

تأثیر لوپرلاید استات بر فراساختار سلولهای زایا در موش نر بالغ

فهیمة محمدقاسمی (Ph.D.)^۱، جعفر سلیمانی‌راد (Ph.D.)^۲، احمدعلی قنبری (Ph.D.)^۳، پروانه طباطبائی‌نبوی (B.Sc.)^۴

- ۱- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی گیلان، گیلان، ایران.
- ۲- مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز، تبریز، ایران.
- ۳- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز، تبریز، ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اسپرماتوژنز فرآیندی کاملاً وابسته به هورمون به ویژه گنادوتروپینها می‌باشد و بدیهی است هرگونه تغییر در میزان این هورمون‌ها می‌تواند در اسپرماتوژنز موثر باشد. آنالوگ‌های هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین نیز می‌توانند محور هیپوفیزی- گنادی را مختل نمایند. لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تغییرات فراساختاری و هیستولوژیک سلول‌های اسپرماتوژنیک و اسپرمیوژنیک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن به‌دنبال تجویز یک دوز لوپرلاید استات (یکی از آنالوگ‌های هورمون آزادکننده گنادوتروپین) در موش بالغ می‌باشد.

روش بررسی: در مطالعه حاضر ۲۴ موش بالغ ۸ هفته به ۳ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل، هیچ دارویی دریافت نکردند اما حیوانات در گروه دوم و سوم به ترتیب یک دوز 0.2 ml / کربوکسی متیل سلولز و $7/6\text{ mg/kg}$ لوپرلاید استات به‌صورت زیر جلدی دریافت کردند. پس از گذشت ۵ هفته بیضه موشها خارج و برای مطالعه سلول‌های زایای لوله سمی‌نیفروس و مطالعه مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن و نوری مورد استفاده قرار گرفت. همه نمونه‌ها از نظر مورفولوژی مقایسه شدند و با روش آزمون ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

نتایج: در نتایج میکروسکوپ الکترونی، در گروه آزمایش بیشترین تغییرات در سلول‌های اسپرمیوژنیک یافت شد. در بیشتر اسپرماتیدها، هسته و آکروزوم تغییر شکل یافته بود. در برخی اسپرماتیدهای در حال تمایز و زیکول‌های آکروزومی در هسته دیده می‌شد؛ ضمن اینکه تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک در برخی نواحی به صورت نسبی حذف شده بود. در اسپرماتیدهای دراز، فلاژلها غیر طبیعی بودند و غلاف فیبروزه آنها به‌صورت غیرممتد بود. در مشاهدات میکروسکوپ نوری وضعیت تکامل اسپرماتوژنز براساس جدول جانسن در گروه کنترل، شش و آزمایش به ترتیب $8/1 \pm 0/53$ ، $8/2 \pm 0/46$ و $7/0 \pm 0/57$ بود؛ که در گروه آزمایش کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0/01$). همچنین تمام شاخص‌های هیستومتری در لوله‌های سمینیفروس در مقایسه با دو گروه دیگر کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0/01$).

نتیجه‌گیری: تزریق یک دوز $7/6\text{ mg/kg}$ لوپرلاید استات در طی یک سیکل اسپرماتوژنز با اثرات سوء براسپرماتوژنز همراه می‌باشد و به نظر می‌رسد که لوپرلاید استات دارای بیشترین اثر بر روی اسپرمیوژنز یا فرآیند تغییر شکل اسپرماتیدهای گرد به دراز می‌باشد.

کلید واژگان: اسپرماتوژنز، هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین، اسپرمیوژنز، لوپرلاید استات، موش، میکروسکوپ الکترونیکی، سلول زایا، ناباروری مردان.

مسئول مکاتبه: دکتر فهیمة محمدقاسمی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، مجتمع دانشگاهی گیلان، کیلومتر ۱۰ جاده تهران، رشت، ایران.

پست الکترونیکی: parsahistolab@gmail.com

زمینه و هدف

اسپرمتوزن روندی است که بوسیله هورمون‌های گنادوتروپینی مانند هورمون تحریک‌کننده فولیکولی (FSH) و لوتئینیزه (LH) کنترل می‌شود. بدیهی است هرگونه تغییر در میزان گنادوتروپین‌ها می‌تواند با تغییر در اسپرمتوزن همراه باشد. تجویز گنادوتروپین‌های اگزوژن در فرم آگونیست یا آنتاگونیست GnRH در نهایت باعث مهار محور هیپوفیزی-گنادی و مهار ترشح LH، FSH و تولید استروئیدهای جنسی می‌شود؛ هرچند که نحوه مکانیسم عمل آنالوگ‌ها و آنتاگو-نیست‌های GnRH با یکدیگر متفاوت است (۱).

