

The Protective Effect of Melatonin on Sperm Parameters, Epididymis and Seminal Vesicle Morphology in Adult Mouse Treated with Busulfan

Mohamadghasemi F., Ph.D.* , Faghani M., Ph.D., Fallah karkan M.

** P.O.Box: 3477, Cellular & Molecular Research Center, Faculty Of Medicine, Guilan University Complex, Tehran-Rasht Road, Rasht-Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the protective effect of melatonin on sperm parameters, epididymis and seminal vesicle morphology in adult mouse under chemotherapy.

Materials and Methods: Male adult NMRI mice were divided into four groups. The control group received a single dose of DMSO, Group 2 received a single dose of busulfan 20 mg/kg. Group 3 was administered melatonin 10 mg/kg for 5 days. Group 4 received a 5 days course of melatonin 10 mg/kg following an initial dose of busulfan 20 mg/kg. Animals were sacrificed 35 days after treatment and evaluations were made by determining of sperm count and sperm quality, histological study of epididymis, seminal vesicle and measuring of plasma testosterone level. Statistical analyses were performed using ANOVA and Tuckey test.

Results: Busulfan significantly reduced sperm count, sperm motility and normal morphology and testosterone level in comparison with that of control group ($P < 0.01$). However, combined treatment increased mentioned parameters in compare with those of chemotherapy treated group ($P < 0.01$). In histological evaluations busulfan resulted in vacuoles in epithelial thickness of epididymis and reduced epithelial cell height in comparison with that of control group ($P < 0.001$). Busulfan reduced semen fluid and epithelial folds and epithelial cell height in seminal vesicle in comparison with those of control group ($P < 0.001$). However, combined treatment, resulted in recovery and normalization of the epididymis and seminal vesicle.

Conclusion: Melatonin has protective effect on epididymal sperm parameters, seminal vesicle and epididymis morphology in mouse under treatment with chemotherapy. Although the mechanism is not clear, it acts probably by decreasing oxidative stresses.

Key words: Melatonin, Busulfan, Morphometry, Epididymis, Seminal vesicle

اثر محافظتی ملاتونین بر پارامترهای اسپرم، ریخت‌شناسی اپیدیدیم و کیسه

منی در موش بالغ تحت درمان با بوسولفان

✍️ **فهیمة محمد قاسمی Ph.D.**، **معصومه فغانی Ph.D.****، **مرتضی فلاح کرکان****

* مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

** آزمایشگاه هیستوتکنیک بخش بافت‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۹

چکیده

هدف: بررسی اثر محافظتی ملاتونین بر پارامترهای اسپرم و ریخت‌شناسی اپیدیدیم و کیسه منی در موش بالغ تحت شیمی‌درمانی **مواد و روش‌ها:** موش‌های نر بالغ به چهار گروه تقسیم شدند. گروه کنترل یک دوز دی متیل سولفوکساید DMSO دریافت کرد. گروه دوم، یک دوز ۲۰ میلی گرم برکیلوگرم بوسولفان دریافت کرد. گروه سوم، به مدت ۵ روز، روزانه ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم ملاتونین دریافت کرده و گروه چهارم به دنبال دریافت یک دوز ۲۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بوسولفان، به مدت ۵ روز، روزانه ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم ملاتونین دریافت کرد. حیوانات ۳۵ روز پس از شروع تیمار تشریح شدند و ارزیابی‌ها از طریق مشخص نمودن تعداد و کیفیت اسپرم اپیدیدیم و مطالعات هیستولوژیک دم اپیدیدیم، کیسه منی و اندازه‌گیری تستوسترون پلازما صورت گرفت. آنالیزهای آماری با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی انجام شد.

یافته‌ها: بوسولفان باعث کاهش معنی‌دار در تعداد و تحرک اسپرم و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم و سطح تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/05$). در حالی که درمان ترکیبی، باعث افزایش پارامترهای نامبرده در مقایسه با گروه تحت شیمی‌درمانی شد ($p < 0/01$). در ارزیابی هیستولوژیکی، بوسولفان باعث ایجاد حفراتی در ضخامت اپیتلیوم اپیدیدیم و کاهش ارتفاع سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم در مقایسه با کنترل شد ($p < 0/001$). بوسولفان باعث کاهش مایع منی و چین‌های اپیتلیالی و کاهش ارتفاع سلول‌های اپیتلیال کیسه منی ($p < 0/001$) در مقایسه با گروه کنترل شد. در حالی که درمان ترکیبی باعث بهبودی و طبیعی‌تر شدن بافت‌ها شد. **نتیجه‌گیری:** ملاتونین دارای اثر محافظتی بر اپیدیدیم و کیسه منی در موش تحت شیمی‌درمانی است. هر چند که مکانیسم نامشخص است، اما احتمالاً این عمل از طریق کاهش آسیب‌های اکسیداتیو صورت می‌گیرد.

کلیدواژه‌ها: ملاتونین، بوسولفان، مورفومتري، اپیدیدیم، کیسه منی

مقدمه

آثار سوء را بر بیضه دارند [۱]. امروزه رژیم‌های شیمی‌درمانی موفق نیز به میزان زیادی بقای بیماران را که از شرایطی مانند سرطان بیضه، هوچکین و لنفومای غیر

عوامل شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اختلالات زیادی در روند اسپرماتوزن ایجاد می‌کنند و در بین این عوامل، داروهایی که دارای خاصیت آلكيله کنندگی هستند، بیشترین

✍️ آدرس مکاتبه: رشت، کیلومتر ۱۰ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، صندوق پستی: ۳۴۷۷

Email: parsahistolab@yahoo.com.au

پروکاربازین، اشعه درمانی، ایندوپردین. گرمای مزمن، دی برومو کلرو پروپان، سیکلوفسفاماید و بوسولفان یا درمان با اشعه [۸ و ۷] می تواند باعث حفظ یا برقراری اسپرم زایی در لوله های سمی نیفروس شود. علاوه بر آن هورمون های دیگری مانند استروژن، تستوسترون و همچنین [۹ و ۱۰] FSH نیز برای حفظ اسپرماتوژنز در حیوانات تحت درمان با شیمی درمانی یا رادیوتراپی استفاده شده اند.

