و یکنواخت و روش کاوالیری استفاده نمودیم که روش ساده و در عین حال کارآمد و قوی برای محاسبه حجم می‌باشد (۱۸،۲۸،۲۹). امروزه مطالعات استریولوژیکی دارای اهمیت و کاربرد زیادی در مطالعه کمی پارامترهای مختلف بیضه هستند چرا که این مطالعات در عین این که ساده و دقیق هستند دارای فوایدی نیز هستند، از جمله اینکه (۱) از آنجائیکه نمونه‌برداری در این مطالعات به صورت تصادفی و

1-Unbiased

2- Self renewal

داروهای ضد سرطان باعث القاء آپوپتوزیز در لوله سمی نیفرس می‌شود (۳۴،۳۵). در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های لیدیک در گروه‌های تحت درمان با 20 mg/kg ، 10 و تغییر نداشت که با مطالعه Aich مشابهت دارد (۲۲). Boujrad در سال ۱۹۹۵ و Janes در سال ۱۹۸۵ عنوان نمودند که تجویز بوسولفان در دوره جنینی و نوزادی باعث کاهش سلول‌های سرتولی و نیز لیدیک می‌شود (۹،۱۰). در مطالعه حاضر عدم تغییر در تعداد سلول‌های لیدیک در دوز 20 mg/kg -۵ و افزایش شدید در دوز 40 mg/kg را می‌توان اینگونه توجیه کرد که اثرات تخریبی بوسولفان بر سلول‌های لیدیک با افزایش دوز بیشتر می‌شود. در دوزهای پائین اثرات تخریبی کم یا در حدی نیست که بر تعداد این سلولها تاثیر بگذارد و در تأیید یافته‌های حاضر، استفاده Aich از دوز پایین این دارو 10 mg/kg و مشاهده نتایج مشابه قابل ذکر است (۱۹). در مطالعه Boujrad و Janes تجویز بوسولفان در دوره جنینی و نوزادی انجام شد و مشاهده گردید که این یافته‌ها احتمالاً ناشی از حساسیت متفاوت داروهای فوق در این مرحله است. با توجه به موارد فوق احتمالاً سن حیوان، غلظت و دوز دارو در میزان و شدت تخریب بافت و سلول مؤثر می‌باشد.

بر اساس مطالعات انجام شده در رت، اولین رده سلول‌های لیدیک در بیضه در طی روز ۱۵ جنینی از سلول‌های مزانشیمی موجود در بیضه منشاء می‌گیرد (۳۶). بدیهی است که بوسولفان بتواند بر روی تکثیر و در نتیجه تمایز سلول‌های مزانشیمی به عنوان پیش‌ساز سلول لیدیک اثر سوء گذاشته و باعث کاهش سلول‌های لیدیک گردد. همچنین سلول‌های سرتولی که در دوره جنینی از اپی‌تلیوم سلوم منشاء می‌گیرند در موشها از روز ۱۶ جنینی تکثیر یافته و به حداکثر تعداد خود در ۲ روز قبل از تولد می‌رسد ضمن اینکه تا ۲ هفته پس از تولد نیز این سلولها افزایش می‌یابند و سپس در طول

تغییری نداشت که این موضوع معرف مقاومت این سلولها است که این یافته با مطالعات Aich و Vecino مطابقت دارد (۱۸،۱۹). در این مطالعه مورفولوژی سلول‌های سرتولی با افزایش دوز بوسولفان بی‌نظمی بیشتری را نشان داد که احتمالاً ناشی از تغییرات مولکولی این سلولها در پاسخ به بوسولفان باشد (۲۳). در تأیید یافته فوق Bar-Shira Maymon و همکارانش در سال ۲۰۰۴ (۳۱) نشان دادند که میزان مارکر CK-18 در سلول‌های سرتولی به دنبال شیمی‌درمانی افزایش می‌یابد و این در حالی است که در اسپرماتوژنز طبیعی پس از بلوغ این مارکر در سلول‌های سرتولی حضور ندارد. بنابراین چنین استنباط می‌گردد که غیرفعال شدن سلول‌های سرتولی به دنبال شیمی‌درمانی ممکن است در اختلال اسپرماتوژنز و ناباروری نقش داشته باشد (۲۳). سلول‌های سرتولی که ۳٪ سلول‌های لوله سمی نیفرس بالغ را تشکیل می‌دهند تنها سلول‌های سوماتیک موجود در لوله‌ها هستند و در ارتباط نزدیک با سلول‌های ژرمینال یک محیط مناسب (Niche) برای اسپرماتوژنز را فراهم می‌سازند. این سلولها نقش بسیار مهمی در تکامل نسل سلول‌های ژرمینال و پشتیبانی از این سلولها و حفظ خاصیت عدم تمایز و پر استعداد بودن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگنی را دارا هستند. بنابراین هرگونه تغییر در این سلولها می‌تواند منجر به اختلال و نقص اسپرماتوژنز گردد (۳۲). به دنبال درمان با بوسولفان مهمترین عامل در تخریب سلول‌های اسپرماتوگنی و ژرمینال عدم توازن بین تکثیر سلولی و آپوپتوزیز است. به عبارت دیگر احتمالاً بوسولفان باعث القاء آپوپتوزیز در روند اسپرماتوژنز می‌شود که یافته‌های Choi و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مؤید این مطلب است (۳۳). همچنین بر اساس یافته‌های مطالعات دیگر در درمان با داروی سیس پلاتین^۱ و سیکلو فسفاماید از گروه