لوپرایداستات یک دکاپتید سنتتیک و آگونیست هورمون آزادکننده گنادوتروپین می‌باشد. این دارو برای درمان اندومتروز، لیومیومای رحم، سرطان پیشرفته پروستات و در برخی موارد جهت درمان ناباروری (۲) و کریپتورکیدیسم (۳) مورد استفاده قرار می‌گیرد. تجویز لوپراید استات در رت (۴) و انسان (۵-۷) باعث کاهش تستوسترون سرم می‌شود و ممکن است باعث کاهش وزن بیضه شود (۸،۴). یکی از مکانیسم‌های لوپراید، سرکوب کردن محور هیپوفیزی-گنادی می‌باشد. تجویز لوپراید در رت به‌دنبال دوکسوروبیسین^۱ (۹)، پروکاربازین^۲ (۱۰) و اشعه درمانی (۱۱) باعث حفظ و نگهداری اسپرمتوزن در طی درمان می‌شود. همچنین در موش‌ها نیز لوپراید می‌تواند اسپرمتوزن را به‌دنبال درمان با سیکلوفسفامید^۳ (۱۲) حفظ نماید. مطالعات در رت و موش نشان داده‌اند که تجویز لوپراید به بیضه میزبان باعث ایجاد محیط مناسب برای پیوند بهتر سلول‌های زایا و برقراری بهتر اسپرمتوزن می‌شود (۱۳،۱۴).

مصرف گنادوتروپین‌ها در گونه‌های دیگر نیز می‌تواند با اختلالات اسپرمتوزن همراه باشد. برای مثال در سگ‌ها

تجویز یک دوز آنتاگونیست GnRH منجر به کاهش تمایل جنسی، کاهش قطر اسکروتوم بیضه و کاهش مایع منی و پارامترهای اسپرم می‌شود (۱۵،۱۶). همچنین تجویز گنادوتروپین‌های اگزوژن به میمون‌ها باعث اختلال در مراحل بلوغ و تکامل اسپرم در اپیدیدیم می‌شود (۱۷). از آنجایی که اثرات گنادوتروپین‌های اگزوژن پس از قطع درمان برطرف می‌شود، در برخی مواقع می‌توانند به عنوان روشی برای جلوگیری از باروری در مردان نیز مطرح باشند (۲)؛ لذا آگاهی از نحوه عملکرد آنها می‌تواند کمک مؤثری در درمان ناباروری و همچنین روش‌های پیشگیری از باروری باشد.

براساس مطالعه Glode و همکاران در سال ۱۹۸۱ که با میکروسکوپ نوری انجام شد، مصرف لوپراید در موش‌ها باعث تغییر ساختمانی و هیستولوژیکی در لوله‌های سمی نیفروس بیضه نمی‌گردد (۱۲)، هرچند که Manabe در سال ۱۹۹۶ نشان داد که به‌دنبال تجویز ۹mg/kg لوپراید در رت، قطر لوله سمی نیفروس و درجه بلوغ آنها کاهش می‌یابد (۹). در هیچ یک از موارد نامبرده در ارتباط با تغییرات کمی و فراساختاری سلول‌های زایای بیضه مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

براساس مطالعات حاضر اطلاعاتی در مورد تغییرات فراساختاری داروهای آگونیست GnRH و همچنین لوپراید استات بر روی سلول‌های زایای بیضه و رده‌های بلوغی اسپرم در دسترس نمی‌باشد. از طرف دیگر مطالعه با میکروسکوپ الکترونی با ارزش‌ترین نوع مطالعات مورفولوژیکی از نظر ارزیابی هسته، اندامکها، غشاها و اتصالات سلولی مخصوصاً در مقایسه با میکروسکوپ نوری به حساب می‌آید، ضمن اینکه آگاهی از تغییرات فراساختاری سلول‌های زایا و رده‌های بلوغی اسپرم به‌دنبال تجویز گنادوتروپین‌ها می‌تواند کمک بیشتری در درک بهتر اسپرمتوزن و اسپرمیوزن و در نتیجه عملکرد آنها باشد؛ مطالعه

1- Doxorubicin
2- Procarbazine
3- Cychlophosphamide

الکترونی در تمامی حیوانات برش‌هایی از بیضه چپ و برای مطالعه میکروسکوپ نوری بیضه راست مورد استفاده قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (TEM): برش‌های بافتی از بیضه چپ در گلو تار آل‌دئید (۲/۵٪) (Pro Sci Tech, AU) و پارافرمال‌دئید (۴٪) (Merck, Germany) به مدت یک شب ثابت شدند. جهت ثابت کردن ثانویه از تتراکسید اسمیوم (۲٪) (Taab, UK) به مدت دو ساعت استفاده شد. پس از پردازش بافتی، نمونه‌ها در رزین قالبگیری شدند. برش‌های نازک بیضه با ضخامت 500 nm با استفاده از اولترا میکروتوم (Richert-Jung, AU) و تیغه شیشه‌ای به دست آمد و با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری (Leo, Germany) برای تعیین مکان مناسب مطالعه شدند. سپس برش‌های نازک 100 nm با استفاده از تیغه الماس و اولترا-میکروتوم تهیه گردید.