ملاتونین که یکی از ترشحات غده اپی فیز است می تواند در تنظیم برخی پدیده های فیزیولوژیک شرکت نماید. ملاتونین دارای عملکرد نورونی-هورمونی، تنظیم تولید مثل، ایمنی و دما است. علاوه بر این موارد ملاتونین بر تکثیر و تزیاید و تمایز سلولی اثر دارد [۱۱]. رسپتورهای ملاتونین روی اندام های مختلف مانند: مغز، شبکه، سیستم قلبی عروقی، دستگاه گوارشی، کلیه ها، سلول های ایمنی، آدیپوسیت ها، سلول های پوششی پروستات و پستان، سلول های گرانولوزای تخمدان، میومتر رحم، پوست [۱۱ و ۱۲] و دستگاه تناسلی مردانه مانند سلول های پوشش اپیدیم و به میزان کمی روی اسپرماتوزوآ [۱۳] بیان می شود. همچنین در محیط *in vivo* در انسان ها دیده شده که ملاتونین، میزان آسیب های وارده به میتوکندری های اسپرم به دنبال راکتیو های اکسیژن را کاهش می دهد [۱۳]. مطالعات قبلی نشان داده اند که بین ملاتونین و گیرنده های GnRH در موش ها رابطه معکوس وجود دارد و ملاتونین ترشح هورمون تحریک کننده فولیکولی (FSH) و هورمون لوتئینیزه کننده (LH) را کاهش می دهد، به عبارت دیگر می تواند باعث تغییر در محور هیپوفیزی-هیپوتالاموس-گنادی شود. [۱۴] ضمن این که گزارش ها قبلی نشان دهنده این است که ملاتونین دارای خاصیت ضد تکثیری هم روی سلول های زایا [۱۵] و هم روی سلول های دیگر است [۱۶ و ۱۷]. هدف مطالعه حاضر، بررسی نقش احتمالی محافظتی ملاتونین روی پارامترهای اسپرم اپیدیم و سطح تستوسترون پلازما و ریخت شناسی اپیدیم و کیسه منی

هوچکین یا لوسمی رنج می برند، افزایش داده است و عمده این افراد، به ویژه افراد جوان، پس از بهبودی خواهان داشتن فرزند هستند [۲]. بنابراین اختلالات ایجاد شده در باروری به دنبال شیمی درمانی از نظر بالینی اهمیت بالایی دارد. هر چند که حفظ مایع منی به صورت منجمد قبل از شروع شیمی درمانی، روش قابل اطمینانی برای حفظ باروری است، اما کیفیت اسپرم پس از ذوب کردن مایع منی تغییر می کند و در برخی موارد روش های مدرن کمک باروری مانند تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم اووسیت [ICSI] برای باروری مورد نیاز است [۳]. از جمله عوامل شیمی درمانی می توان بوسولفان را نام برد که دارای خاصیت آلیله کننده بوده و برای درمان لوسمی مزمن، سرطان تخمدان و همچنین قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی استفاده می شود [۳]. مصرف این دارو پس از یک یا دو تزریق داخل صفاقی، عمده اسپرماتوگونی ها را از بین می برد [۴]؛ ضمن این که بازگشت باروری در موش های تحت درمان با بوسولفان به صورت مؤثر صورت نمی گیرد زیرا، بافت بیضه و لوله های سمی نیفروس و سلول های زایا به شدت آسیب می بینند [۵].

در سال ۱۹۸۱، گلد (Glode) و همکارانش پیشنهاد نمودند که مهار تقسیم سلول های اسپرماتوگونی و در نتیجه مهار تمایز اسپرماتوگونی ها طی شیمی درمانی، ممکن است باعث محافظت سلول های زایا و در نتیجه حفظ قدرت باروری بیماران شود. او پیشنهاد کرد هر عاملی که بتواند باعث کاهش ترشح FSH و LH شود و بتواند محور هیپوفیزی-هیپوتالاموس-گنادی را مهار کند، احتمالاً می تواند باعث مهار تقسیم سلول های اسپرماتوگونی طی شیمی درمانی شده و در نتیجه این سلول ها را در برابر عوامل مخرب حفظ نماید [۶]. بعدها مطالعات متعددی در این زمینه انجام گرفت و نشان داده شد که مصرف برخی داروهای آنالوگ یا آنتاگونیست هورمون آزاد کننده گنادو تروپینی GnRH، پس از تخریب شدید سلول های زایا به دنبال عوامل گنادو توکسیک مختلف مانند هگزاندیون،

منظور خارج شدن اسپرم‌ها از اپیدیدیم، اپیدیدیم با کمک تیغه جراحی به قطعات کوچک بریده و سپس پتری دیش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد به مدت چهل و پنج دقیقه قرار داده شد.

مطالعه حرکت اسپرم

پس از گذشت نیم ساعت پتری دیش از انکوباتور خارج شد. برای ارزیابی حرکت اسپرم، ۲ قطره از محلول روی یک اسلاید میکروسکوپی چکانده و سپس روی هر کدام یک لامل قرار داده شد. در هر حیوان حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مطالعه و درصد اسپرم‌های متحرک مشخص شد.

مطالعه تعداد اسپرم

۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم روی یک لام نئوبار انتقال داده شده و پس از گذشت چند دقیقه و بی‌حرکت شدن آن‌ها، تعداد اسپرم‌ها در ۵ خانه شمارش شد و به صورت 10^6 بر میلی‌لیتر بیان شد.