1- Cisplatin

دوره زندگی تعداد آنها ثابت می‌ماند (۳۶). با توجه به اینکه بوسولفان دارای خاصیت الکیله‌کنندگی بوده و بر روی سلول‌های با قدرت میتوزی بالا اثر می‌گذارد بدیهی است که تجویز بوسولفان در دوره جنینی و نوزادی بتواند هم با کاهش سلول‌های لیدیگ و هم سرتولی همراه باشد. اما در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های لیدیگ پس از 40 mg/kg افزایش یافت که برای توجیه این مطلب می‌توان گفت با توجه با این که بین سلول‌های سوماتیک بیضه یعنی: لیدیگ؛ میوئید و سرتولی ارتباط عملکردی قوی وجود دارد (۳۶). احتمالاً به دنبال درمان با دوز بالای بوسولفان 40 mg/kg میزان تخریب سلول‌های ژرمینال، تغییر کارکرد سلول‌های سوماتیک و همچنین تغییرات سطوح هورمونی LH, FSH؛ آندروژن و همچنین سایر فاکتورهای مترشحه توسط این سلولها در سطح وسیعتری انجام گرفته است و مجموعه این عوامل با مکانیسم ناشناخته توانسته است منجر به افزایش تعداد سلول‌های لیدیگ به صورت یک پاسخ جبرانی گردد.

در این راستا تمایز سلول‌های دوکی شکل موجود در بافت بینابینی به سلول لیدیگ نیز گزارش شده است (۳۷). یافته‌های مطالعه حاضر با برخی مطالعات دیگر چون کمبود ویتامین A، اشعه X، کریپتورکیدیسم، بسته شدن مجرای انتقال اسپرم از بیضه، گرما و درمان تانگستیت در موش‌های دیابتیک^۱ با افزایش تعداد سلول‌های لیدیگ در بزرگسالی همراه می‌باشد (۴۱-۳۸). براساس یافته‌های Howell به دنبال شیمی درمانی تخریب اپی‌تلیوم ژرمینال به طور غیرمستقیم بر روی کارکرد سلول‌های لیدیگ اثر می‌گذارد (۴۲) که در مطالعه حاضر نیز سلول‌های ژرمینال دچار تخریب شدند.

Boujrad در سال ۱۹۹۵ و Howell در سال ۲۰۰۱ نشان داده‌اند که درمان با بوسولفان مقادیر گنادوتروپین‌های