پس از آن، برش‌های نازک با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شدند و تغییرات سلولی با میکروسکوپ الکترونی (Zeise, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

ارزیابی اسپرما توژنز با استفاده از میکروسکوپ نوری: بیضه راست از هر حیوان در محلول بوئن برای مدت ۴۸ ساعت در حرارت اتاق غوطه‌ور شد و سپس برای مطالعه با میکروسکوپ نوری پاساژ داده شد. برای 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 $5\text{ }\mu\text{m}$ و فواصل منظم $200\text{ }\mu\text{m}$ به صورت نمونه‌گیری تصادفی ساده یکنواخت تهیه گردید تا تمامی برشها از شانس یکسانی برای مطالعه برخوردار باشند. به عبارت دیگر با این نوع نمونه‌برداری میزان سوگیری به حداقل مقدار رسانیده شد (۲۱). از هر

حاضر با هدف بررسی تغییرات فراساختاری سلول‌های اسپرما توژنیک یا اسپرمیوژنیک موش بالغ بدنبال تجویز یک دوز لوپرلايداستات در فرم دپو می‌باشد. همچنین در این مطالعه با استفاده از میکروسکوپ نوری وضعیت اسپرما توژنز داخل لوله‌های سمی‌نیفروس و تعداد سلول‌های زایای بیضه و رده‌های بلوغی اسپرم و پارامترهای هیستومتریک لوله‌های سمی‌نیفروس نیز مورد ارزیابی قرار گرفت، تا بتوان مشخص کرد که این دارو بیشتر بر روی چه سلول‌هایی از لوله‌های سمی‌نیفروس مؤثر واقع شده است.

روش بررسی

حیوانات: ۲۴ موش نر نژاد NMRI، با سن ۶ هفته از موسسه رازی تهران خریداری شدند. حیوانات در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. جهت تطبیق با محیط، حیوانات ۲ هفته در محیط قرار گرفتند و سپس حیوانات ۸ هفته به سه گروه کنترل، شم و آزمایش تقسیم شدند (هر گروه شامل ۸ حیوان). به حیوانات گروه آزمایش $7\text{ }\mu\text{mg/kg}$ از آمپول لوپرلايد (Wyeth, UK) به صورت زیر جلدی به پوست پشت حیوان تزریق شد. شایان ذکر است که دارو در یک دوز تزریق گردید. همچنین دوز $7\text{ }\mu\text{mg/kg}$ لوپرلايد براساس گزارش‌های قبلی در موش انتخاب شد (۱۳، ۱۴). جهت حلالیت دارو از کربوکسی متیل سلولز (Wyeth, UK) استفاده شد. به حیوانات شم 0.2 ml کربوکسی متیل سلولز به صورت زیر جلدی تزریق شد اما حیوانات کنترل، دارویی دریافت نکردند.

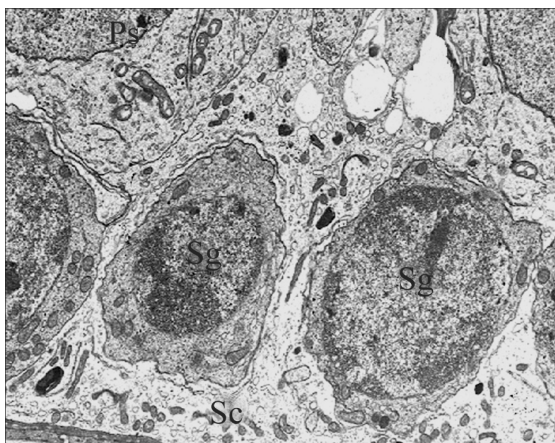
با توجه به این که سیکل کامل اسپرما توژنز در موش ۳۵ روز می‌باشد (۱۸، ۱۹)؛ لذا پس از گذشت ۵ هفته از شروع درمان همه حیوانات با کلروفرم بیهوش شدند. بلافاصله پس از تشریح، هر دو بیضه از حفره شکم حیوان خارج شد. به منظور مطالعه با میکروسکوپ

نتایج

مطالعات فراساختاری سلولهای زایا: در گروه کنترل سلول‌های اسپرماتوگونی بر روی غشاء پایه تکیه داشتند و دارای هسته گرد تا بیضی با هتروکروماتین کناری^۱ و دارای تعداد کمی اندامک در سیتوپلاسم بودند؛ ضمن این که دارای سیتوپلاسم کم و در عین حال هسته نسبتاً بزرگی بودند. سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه با سایز بزرگتر، بالاتر از غشاء پایه از اسپرماتوگونیها قابل افتراق بودند. ضمن این که در مقایسه با سلول‌های اسپرماتوگونی دارای اندامک‌های بیشتری بودند (شکل ۱). عمده سلول‌های زایا به وسیله سیتوپلاسم وسیع سلول‌های سرتولی یا پشتیبان احاطه شده بودند.