مطالعه ریخت‌شناسی اسپرم

یک قطره ۲۰ میکرولیتری از سوسپانسیون اسپرم روی یک اسلاید گسترانده و پس از خشک شدن در هوا در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد و سپس با روش پاپانیکیولا رنگ‌آمیزی شد و پس از چسباندن لامل‌ها روی لام‌ها و خشک شدن آن‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر از نظر ریخت‌شناسی سر و دم ارزیابی شد. ۲۰۰۰ سلول در هر حیوان مطالعه شد و مواردی مانند کوچکی یا بزرگی سر، شکل غیرطبیعی سر یا دو سر بودن و جدایی سر از دم، دم کوتاه، دم بلند، مارپیچی بودن دم، دم خمیده و وجود دو دم به عنوان اشکال غیرطبیعی در نظر گرفته شده و به صورت درصد بیان شد.

موش بالغ تحت درمان با بوسولفان بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۳۲ موش بالغ نر ۸-۶ هفته، نژاد NMRI استفاده شد. حیوانات از مؤسسه رازی خریداری شده و برای تطابق با محیط ۲ هفته در قفس‌های خود با دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد نگهداری شدند. پس از آن حیوانات به ۴ گروه، هر گروه شامل ۸ حیوان تقسیم شدند.

۱- گروه کنترل که به‌میزان 0.5 ml دی‌متیل سولفو اکساید (sigma, USA) ۲ درصد (حلال بوسولفان) به‌صورت تک دوز دریافت نمودند. ۲- گروه تحت تیمار با بوسولفان که به‌میزان 20 mg/kg بوسولفان (sigma, USA)، بصورت داخل صفاقی و تک دوز دریافت نمودند. ۳- گروه تحت تیمار با ملاتونین که به مدت ۵ روز روزانه 10 mg/kg ملاتونین (Sigma-USA) به‌صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. ۴- گروه تحت درمان ترکیبی که ابتدا یک تک دوز 20 mg/kg بوسولفان دریافت کردند و پس از آن به مدت ۵ روز، روزانه 10 mg/kg ملاتونین دریافت نمودند.

۳۵ روز پس از شروع تیمار، همه حیوانات به‌طریقه جابه‌جایی نخاع، کشته شدند و از ورید اجوف تحتانی اقدام به خونگیری شد، سپس اپیدیدیم هر دو طرف و همچنین کیسه منی سمت راست از حفره شکمی خارج و از بافت‌های اطراف جدا شدند و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. از دم اپیدیدیم و کیسه منی سمت راست نمونه بافتی برداشته شد و برای ثبوت در محلول فرمالدئید بافری ۱۰ درصد قرار داده شد.

ارزیابی پارامترهای اسپرم

برای ارزیابی پارامترهای اسپرم از دم اپیدیدیم سمت چپ استفاده شد که به‌داخل پتری دیش حاوی محلول هامز (Ham's-f10) گرم شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. به

مورد مطالعه با هم مقایسه شد. کلیه پارامترهای کمی محاسبه شده با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل شد. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین برای ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر، تیمار با بوسولفان باعث کاهش تعداد اسپرم به میزان $(\times 10^6/mL)$ $10/06 \pm 6/71$ در مقایسه با کنترل $(\times 10^6/mL)$ $2/69 \pm 31/42$ شد. این در حالی بود که میزان ناهنجاری‌های سر و دم اسپرم در مقایسه با کنترل به صورت معنی‌دار افزایش یافت (جدول ۱). همچنین تیمار با بوسولفان به صورت معنی‌دار باعث کاهش درصد تحرک اسپرم از $21/96 \pm 22/34$ در مقایسه با کنترل $4/54 \pm 86/54$ شد. درمان ترکیبی، باعث حفظ پارامترهای نامبرده در اسپرم در مقابل آثار زیانبار بوسولفان شد. علاوه بر این، سبب افزایش تعداد اسپرم $(\times 10^6/mL)$ $22/43 \pm 2/52$ در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان $(\times 10^6/mL)$ $10/06 \pm 6/71$ شد و درصد تحرک اسپرم $3/76 \pm 73/81$ را نیز در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان $21/96 \pm 22/34$ افزایش داد (جدول ۱). همچنین باعث کاهش ریخت‌شناسی غیرطبیعی سر و دم نیز شد. لازم به ذکر است که مصرف ملاتونین به تنهایی، تأثیری بر پارامترهای اسپرم نگذاشت.

اندازه‌گیری تستوسترون

مصرف بوسولفان، باعث کاهش تستوسترون به میزان $2/62 \pm 0/07 \text{ ng/mL}$ در مقایسه با کنترل $(3/59 \pm 0/07 \text{ ng/mL})$ شد. در حالی که مصرف همزمان ملاتونین + بوسولفان، سبب افزایش تستوسترون به میزان $2/92 \pm 0/04 \text{ ng/mL}$ در مقایسه با بوسولفان به تنهایی شد. مصرف ملاتونین به تنهایی تأثیری بر سطح تستوسترون سرم در مقایسه با گروه کنترل نداشت (جدول ۱).

اندازه‌گیری تستوسترون سرم

برای تعیین غلظت تستوسترون، خون جمع‌آوری شده برای مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. سپس نمونه به دستگاه سانتریفوژ منتقل و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه، عمل جداسازی سرم انجام شد. برای تعیین تستوسترون سرم، از روش رادیو ایمنوآسی (RDG, Germany) استفاده شد.

مطالعه بافتی اپیدیدیم و کیسه منی

پس از گذشت سه روز از تثبیت و اطمینان از ثبوت بافتی، نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری پاساژ بافتی شدند. به منظور پاساژ از اتانول با درجات صعودی، گزیلول و پارافین مذاب استفاده شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, Germany) مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. از هر نمونه بافتی ۵ اسلاید انتخاب و به طریق هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus) مطالعه شد. برای تغییرات ضخامت اپیتلیوم اپیدیدیم و قطر لومن اپی دیدیم و همچنین ضخامت اپیتلیوم کیسه منی از گریدهای مدرج خطی که بر لنز چشمی میکروسکوپ نصب و کالیبره شده بود استفاده شد. در هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ مقطع عرضی گرد یا تقریباً گرد اپیدیدیم، انتخاب و مطالعه شد. همچنین برای بررسی تغییرات اندازه و شکل هسته سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم و کیسه منی با کمک لنز چشمی مدرج، با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر، قطر بزرگ (D_1) و قطر هسته (D_2) اندازه‌گیری شد و سپس میانگین قطر هسته از فرمول $d = \sqrt{D_1 \times D_2}$ به دست آمد. در هر حیوان تعداد ۵۰ هسته اندازه‌گیری شد [۱۸].