LH و FSH را افزایش می‌دهد؛ هرچند مکانیسم آن شناخته نشده است. به هر حال، ولی براساس مطالعات انجام شده هورمون LH باعث القاء تمایز سلول‌های لیدیگ شده و به عنوان اصلی‌ترین محرک برای شروع تکامل سلول‌های لیدیگ، هم در دوره بزرگسالی و هم قبل از بلوغ می‌باشد (۳۷) ضمن این که در موارد تجربی افزایش هورمون LH تعداد سلول‌های لیدیگ نیز افزایش می‌یابد (۴۱-۳۸). در این بررسی حجم بیضه، لوله‌های سمی‌نیفروس، اپی‌تلیوم ژرمینال، دانسیته حجمی توبولها و میانگین قطر لوله سمی‌نیفروس در گروه‌های تحت درمان با دوزهای 40 mg/kg ، 20 و 10 آزمایش به صورت معنی‌داری کاهش یافتند. به عبارت دیگر نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که همزمان با کاهش سلول‌های ژرمینال و اپی‌تلیوم ژرمینال حجم بیضه، توبولها و دانسیته حجمی توبولها نیز کاهش می‌یابد، ضمن این که تعداد سلول‌های سرتولی در این بررسی تغییری نکرد. به عبارت دیگر شاید بتوان گفت که حجم بیضه و توبول‌های سمینی‌فروس در موش، وابسته به تعداد سلول‌های ژرمینال می‌باشد. ضمن این که Zhengwei و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که در پریماتها نیز ارتباط مستقیمی بین حجم بیضه و تعداد سلول‌های ژرمینال وجود دارد (۴۳). در مطالعه حاضر همزمان با کاهش پارامترهای فوق‌الذکر حجم و دانسیته حجمی بافت بینابینی در گروه آزمایش تحت درمان با دوزهای 40 mg/kg و 20 افزایش نشان داد که احتمالاً ناشی از تغییرات ادمی بافت بیضه به دنبال افزایش نفوذپذیری عروق خونی به دنبال اختلال در اسپرماتوژنز می‌باشد (۳۶، ۲۳) تغییر در حجم و بافت بینابینی بیضه و اختلالات اسپرماتوژنز ناشی از آن در برخی تحقیقات دیگر نیز به دنبال هورمون درمانی و کریپتورکیدیسم گزارش شده است (۴۴، ۳۷، ۱۶). ضمن اینکه Ballester و Tan نشان دادند که افزایش حجم

1- Diabetic

بافت بینابینی بیضه می‌تواند یک واکنش جبرانی به دنبال کاهش حجم بیضه باشد (۴۱،۴۵).

بررسی کمی تعداد سلولهای اقطار توبولها و حجم بیضه و سایر پارامترهای آن می‌تواند کمک موثری در درک بهتر فرایند اسپرماتوژنز باشد، ضمن این که با این روشها می‌توان ارتباط بین یافته‌های کمی، علائم فیزیولوژیک و بالینی را در مورد کارکرد بیضه بدست آورد (۴۶). از طرف دیگر بررسی حجم بیضه و یا توبولهای آن نه تنها برای تعیین حجم پارامتر مورد نظر و تفسیر کارکرد پاتولوژی بیضه اهمیت دارد بلکه حجم خود به عنوان یک کمیت حد واسط برای تخمین مساحت مقطع، طول توبولها و یا سایر اجزاء موجود در بافت نیز کاربرد دارد، که در درک شروع و پیشرفت اختلالات اسپرماتوژنز و باروری حائز اهمیت است. به عبارت دیگر تعیین حجم بیضه و توبولهای آن شاخص مهمی در تشخیص بلوغ اسپرماتوژنز و پاتولوژی آن است (۴۶،۱۷).

نتیجه‌گیری

۱- به‌طور خلاصه نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز بوسولفان در دوز 5 mg/kg منجر به تغییرات کمی و یا کیفی بیضه موش بالغ نمی‌شود.

۲- تجویز بوسولفان در دوزهای 40 mg/kg و 20 و 10 با تخریب اسپرماتوژنز و لوله‌های سمی‌نیفروس و کاهش عمده پارامترهای لوله سمی‌نیفروس و بیضه (شمارش سلولی، هیستومتری و حجم) همراه است و در دوز 40 mg/kg این اثرات شدیدتر است.

۳- تجویز بوسولفان چه در دوزهای پائین و چه دوز بالاتر تأثیری بر شمارش سول‌های سرتولی موش

بالغ ندارد.

۴- تجویز بوسولفان در دوز 40 mg/kg با مکانیسم ناشناخته‌ای منجر به افزایش سلول‌های لیدیگ در بافت بینابینی می‌شود و این در حالی است که در دوز پائین‌تر فاقد این اثرات هستند.

۵- بررسی ما همچنین نشان داد که نتایج کمی و کیفی حاصل از اثرات بوسولفان بر بیضه با یکدیگر همخوانی دارند و می‌توان از مورفومتری به عنوان روشی کارآمد و دقیق در تعیین تغییرات بافت بیضه به خصوص در آسیب‌شناسی بالینی و مدل‌های تجربی به عنوان یک روش مؤثر در تشخیص و پیش‌آگهی اختلالات اسپرماتوژنز و شرایط باروری استفاده نمود.