هیچگونه تغییر فراساختاری قابل توجه در سلول‌های اسپرماتوژنیک مانند اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت به دنبال درمان با لوپرلايد در گروهها مشاهده نشد.

شکل ۲ نشانگر اسپرماتید در حال تکامل در مرحله اسپرمیوژنز در موش کنترل است. همانطور که مشخص است هسته توسط سیتوپلاسم سلول سرتولی احاطه شده است. آکروزوم در حال تکامل به خوبی بر روی هسته قابل رویت است. تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک



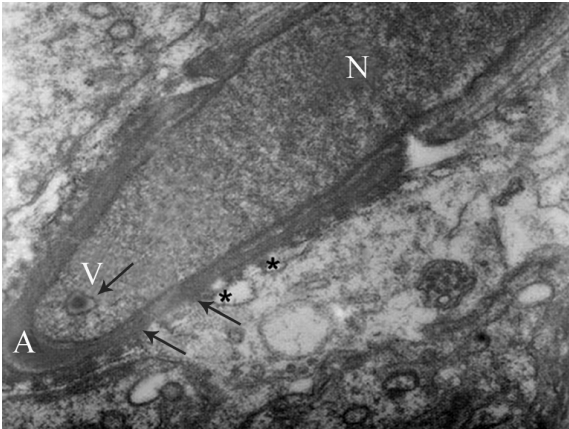
شکل ۱- فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم زایا در یک موش گروه کنترل. سیتوپلاسم سلول سرتولی (Sc)، اسپرماتوگونی (Sg)، اسپر- ماتوسیت اولیه (Ps)، بزرگنمایی $\times 2500$

بيضه ۸ اسلايد انتخاب و به طريق هماتوکسيلن، ائوزين رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد. برای بررسی وضعیت بلوغ اسپرماتوژنز در داخل لوله‌ها از روش جانسون استفاده شد (۲۲). بدین منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله سمی نیفروس در هر حیوان استفاده گردید. به هر لوله براساس جدول نمرات، امتیاز ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت. همچنین درصد لوله‌هایی که دارای بلوغ بالا بودند یعنی لوله‌هایی که نمرات ۸،۹ و ۱۰ داشتند نیز در هر گروه مورد محاسبه قرار گرفت. لازم به ذکر است که جدول ارزیابی کننده بلوغ اسپرماتوژنز در مدل‌های موشی متفاوت از انسان می‌باشد هرچند که با یکدیگر شباهت‌هایی نیز دارند (۲۵).

تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی A، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتیدهای جوان گرد، اسپرماتیدهای دراز (با هسته کاملاً متراکم و کشیده و دارای دم) در مقطع عرضی ۲۰ لوله سمی نیفروس در هر اسلايد مورد شمارش قرار گرفتند. حتی الامکان سعی شد تا از لوله‌هایی با مقطع عرضی گرد و تقریباً سایز یکسان استفاده شود و لوله‌هایی که بیضوی شکل یا در مقطع طولی بودند مورد شمارش قرار نمی‌گرفتند. شمارش سلولی براساس معیارهای مورفولوژی سلولی بود که توضیح آن قبلاً ارائه شده است (۲۳). برای اندازه‌گیری قطر لوله سمی نیفروس، ضخامت اپیتلیوم ژرمینال و قطر مجرای لوله سمی نیفروس از یک میکروسکوپ نوری (Olympus, Germany) متصل به نرم افزار (Image computer analyzer, UK) استفاده شد.

تحلیل آماری: نتایج مورفولوژی میکروسکوپ نوری و الکترونی در نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه می‌شدند. بلوغ اسپرماتوژنز، تعداد سلول‌های زایا و اقطار پارامترها در لوله‌های سمی نیفروس با استفاده از برنامه آماری SPSS و روش ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

1- Marginal hetrochromatin



شکل ۳- فوتومیکروگراف الکترونی از اسپرماتید در حال تکامل در یک موش در گروه تحت درمان با لوپرلايد. هسته اسپرماتید (N)، آکروزوم (A)، و زیکول آکروزومی (V)، ناحیه بین فلشها نمایانگر عدم تکامل سیستمهای شبکه آندوپلاسمی (*) سلول سرتولی و حذف نسبی تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک می‌باشد (×۲۱۰۰۰).