آنالیزهای آماری

نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های

جدول ۱. اثر ملاتونین و بوسولفان بر پارامترهای اسپرم و سطح تستوسترون پلاسمای موش بالغ

گروه مورد مطالعه	تعداد اسپرم ($\times 10^6 / \text{mL}$)	تحرك اسپرم (%)	ريخت شناسی غير طبیعی سر (%)	ريخت شناسی غير طبیعی دم (%)	سطح تستوسترون (ng/mL)
کنترل	31/42 ± 2/69	87/54 ± 4/54	3/68 ± 0/84	4/08 ± 1/25	3/59 ± 0/07 ^b
بوسولفان	6/71 ± 10/06 ^{abc}	21/96 ± 22/34 ^{abc}	9/96 ± 2/07 ^{abc}	7/55 ± 1/03 ^{ac}	2/62 ± 0/07 ^{abc}
ملاتونین	30/25 ± 3/01	85/01 ± 4/43	3/90 ± 1/16	4/62 ± 0/91	3/52 ± 0/04 ^b
ملاتونین + بوسولفان	22/43 ± 2/52 ^{ac}	73/81 ± 3/76	6/31 ± 0/70 ^a	6/25 ± 1/28 ^{ac}	2/92 ± 0/04 ^{ac}

همه مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است.

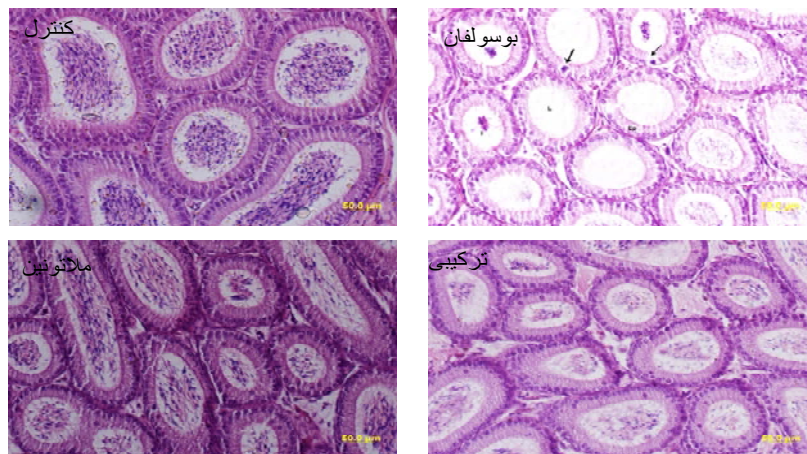
a مقادیر معنی دار در مقایسه با کنترل $p < 0/05$; b مقادیر معنی دار در مقایسه با ملاتونین + بوسولفان $p < 0/05$; c مقادیر معنی دار در مقایسه با ملاتونین $p < 0/01$

ريخت شناسی اپیدیدیم

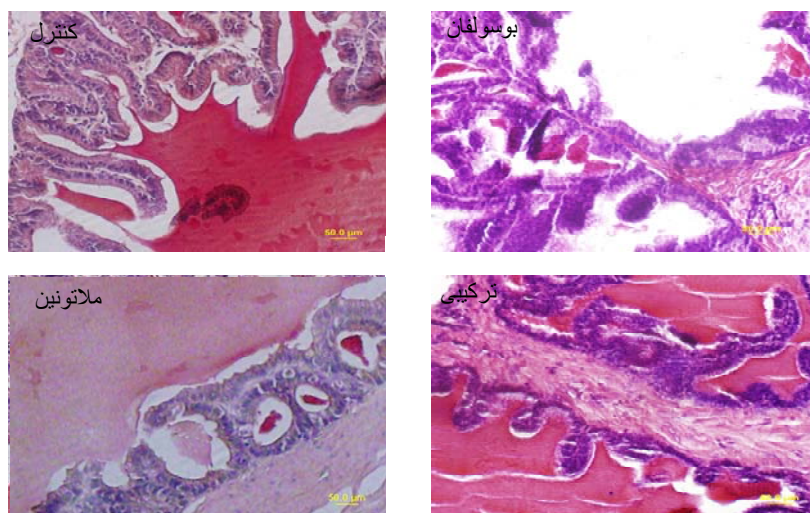
در مطالعه با میکروسکوپ نوری، در نمونه‌های کنترل تعداد زیادی مقاطع عرضی و همچنین تعدادی مقاطع مایل به چشم می‌خورد. در هر مقطع، یک لومن مشخص وجود داشت که حاوی مقادیر زیادی اسپرم بالغ بود. بافت پوششی متشکل از یک ردیف سلول استوانه‌ای بود که سلول‌های آن، دارای قطبیت مشخص بوده و از غشای پایه تا لومن امتداد داشتند. در ناحیه رأسی سلول‌ها، مژه‌های بلند و واضح مشاهده شد. در اطراف غشای پایه، یک ردیف نازک سلول‌های میوئید به چشم می‌خورد. بین لوله‌ها، بافت بینابینی به صورت بافت همبندی سست حاوی سلول‌های همبند و عروق خونی مشاهده شد. (شکل کنترل-۱) در گروه تحت درمان با بوسولفان ساختار بافتی اپیدیدیم حفظ شده بود، یعنی لومن و اپیتلیوم واضح به چشم می‌خورد، با این تفاوت که تراکم اسپرم‌ها در داخل لومن در مقایسه با کنترل کمتر بود. ضمن این که در ضخامت اپیتلیوم در برخی لوله‌ها حفراتی نیز وجود داشت که این حالت در گروه کنترل اصلاً دیده نشد، همچنین به نظر می‌رسید که در بخش رأسی سلول‌های اپیتلیال تعداد مژه‌ها در مقایسه با کنترل کمتر باشند (شکل بوسولفان-۱). در گروه تحت درمان با