بنابراین جهت جلوگیری از تخریب بیضه در بیماران تحت مداوا با این دارو می‌بایستی با احتیاط بیشتری تجویز شود.

بدین ترتیب بررسی تغییرات فراساختاری سلول‌های سوماتیک بیضه (سرتولی- لیدیگ و میوئید).

همچنین تغییرات هورمونی FSH, LH و تستوسترون از جمله مواردی است که در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود. ضمناً با توجه به این که دوز 40 mg/kg بوسولفان با مرگ و میر در موشها همراه می‌باشد لذا دوز 20 mg/kg به‌عنوان دوز مناسب جهت استفاده از آزمایشات تجربی و یا پیوند سلول‌های ژرمینال در موش NMRI توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

با سپاس از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که هزینه‌ها و امکان انجام این تحقیق را تأمین نمودند.

References

1-Nudell D.M., Monoski M.M., Hipshultz L.I. Common medications and drugs: how they affect male fertility.

Urol Clin North Am.2002;29(4):965-73.

2- Howell S.J., Shalet S.M. Spermatogenesis after cancer

- treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr.*2005;(34):12-17.
- 3- Puscheck E., Philip P.A., Jeyendran R.S., Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):173-180.
 - 4- Shetty G., Meistrich M.L. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl cancer Inst Monogr.*2005; (34):36-9.
 - 5- Silber S.J., Rodriguez- Rigau L.P. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil Steril.*1981;36:480.
 - 6- Anderson P.h.O., Knoben J.E., Troutman W.G. Handbook of clinical data. Mc Graw Hill.10th Edition.2002; pp:136-140.
 - 7- Trevor A.J., Katzung B.G., Masters S.B. A long medical book Katzung & Trevors Pharmacology examination and board review. Mc Graw Hill.2002;6th Edition.pp:206-8.
 - 8- Molenaar R., de Rooij D.G., Rommerts F.F, Reuvers P. J., van der Molen H.J. Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. *Biol Reprod.*1985;33(5): 1213-22.
 - 9- Boujrad N., Hochereau-de Riviers M.T., Kamtchouing P., Perreau C., Carreau S. Evolution of somatic and germ cell populations after busulfan treatment in utero or neonatal cryptorchidism in the rat. *Andrologia.* 1995;27(4):223-8.
 - 10- Jansz G.F., Pomerantz D.K. The effect of prenatal treatment with busulfan on in vitro androgen production by testes from rats of various ages. *Can J Physiol Pharmacol.*1985;63(9):1155-8.
 - 11- Brinster R.L., Avarbock M.R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation *Proc Natl Acad Sci USA.*1994;91:11303-7.
 - 12- Honaramooz A., Behboodi E., Hausler C.L., Blash S., Ayres S., et al. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl.* 2005;26(6):698-705.
 - 13- De Sanctis V., Galimberti M., Lucarelli G., Polchi P., Ruggiero L., Vullo C. Gonadal function after allogenic bone marrow transplantation for thalassaemia. *Arch Dis Child.*1991;66(4):517-20.
 - 14- Grigg A.P., McLachlan R., Zaja J., Szer J. Reproductive status in long-term bone marrow transplant survivors receiving busulfan-cyclophosphamide (120mg/kg) *Bone Marrow Transplant.*2000;26(10):1089-95.
 - 15- Afify Z., Shaw P.J., Clavano-Harding A., Cowell C.T. Growth and endocrine function in children with acute myeloid leukaemia after bone marrow transplantation using busulfan/ cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.*2000;25(10):1087-1092.
 - 16- Yang Z.W., Guo Y., Lin L., Wang X.H., Tong J.S., Zhang G.Y. Quantitative (stereological) study of incomplete spermatogenic suppression induced by testosterone undecanoate injection in rats. *Asian J Androl.* 2004;6(4):291-7.
 - 17- Osinubi A.A., Noronha C.C., Okanlawon A.O., Morphometric and stereological assessment of the effects of long-term administration of quinine on the morphology of rat testis. *West Afr J Med.*2005;24(3):200-5.
 - 18- Vecino P., Uranga J.A., Arechaga J. Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma.*2001;217(4):191-8.
 - 19- Aich S., Manna C.K. Histophysiological changes of the testicular tissue due to busulphan administration in the wild Indian house rat. *Acta Biol Hung.*2001;52 (1):105-16.
 - 20- Haddad S., Carvalho T.L., Anselmo-Franci J.A., Petrusci S.O., Favaretto A.L. Ultrasound stimulation of rat testes damaged by busulfan. *Ultrasound Med Biol.* 1997;23(9):1421-25.
 - 21- Bucci L.R., Meistrich M.L. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res.*1987;176(2):259-68.
 - 22- Mandarim-de-Lacerda C.A. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.*2003;75(4):469-86.
 - 23- Udagawa K., Ogawa T., Watanabe T., Yumura Y., Takeda M., Hosaka M. GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *Int J Urol.*2001;8(11): 615-22.
 - 24- Jiang F.X. Behavior of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. *Anat Embryol (Berl).*1998;198(1):53-61.
 - 25- Adler I.D. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutar Res.* 1996;352(1-2):169-72.
 - 26- Cheng Yan C., Mruck D.D. Cell junction dynamic in the testis: sertoli-germ cell interaction and male contraceptive development. *Physiol Rev.*2002;82:825-874.
 - 27- Costa D.S., Paula T.A., Matta S.L. The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Anim Reprod Sci.*2006;91(1-2):173-9.
 - 28- Tae H.J., Jang B.G., Ahn D.C., Choi E.Y., Kang H.S., et al. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) during the breeding and non-breeding seasons. *Vet Res Commun.*2005;29(7):629-43.
 - 29- Gunderson H.J., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S. M, Korbo L., et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts