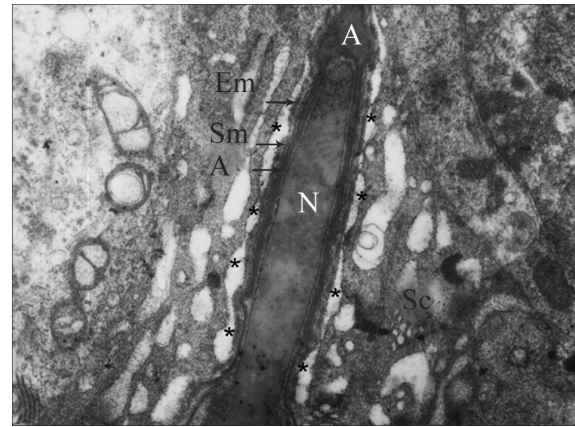
گروه آزمایش به صورت نسبی حذف شده بود (شکل ۴ و ۳).

لوپرلايد همچنين روی فلاژلها اثر کرده بود. زمانیکه بخش دم اسپرم‌های داخل مجرا بررسی شد، غلاف فیبروزه در زیر غشاء پلاسمایی و اطراف اکسونم به صورت غیرممتد و تغییر شکل یافته مشاهده شد؛ در حالیکه این وضعیت در گروه کنترل مشاهده نشد و غشاء پلاسمایی اسپرم و غلاف فیبری زیرین آن کاملاً ممتد و منظم بود (شکل ۵).

در گروه تحت درمان با کربوکسی متیل سلولز نه در مطالعه با میکروسکوپ نوری و نه در مطالعه



شکل ۴- فوتومیکروگراف الکترونی از اسپرماتید گرد در گروه موشهای تحت درمان با لوپرلايد. به هسته دفرمه (*) و زیکول داخل هسته (V) توجه شود. هسته (N)، گرانول آکروزومی (AG)، بزرگنمایی ×۴۵۰۰

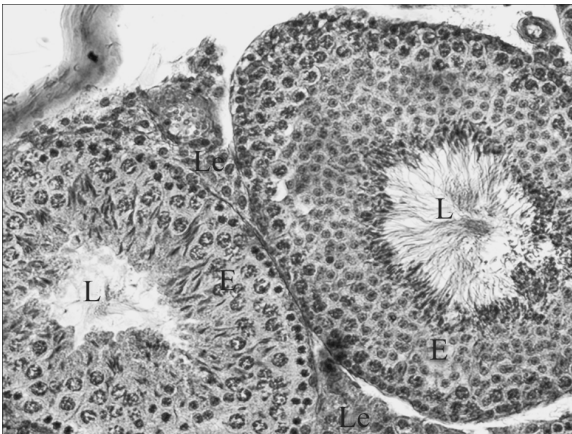


شکل ۲- فوتومیکروگراف الکترونی از اسپرماتید در حال تکامل در یک موش گروه کنترل. هسته اسپرم، (N)، آکروزوم (A)، به هسته اسپرم که توسط سیتوپلاسم سلول سرتولی (Sc) احاطه شده است و سیستمهای منظم و توسعه یافته شبکه آندوپلاسمی (*) سلول سرتولی در تماس با غشاء پلاسمایی اسپرم (Sm) و لایه بین آنها تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک را نشان می‌دهد توجه نمایید (×۱۲۳۹).

که وجود آن برای تکامل اسپرماتیدها ضروری است به خوبی دیده می‌شود. این تخصص یافتگی شامل:

- ۱- غشاء سلولی سلول سرتولی که در تماس با غشاء سلولی اسپرماتید است.
- ۲- سیستمهای توسعه یافته و تکامل یافته شبکه آندوپلاسمی سلول سرتولی که به طور منظم و به موازات غشاء اسپرم دیده می‌شوند.
- ۳- دستجاتی از فیلامان‌های اکتین که بین دو لایه یک و دو قرار می‌گیرند. بدیهی است هرگونه نقص در این جزء ۳ باعث اختلال در تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک و در نتیجه منجر به بروز اشکال در تکامل اسپرماتیدهای گرد به جوان می‌شود (شکل ۲).