ملاتونین تفاوت ریخت‌شناسی خاصی در مقایسه با کنترل دیده نشد (شکل ملاتونین-۱). در گروه تحت درمان ترکیبی، علاوه بر این که تراکم اسپرم‌ها در داخل لومن در مقایسه با گروه تحت شیمی‌درمانی بالاتر بود، در ضخامت اپیتلیوم نیز حفره‌ای به چشم نمی‌خورد. مانند گروه کنترل در بخش رأسی سلول‌های اپیتلیال، مژک‌ها به وضوح دیده می‌شدند. در هیچ یک از گروه‌های آزمایش تفاوت خاصی در بافت بینابینی در مقایسه با کنترل دیده نشد (شکل ترکیبی-۱).

در گروه تحت تیمار با بوسولفان، ضخامت اپیتلیوم اپیدیدیم $1/48 \pm 13/25$ میکرومتر بود که در مقایسه با کنترل $1/03 \pm 17/75$ میکرومتر، کاهش معنی‌دار داشت (جدول ۲). همچنین قطر لوله‌ها در مقایسه با گروه کنترل $154/75 \pm 4/55$ VS $143/63 \pm 4/37$ میکرومتر، کاهش معنی‌داری داشت. در حالی که درمان ترکیبی باعث افزایش قطر لوله به $150/85 \pm 4/9$ میکرومتر، در مقایسه با گروه تحت تیمار با بوسولفان $143/63 \pm 4/37$ شد (جدول ۲). تجویز ملاتونین به تنهایی، بر ریخت‌شناسی و بر مورفومتری اپیدیدیم تأثیری نداشت. قطرهای هسته سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم در گروه‌های آزمایش با کنترل تفاوتی نداشت (جدول ۲).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری از دم اپیدیدیم در موش‌های کنترل، تحت تیمار با بوسولفان، ملاتونین و درمان ترکیبی. در گروه تحت تیمار با بوسولفان به کاهش تراکم اسپرم در داخل لوله‌ها و همچنین کاهش ارتفاع اپیتلیوم در مقایسه با کنترل توجه نمایید. پیکان‌ها نمایشگر حفرات ایجاد شده در ضخامت اپیتلیوم هستند. در گروه درمان ترکیبی به افزایش نسبی تراکم اسپرم در لوله‌ها و از بین رفتن حفرات در ضخامت اپیتلیوم توجه کنید. لومن (L)، سلول اپیتلیال (Ec)، رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین. بار: ۵۰ میکرومتر.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ نوری از کیسه منی در موش کنترل، تحت تیمار با بوسولفان، ملاتونین و درمان ترکیبی. در موش تحت تیمار با بوسولفان به کاهش نسبی انشعابات اپیتلیوم و کاهش ترشحات اسیدوفیل داخل لومن در مقایسه با کنترل توجه نمایید. در موش تحت درمان ترکیبی به افزایش نسبی انشعابات اپیتلیوم و افزایش ترشحات اسیدوفیل داخل لومن در مقایسه با موش تحت درمان با بوسولفان توجه نمایید. رنگ آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین. بار: ۵۰ میکرومتر.

ریخت‌شناسی کیسه منی

در نمونه‌های کنترل، حفره مرکزی بزرگ پر از مایع منی و به صورت ائوزینوفیل به چشم می‌خورد. بافت اپیتلیال از یک ردیف سلول‌های استوانه‌ای اصلی و سلول‌های پایه هرمی تشکیل شده بود و چین‌های اپیتلیومی فراوان و نسبتاً بزرگ که

به سمت لومن امتداد داشت به چشم می‌خورد. در اطراف غشای پایه بافت همبندی دیده شد که در برخی نواحی به سمت حفره مرکزی کشیده شده بود و به عبارتی دیگر محوری برای چین‌های اپیتلیوم تشکیل داده بودند. در گروه تحت درمان با بوسولفان تمام ویژگی‌های بافتی حفظ شده

جدول ۲. اثر ملاتونین و بوسولفان به تنهایی و توأم با هم بر اپیتلیوم اپیدیدیم و کیسه منی موش بالغ

گروه مورد مطالعه	ارتفاع اپیتلیوم اپیدیدیم	قطر لوله اپیدیدیم	قطر هسته سلول اپیتلیال اپیدیدیم	ارتفاع اپیتلیوم کیسه منی	قطر هسته سلول اپیتلیال کیسه منی
کنترل	۱۷/۷۵±۱/۰۳	۱۵۴/۷۵±۴/۵۵	۱۰/۶۲±۱/۰۶	۱۴/۶۸±۰/۷۹	۸/۳۱±۰/۹۵
بوسولفان	۱۳/۲۵±۱/۴۸a	۱۴۳/۶۳±۴/۳۷abc	۹/۸±۰/۸۸	۱۱/۴۰±۰/۷۸abc	۷/۹۱±۰/۲۹
ملاتونین	۱۷/۵۰±۰/۹۲	۱۵۲/۲۷±۴/۸۳	۱۰/۲۱±۰/۹۰	۱۴/۷۵±۰/۵۵	۸/۲۵±۰/۷۵
ملاتونین+بوسولفان	۱۷/۰۸±۰/۶۷	۱۵۰/۸۵±۴/۹۴	۱۰/۷۳±۰/۶۶	۱۳/۹۶±۰/۶۴	۸/۱۸±۰/۷۶

همه مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. کلیه مقادیر بر اساس واحد میکرومتر است.

a: مقادیر معنی‌دار در مقایسه با کنترل $p < 0/01$; b: مقادیر معنی‌دار در مقایسه با ملاتونین + بوسولفان $P < 0/01$; C: مقادیر معنی‌دار در مقایسه با ملاتونین $p < 0/01$