- and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*.1988;96(10):857-81.
- 30- Hess R.A. Spermatogenesis overview, encyclopedia of reproduction.1999;(4):Academic press University of Illinois at Urbana.pp:534-45.
- 31- Bar-Shira Maymon B., Yogev L., Marks A., Hauser R., Botchan A., Yavets H. Sertoli cell inactivation damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertil Steril*.2004;81(5):1391-1394.
- 32- Shinohara T., Orwig K.E., Avarbock M.R., Brinster R.L., Restoration of spermatogenesis in infertile mice by sertoli cell transplantation. *Biol Reprod*.2003;68(3):1064-71.
- 33- Choi Y.J., Ok D.W., Kwon D.N., Chung J.I., Kim H.C., et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correleates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL-and P53-independent manner. *FEBS Lett*.2004;575(1-3):41-51.
- 34- Sawhney P., Gimmona C.J., Meistrich M.L., Richburg J.H. Cisplatin- induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J Mice. *J Androl*.2005;26(1):136-45.
- 35- Cai L., Hales B.F., Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod*.1997;56(6):1490-7.
- 36- O' Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R. Estrogen and spermatogenesis.2001;22(3):289-318.
- 37- Siril Ariyaratne H.B., Ian Mason J., Mendis-Handagama S.M. Effects of thyroid and luteinizing hormones on the onset of precursor cell differentiation into leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis. *Biol Reprod*.2000;63(3):898-904.
- 38- Benton L., Shan L.X., Hardy M.P., Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*.1995;53(1-6):61-8.
- 39- Mendis- Mandagama S.M.L., Risbridger G.P., de Kretser D.M. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl*.1987;10:525-534.
- 40- Qin D.N., Lung M.A. Morphometric study on leydig cells in capsulotomized testis of rats. *Asian J Androl*.2002;4(1):49-53.
- 41- Ballester J., Dominguez J., Munoz M.C., Sensat M., Rigau T., et al. Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin- diabetic rats. *J Androl*.2005;26(6):706-15.
- 42- Howell S.J., Shalet S.M. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*.2001;7(4):363-9.
- 43- Zhengwei Y., McLachlan R.I., Bremner W.J., Wreford N.G. Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*). *J Androl*.1997;18(6):681-7.
- 44- Meistrich M.L., Wilson G., Huhtaniemi I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis, *Cancer Res*.1999;59(15):3557-60.
- 45- Tan K.A., Walker M., Morris K., Greig I., Mason J.I., Sharpe R.M. Infant feeding with soy formula milk: effects of puberty progression, reproductive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood. *Hum Reprod*.2006;21(4):896-904.
- 46- Petersen P.M., Giwercman A., Gundersen H.J., Pakkenberg B. Efficient and unbiased tools for quantitating laydig and sertoli cells in testes from testes biopsies. *Image Anal Stereol*.2000;19:113-117.