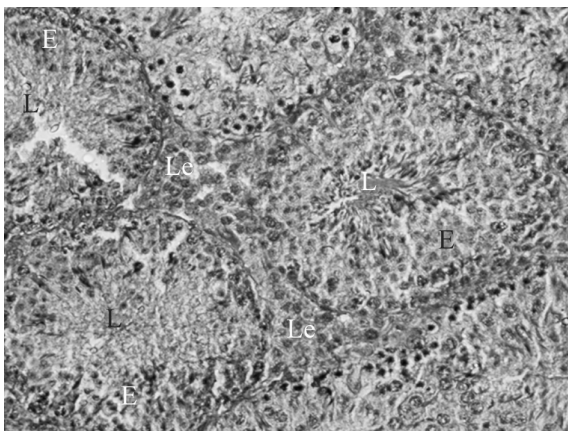
در گروه تحت درمان با لوپرلايد هسته برخی از سلول‌های اسپرماتید در حال تکامل تغییر شکل یافته و در برخی موارد حاوی زیکول‌های آکروزومی بود که این وضعیت در گروه کنترل دیده نمی‌شود. ضمن این که در برخی نواحی تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک بین سلول‌های سرتولی و اسپرماتیدهای در حال درازشدن تغییر کرده است و تعداد کمی از سیستمهای توسعه یافته شبکه آندوپلاسمیک در مقایسه با کنترل دیده می‌شود، در برخی قسمتها، این نواحی تخصص یافته در



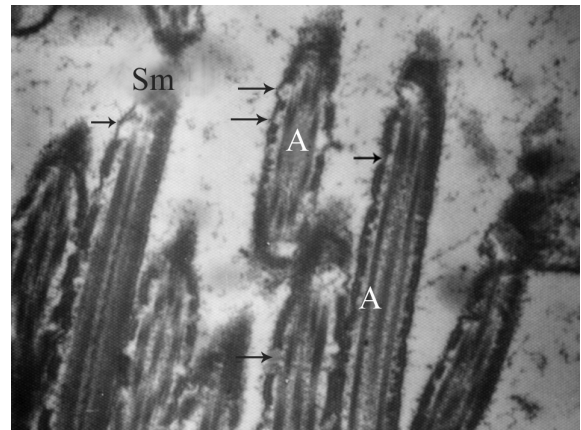
شکل ۶- فوتومیکروگراف نوری از لوله سمی نیفرس از یک موش گروه کنترل. به اسپرماتوژنز فعال داخل توبولها توجه شود. لومن (L) سلول لیدیک (Le)، اپیتلیوم ژرمینال (E) بزرگنمایی $\times 200$

و روشن دیده شد. همچنین در بافت بینابینی جمععاتی از سلول‌های اسیدوفیل لیدیک به همراه عروق و سایر سلول‌های همبندی مشهود بود (شکل ۶). در گروه شم نیز مانند گروه کنترل اسپرماتوژنز فعال دیده شد و تفاوت خاصی از نظر هیستولوژیک در مقایسه با کنترل یافت نشد (شکل ۷).

در گروه تحت درمان با یک دوز لوپرایدید، لوله‌های سمی نیفرس دارای ساختمان واپی‌تلیوم زایای نسبتاً طبیعی بودند. همه انواع سلول‌های زایا و سرتولی در داخل لوله‌های سمی نیفرس وجود داشتند. همه مراحل اسپرماتوژنز در این گروه قابل مشاهده بود؛ هرچند که تعداد سلول‌های زایا به‌ویژه اسپرماتیدهای دراز کاهش



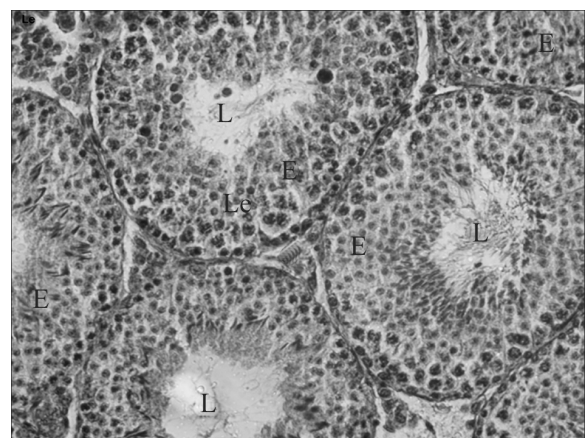
شکل ۸- فوتومیکروگراف نوری از لوله سمی نیفرس در یک موش در گروه تحت درمان با لوپرایدید استات. به ساختمان نرمال لوله‌های سمی نیفرس و در عین حال تعداد کمتر سلول‌های زایا و لومن پر توجه شود. لومن (L)، سلول لیدیک (Le)، اپیتلیوم ژرمینال (E) بزرگنمایی $\times 200$



شکل ۵- فوتومیکروگراف الکترونی از فلاژل دم اسپرم در یک موش در گروه تحت درمان با لوپرایدید. بالا و چپ تصویر دو مقطع عرضی را نشان می‌دهد و پائین تصویر مقاطع طولی و نیز مایل را نشان می‌دهد. آکسونم (A)، غشاء سلولی اسپرم (Sm). بین فلشها به غیر ممتد بودن غلاف فیبروزه خارجی توجه نمایید. بزرگنمایی $\times 12000$

فراساختاری تفاوت مورفولوژیکی در مقایسه با کنترل یافت نشد.