در مطالعه حاضر، مصرف یک دوز بوسولفان به میزان 20 mg/kg ، باعث کاهش تعداد اسپرم اپیدیدیم شد. این کاهش می‌تواند ناشی از آثار آلکیله‌کنندگی بوسولفان بر سلول‌های اسپرماتوژنیک [۱۹] یا در اثر القای آپوپتوز سلول‌های اسپرماتوژنیک توسط بوسولفان [۲۰ و ۲۱] باشد که باعث کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم می‌شود. کاهش تعداد اسپرم همچنین می‌تواند ناشی از آثار ثانویه بوسولفان در ارتباط با تأثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد یا تأثیر توکسیک بوسولفان روی سلول‌های سوماتیک بیضه باشد [۲۲]. مطالعه حاضر همچنین نشان داد که تجویز یک دوز بوسولفان باعث افزایش ریخت‌شناسی غیرطبیعی در سر و دم اسپرم می‌شود. نشان داده شده است که شکل اسپرم به صورت پلی‌ژنتیکی توسط ژن‌های اتوزوم و جنسی زیادی کنترل می‌شود [۲۳]. ضمن این که ناهنجاری‌های مربوط به سر اسپرم با فعالیت‌های جهشی سلول‌های زایا ارتباط دارند [۲۳ و ۲۴] به طور مشابهی درمان با سیکلوفسفاماید باعث افزایش ریخت‌شناسی غیرطبیعی می‌شود [۶ و ۲۶]. در مطالعه حاضر، پارامترهای اسپرم پس از گذشت ۳۵ روز بررسی شد، زیرا فرایند کامل اسپرماتوزن در موش‌ها ۵ هفته طول می‌کشد [۲۵]. مشخص است که طی فرایند اسپرماتوزن سنتز DNA قبل از شروع تقسیم میوز رخ می‌دهد و سنتز دوباره‌ای طی دوره یا سیکل اسپرماتوزن رخ نمی‌دهد [۲۶]. بنابراین در این

بود، با این تفاوت که میزان توده اتوزینوفیل مایع منی در حفره مرکزی کمتر به نظر می‌رسید. چین‌های اپیتلیومی نیز در مقایسه با گروه کنترل کوچکتر بوده و از انشعابات کمی برخوردار بودند. تجویز ملاتونین به تنهایی تأثیر خاصی بر ریخت‌شناسی کیسه منی نداشت. این در حالی بود که در گروه تحت درمان ترکیبی، ریخت‌شناسی کیسه منی شباهت زیادی با گروه کنترل داشت (شکل ۲). علاوه بر تغییرات ریخت‌شناسی، ضخامت اپیتلیوم نیز در گروه تحت درمان با بوسولفان ($11/40 \pm 0/78$ میکرومتر) به صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($14/68 \pm 0/79$ میکرومتر) کاهش یافت؛ در حالی که تجویز درمان ترکیبی، ارتفاع سلول‌های اپیتلیوم کیسه منی را به $13/96 \pm 0/64$ میکرومتر افزایش داد. تجویز ملاتونین به تنهایی تأثیری بر مورفومتری سلول‌های اپیتلیال کیسه منی نداشت. قطر هسته سلول‌های اپیتلیال کیسه منی در گروه‌های آزمایش با کنترل تفاوتی نشان نداد (جدول ۲).

بحث

در مطالعه حاضر آثار بوسولفان و ملاتونین را بر پارامترهای اسپرم، سطح تستوسترون سرم و ریخت‌شناسی اپیدیدیم و کیسه منی بررسی شد که شاخص‌های مهمی برای کیفیت باروری مردانه است و می‌تواند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهد.

مراحل بلوغ خود را در اپیدیدیم طی می‌کنند، تحت تأثیر ملاتونین در اپیدیدیم نیز قرار بگیرند [۱۲]. ملاتونین به عنوان مهم‌ترین ترشح غده اپی فیز و یک آنتی‌اکسیدان بسیار مؤثر و خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد است [۱۱]. ملاتونین به دلیل داشتن اندازه کوچک و خاصیت چربی دوستی زیاد به راحتی از غشای سلول عبور کرده و در کل سلول پخش می‌شود. غلظت آن در هسته سلول بسیار بالا بوده و DNA را در برابر عوامل مخرب حفظ می‌نماید [۱۱]. مطالعه حاضر نشان داد که مصرف ۱۰ mg/kg ملاتونین برای مدت ۵ روز، به صورت همزمان با بوسولفان، آثار سوء بوسولفان را روی اپیدیدیم و کیسه منی کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که بهبودی ارگان‌های نامبرده در گروه آخر که تحت درمان ترکیبی بوده‌اند ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بوده است [۱۱]. همچنین متابولیت‌های ملاتونین یعنی، ان استیل -۵- متوکسی نورآمین نیز رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کند، لازم به ذکر است که ملاتونین، می‌تواند فعالیت یا بروز ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپر اکساید دیس موتاز، گلوکوتایون ردوکتاز و گلوکوتایون پر اکسیداز را تحریک نماید که این امر خود باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی این هورمون می‌شود [۱۱].

به طور مشابه با مطالعه حاضر مصرف ملاتونین در رت‌های تحت درمان با سیس پلاتین پارامترهای اسپرم و اسپرماتوزن را بهبود می‌بخشد [۳۱] و همچنین مصرف ملاتونین در رت‌های دیابتیک تحت درمان با استرپتوزوتوسین [۳۲] و رت‌های تحت اشعه X [۳۳]، آسیب وارده به بیضه را کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که ملاتونین در مطالعه حاضر نیز سمیت و عوارض جانبی بوسولفان را کاهش داده است [۳۴]. در این مطالعه از دوز ۱۰ mg/kg ملاتونین برای ۵ روز استفاده شد که مشابه مطالعه آتساهین و گونلی (Atessahin & Guneli) است [۳۱ و ۳۲] در این مطالعه علاوه بر اپیدیدیم، در کیسه منی نیز تغییرات ریخت‌شناسی و

مطالعه که پس از گذشت ۵ هفته از شروع درمان با بوسولفان، سر اسپرم دچار تغییر شکل شده است؛ بدین معنی است که بوسولفان احتمالاً روی اسپرماتوگونی‌ها مؤثر بوده است. همان‌طور که در مطالعات قبلی نیز شرح داده شده است بوسولفان باعث از بین رفتن اسپرماتوگونی A₁ می‌شود [۲۰ و ۲۱] ضمن این که در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که بیشترین تأثیر آپوتوتیک بوسولفان روی اسپرماتوگونی و پس از آن، اسپرماتوسیت اولیه است [۲۰ و ۲۱]. در تأیید مطالب فوق نشان داده شده که بوسولفان با ریخت‌شناسی غیرطبیعی و موتاسیون‌کننده در اسپرم همراه است [۱۹]. کاهش در تحرک اسپرم در گروه تحت درمان با بوسولفان احتمالاً می‌تواند ناشی از آثار سمی بوسولفان روی فلاژل باشد که یک ماشین مهم برای تحرک اسپرم محسوب می‌شود. ATP که یک منبع مهم انرژی برای تحرک اسپرم است و کاهش آن می‌تواند با کاهش حرکت اسپرم همراه باشد [۲۷ و ۲۸]. درمان ترکیبی با ملاتونین و بوسولفان باعث حفظ پارامترهای اسپرم و اپیدیدیم شد. اپیدیدیم که مخزن نگهداری اسپرم است، مکان مهمی برای بلوغ اسپرم‌ها به شمار می‌آید و ارتباط مستقیمی نیز با اسپرماتوزن دارد. در این مطالعه علاوه بر پارامترهای اسپرم، مورفومتری اپیدیدیم نیز در گروه تحت درمان با بوسولفان کاهش یافت. این تغییرات می‌تواند ناشی از تغییرات هورمونی نیز باشد که در گروه تحت شیمی‌درمانی کاهش هورمون تستوسترون با تغییرات ریخت‌شناسی اپیدیدیم همخوانی دارد. در تأیید یافته فوق در مطالعه چترج (Chatterjee) روی بیماران مبتلا به لنفوم و تحت درمان شیمی‌درمانی، نشان داد که سطح تستوسترون سرم به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد [۲۹]. از آنجا که سلول‌های اپیتلیال اپیدیدیم دارای رسپتور آندروژنی هستند، به تغییرات این هورمون نیز بسیار حساسند [۳۰]. گزارش شده است که رسپتورهای ملاتونین نه تنها روی اسپرماتوزن بلکه روی اپیدیدیم نیز وجود دارند. بنابراین احتمالاً در حالی که اسپرم‌ها

در نتیجه مانع از تاثیرگذاری آثار مخرب بوسولفان بر سلول‌های زایا می‌شود [۶]. قابل ذکر است که گزارش‌های قبلی نشان‌دهنده این است که ملاتونین دارای خاصیت ضد تکثیر هم روی سلول‌های زایا [۱۵] و هم روی سلول‌های دیگر است [۱۶ و ۱۷]. هر چند که مکانیسم‌های ذکر شده ثابت شده نیست و برای اثبات آن‌ها به مطالعات بیشتری در زمینه سلولی، مولکولی و ایمونوهیستوشیمی و فراساختاری نیاز است.

به‌طور خلاصه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ۲۰ mg/kg بوسولفان، باعث کاهش پارامترهای اسپرم اپیدیدیم و ساختار آن و همچنین ریخت‌شناسی کیسه منی می‌شود. تجویز ملاتونین به میزان ۱۰ mg/kg، به مدت ۵ روز از شروع شیمی‌درمانی به میزان قابل توجهی، تغییرات سوء شیمی‌درمانی را بر پارامترهای نامبرده کاهش می‌دهد و نقش حفاظتی خوبی بر آن‌ها دارد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که ملاتونین ممکن است یک نقش مفید و مهم برای کاربردهای بالینی اختلالات کارکردی بیضه و اپیدیدیم و به عبارتی دستگاه تولید مثل مردانه به دنبال مصرف داروهای ضد سرطان داشته باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان برای حمایت مالی این مطالعه و سرکار خانم مژگان بشیری کارشناس آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده پزشکی، برای همکاری صمیمانه در زمینه برش، رنگ‌آمیزی و تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. Human Reprod Update. 2001; 7(4): 363-9.
2. Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. Reprod

مورفومتری ایجاد شد. کیسه منی مقدار زیادی مایع تولید و ترشح می‌کند که ترکیب آن برای هر گونه اختصاصی است، این ترشحات نقش مهمی در روندهای مختلف مانند تشکیل لخته منی، بلوغ اسپرم و دخالت در سرکوب پاسخ‌های ایمنی دارد [۳۵]. تغییرات ایجاد شده در ریخت‌شناسی کیسه منی در این مطالعه می‌تواند ناشی از کاهش تستوسترون سرم باشد چرا که مهمترین هورمون تنظیم‌کننده فعالیت کیسه منی آندروژن است [۳۶]؛ آندروژن‌ها نقش مهمی در شکل‌گیری غده کیسه منی و وقوع تمایز سلولی طی دوران جنینی، تولد و پس از تولد دارد [۳۷].

علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی ملاتونین مکانیسم‌های احتمالی دیگری که باعث حفظ پارامترهای اسپرم و ساختار اپیدیدیم و کیسه منی شده‌اند احتمالاً می‌تواند ناشی از خواص آنتی‌آپوپتوتیک ملاتونین باشد؛ ضمن این که در این مطالعه در ضخامت اپیتلیوم اپیدیدیم در گروه تحت شیمی‌درمانی حفراتی مشاهده شد که این حفرات می‌تواند نشان‌دهنده از دست دادن اتصالات سلولی یا کاهش مولکول‌های چسبنده مانند کاده‌رین‌ها باشد و می‌تواند به عنوان یکی از علایم پره آپوپتوز مطرح شود [۳۸]. البته در گروه درمان ترکیبی و سایر گروه‌ها این حفرات مشاهده نشد. در تایید این مطلب، آثار آنتی‌آپوپتوتیک ملاتونین بر بافت‌های مختلف در چندین آزمایش دیگر نشان داده شده است [۳۲ و ۳۹]. مکانیسم احتمالی دیگر شاید ناشی از خواص آنتی‌پرولیفراتیو ملاتونین باشد، شاید ملاتونین با مهار روند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، روند تمایز آن‌ها را به اسپرماتوسیت مهار می‌نماید و

Toxicol 2001; 15: 611-7 (Review).

3. Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Tamura Y, Kita K, Mitsumasa T, et al. GnRH analog, leuprorelinacetate acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. Int J Urol 2001; 8: 611-5.

4. **Brinster RL, Zimmermann JW.** Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298-302.
5. **Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster R, Orwig KE.** Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod* 2003; 69: 412-20.
6. **Glode LM, Robinson J, Gould SF.** Protection from cyclophosphamide induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *The Lancet* 1981; 23: 1132-4.
7. **Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I.** Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. *J Androl* 2000; 21:464-469.
8. **Meistrich ML, Guanapala SH.** Focus on fertility preservation, Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 2008; 136: 691-701.
9. **Meistrich ML, Shetty G.** Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. *Reproduction* 2008.136: 691-701
10. **Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Tamura Y, Kita K, Kubota Y.** Testosterone administration promotes regeneration of chemically impaired spermatogenesis in rats. *Int J Urol* 2006 ;13:1103-8.
11. **Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, et al.** Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol* 2009; 44: 328-34.
12. **Gwayi N, Bernard RT.** The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia* 2002; 34: 391-6.
13. **Gavella M, Lipovac V.** Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl* 2000; 44 , 1 :23-7.
14. **Johnston JD, Messager S, Ebling FJP, Williams LM, Barrett P.** Gonadotropin releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *PNAS* 2003; 100, 5: 2831-2835.
15. **d'Istria M, Serino I, Izzo G, Ferrara D, De Rienzo G, Minucci S.** Effects of melatonin treatment on Leydig cell activity in the testis of the frog *Rana Esculata*. *Zygote* 2004; 12: 293-9.
16. **Tam CW, Chan KW, Liu VW, Pang B, Yao KM, Shiu SY.** Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J Pineal Res* 2008 ;45 ,4 :403-12.
17. **Pizarro JG, Yeste-Velasco M, Esparza JL, Verdaguier E, Pallàs M, Camins A, et al.** The antiproliferative activity of melatonin in B65 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell cycle-related genes. *J Pineal Res* 2008 ; 45: 8-16.
18. **Mehraein F., Shams A.** The effects of amiodarone of rabbit lung alveolar cells. *Journal Of Iranian Anatomical Sciences* 2006; 1(4): 81-93. (Persian)
19. **Bucci LR, Meistrich ML.** Effects of busulfan on murine spermatogenesis :cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987;176: 259-68.
20. **Choi YJ, Ok Dw, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo Sm, et al.** Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit expression in a fas/fas L and p53 independent manner. *FEBS Lett* 2004; 575: 41-51.
21. **Mohammad ghasemi F, Bahadori MH, Faghani M, Nasiri Ebrahim, Soleimani Rad J.** Anti apoptotic effect of Buscerelin on apoptosis of male germ cells induced by busulfan in mouse testis. *Journal Of Iranian Anatomical Sciences* 2009; 27: 45-54. (Persian)
22. **Shetty G, Meistrich ML.** Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34: 36-9.
23. **Otubanjo AO, Mosuro AA.** An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology by some anthelmintic drugs in mice. *Mutat Res* 2001; 497: 131-8.
24. **Wyrobek AJ, Gordon LG, Burkhart MW, Francis RW, Kapp Jr, G Letz, et al.** An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the US EPA Gen-Tox-Program. *Mutat Res* 1983; 115: 1-72.
25. **Adler Id.** Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res* 1996; 352: 169-72.
26. **Monesi V.** Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of

- mouse testis using tritiated thymidine. *J Cell Biol* 1962; 14: 1-18.
27. **Fouchécourt S, Lareyre JJ, Chaurand P, DaGue BB, Suzuki K, Ong DE, et al.** Identification, immunolocalization, regulation, and postnatal development of the lipocalin EP17 Japididymal protein of 17 kilodaltons in the mouse and rat epididymis. *Endocrinology* 2003; 144: 887-900.
 28. **León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ.** Melatonin mitigates mitochondrial malfunctions. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.
 29. **Chatterjee R, Mills W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone AH.** Germ cell failure and Leydig cell insufficiency in post-pubertal males after autologous bone marrow transplantation with BEAM for lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 519-22.
 30. **Ramanathan B, Archunan G.** Analysis of epididymal proteins during sexual maturation in male albino mice. *Acta Physiol Hung* 2001; 88: 73-80
 31. **Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı AO, Yilmaz S, Yüce A, Bulmuş O.** Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 2006; 41: 21- 7.
 32. **Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N.** Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008; 40: 354-60.
 33. **Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH.** Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal model. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 237-50.
 34. **Reiter RJ, Tan D-x, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S.** Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2002; 54: 1299-1321.
 35. **Azad Bakht M, Rezazadeh volujerdi M, Tarihi T.** Effect Of retinoic acid on principal cells of seminal vesicle epithelium. *Journal Of Iranian Anatomical Sciences* 2003; 2: 43-51. (Persian)
 36. **Shima TI, Tsuji M, Young P, Unha GR.** Postnatal growth of mouse seminal vesicle is dependent on 5- α -dihydrotestosterone. *Endocrinology* 1990; 127: 3222-33.
 37. **Tanji N, Yokoyama M, Cunha GR.** Inhibitor effects of retinoic acids on and. rogen dependent development of neonatal mouse seminal vesicle in vitro. *Endocrinology* 1996; 137 : 2887-95.
 38. **Newton SC, Blaschuk OW, Millette CF.** N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn* 1993; 197: 1-13.
 39. **Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga, et al.** Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2009; 46: 392-400.