وضعیت اسپرماتوژنز با میکروسکوپ نوری: 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 توجهی برخوردار بود و سرحد مجاری لوله‌ها منظم بود. مجرای لوله سمینیفروس به‌صورت کاملاً مشخص



شکل ۷- فوتومیکروگراف نوری از لوله سمی نیفرس از یک موش در گروه شم. به اسپرماتوژنز فعال داخل توبولها توجه شود. لومن (L)، سلول لیدیک (Le)، اپیتلیوم ژرمینال (E) بزرگنمایی $\times 200$

جدول ۱- اثر لوپرلايد استات بر روی تعداد سلول‌های زایا و بلوغ اسپرماتوژنز در مقطع عرضی بیست لوله سمينيفروس موش بالغ

شاخص مطالعه	گروه مطالعه (M±SD)		
	کنترل	شم	آزمایش
اسپرماتوگونی A	۳/۹۰±۰/۸۰	۳/۰±۰/۹۹	۴/۳۱±۰/۶۰
اسپرماتوسیت اولیه	۶۳/۹۴±۸/۳۶	۵۷/۸۶±۱/۶	*۵۰/۶۳±۴/۷۰
اسپرماتید گرد	۱۴۰/۵۵±۳۵/۲۰	۱۲۹/۴±۳۲/۴	*۱۰۳/۲۱±۶/۵۵
اسپرماتید دراز	۱۵۲/۰±۸ ۲۷/۷۷	۱۳۷/۰±۲۱/۶۸	*۹۸/۹۰±۱۴/۹۷
وضعیت اسپرماتوژنز	۸/۰±۴۰/۶۲	۷/۹۷±۰/۶۳	*۷/۱۴±۰/۵۲
بلوغ لوله سمی نیفروس (%)	۴۷/۶۲±۶/۱۸	۴۱/۹۱±۶/۳۷	*۳۳/۵۰±۵/۱۲

* (p<۰/۰۵)

داشت. در این گروه مجرای بیشتر لوله‌های سمی نیفروس بسیار کوچک بود و به صورت اسیدوفیل مشاهده می‌شد (شکل ۸). وضعیت بلوغ اسپرماتوژنز در گروه تحت درمان در مقایسه با کنترل و شم به صورت معنی‌داری کاهش داشت (p<۰/۰۱).

همچنین تمام پارامترهای هیستومتریک در لوله‌های سمی نیفروس در مقایسه با دو گروه دیگر کاهش معنی‌دار داشت (p<۰/۰۱) (جدول ۱ و ۲). همچنین ملاحظه گردید که یک دوز لوپرلايد باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های جرم اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد و دراز شده است. در گروه تحت درمان با لوپرلايد به نظر می‌رسید که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی افزایش یافته باشد هرچند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار تلقی نشد (جدول ۱).

بحث

در مطالعه حاضر از یک دوز لوپرلايد استات در فرم دیپوت به عنوان داروی آنالوگ GnRH استفاده شد. این

جدول ۲- اثر لوپرلايد استات بر روی پارامترهای هیستومتریک لوله‌های سمی نیفروس در بیضه موش بالغ

شاخص مطالعه	گروه مطالعه (M±SD)		
	کنترل	شم	آزمایش
ضخامت اپیتلیوم (µm)	۱۱۶/۶۷±۱۰/۹۷	۱۱۴/۶۱±۱۲/۵۷	*۱۱۰/۰۶±۱۴/۱۰
قطر لوله (µm)	۱۶۹/۰۰±۹/۲۱	۱۵۹/۷۰±۱۲/۸	*۱۵۱/۴۴±۵/۷
قطر مجرای لوله (µm)	۵۵/۸۷±۴/۸۶	۵۰/۶۷±۵/۶۷	*۴۸/۲۸±۵/۱۰

* (p<۰/۰۵)

دارو در کلینیک به طور عمده برای درمان سرطان پروستات، آندومتريوز و میوم رحم استفاده می‌شود. این فرم دارو ابتدا در هفته اول و دوم باعث ترشح LH و FSH می‌شود؛ ولی به تدریج در هفته‌های بعد به دلیل بی‌تفاوتی گیرنده‌های سلول‌های گنادوتروپ نسبت به آنها، سبب مهار ترشح گنادوتروپین می‌شود. نشان داده شده است که تزریق آنالوگ GnRH نه تنها باعث کاهش گیرنده‌های GnRH هیپوفیز می‌شود؛ بلکه ساختار مولکولی گنادوتروپین‌ها را نیز تغییر می‌دهد (۲۴).

در این مطالعه ارزیابی فراساختاری نشان داد که لوپرلايد فاقد اثرات واضح روی اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه است و بیشترین اثرات آن بر روی اسپرماتیدهای گرد و فرآیند اسپرمیوژنز یعنی فرآیند تکامل اسپرماتیدهای گرد به دراز می‌باشد. مشخص شده است که آنالوگ‌های آزادکننده هورمون گنادوتروپینی باعث سرکوب کردن ترشح FSH، LH و کاهش سطوح تستوسترون می‌شوند (۲۴، ۲۵). احتمالاً کاهش گنادوتروپین و آندروژن باعث ایجاد تغییرات فراساختاری در سلول‌های اسپرمیوژنیک شده است. نشان داده شده است که در بیضه موش‌های هیپوگناد (hpg) که به طور کامل فاقد آندروژن می‌باشد، درمان با آندروژن باعث القاء حضور اسپرماتیدهای گرد و دراز حتی در غیاب FSH می‌شود. این تغییر مبین این نکته است که به طور فیزیولوژیکی تستوسترون جهت تکمیل میوز (اسپرماتیدهای گرد) و اسپرمیوژنز (تبدیل اسپرماتید گرد به دراز) ضروری می‌باشد (۲۶).

در مطالعه حاضر تعداد همه سلول‌های جرم به جز اسپرماتوگونیا در گروه آزمایش کاهش یافت. نکته قابل توجه در مطالعه حاضر این بود که علیرغم کاهش تعداد سایر سلول‌های رده بلوغی اسپرم، اسپرماتو-گونیا کم نشدند. شاید بتوان گفت که تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی در موش بالغ فرآیندی وابسته به گنادوتروپین نمی‌باشد. یافته‌های مشابهی به دنبال

ایمونیزاسیون با GnRH گزارش شده است (۲۷). همچنین در تأیید این یافته در میمون بالغ، درمان با GnRH تأثیری روی تعداد اسپرماتوگونی A نداشته است (۲۸)، هرچند که به خوبی مشخص شده است که در رفتارهای اسپرماتوگونی هم بین گونه‌ها و هم بین نژادهای مختلف حتی در مواجهه با یک عامل مشابه تفاوت وجود دارد (۲۹).

در مطالعه حاضر تعداد سلولها از اسپرماتوسیت اولیه به بعد کاهش داشت. مطالعات مشابهی در رت نشان داد که کمبود آندروژن عمدتاً روی سلول‌های اسپرماتوژنیک در مرحله VII اثر می‌کند و منجر به کاهش خفیف در تعداد اسپرماتوسیتها در مراحل VII-XIV و اسپرماتیدها در مراحل I-VII می‌شود (۲۵،۳۰). از آنجا که وجود رسپتورهای FSH بر سطح سلول‌های سرتولی و LH بر سطح سلول‌های لیدیک و رسپتورهای آندروژن بر سطح سلول‌های میوئید که هر سه جزء سلول‌های سوماتیک بیضه هستند مشخص شده است (۲۵،۳۰) و با توجه به اینکه ارتباط تنگاتنگ و قوی بین سلول‌های سوماتیک و سلول‌های زایای در حال تکامل وجود دارد، به نظر می‌رسد که لوپرلاید توانسته باشد از طریق اثر بر سلول‌های سوماتیک باعث کاهش سلول‌های زایای بیضه شده باشد. در تأیید یافته‌های کمی، بلوغ اسپرماتوژنز نیز در گروه آزمایش کاهش معنی‌داری داشت که به طور مشابهی در مطالعه Manabe در سال ۱۹۹۷ باعث کاهش بلوغ اسپرماتوژنز گشت. مطالعات بعدی در ارتباط با بررسی میزان تکثیر سلول‌های زایا به‌دنبال مصرف لوپرلاید در موش مورد نیاز می‌باشد. به‌عبارت دیگر شاید بتوان کاهش سلول‌های زایای لوله سمینیفروس و در نتیجه پارامترهای هیستومتریک لوله سمینیفروس را در گروه آزمایش ناشی از دو مکانیسم: الف) کاهش تکثیر سلول‌های زایا و ب) افزایش مرگ سلول‌های زایا دانست.

البته مطالعه حاضر به طور اختصاصی تکثیر و تزاید سلول‌های زایا را مورد بررسی قرار نداد؛ ولی با مطالعه کمی به نظر می‌رسد که تزاید این سلولها کاهش یافته باشد که مطالعات دقیقتر و اختصاصی‌تر در این زمینه مورد نیاز می‌باشد.

مکانیسم احتمالی دیگر افزایش مرگ سلول‌های زایا است. شاید لوپرلاید از طریق افزایش مرگ سلول‌های زایا توانسته باشد باعث کاهش شمارش سلولی و بلوغ اسپرماتوژنز شود. هرچند که در مطالعه حاضر، چه در مطالعه با میکروسکوپ نوری و چه در مطالعه فراساختاری سلول‌های زایا، هیچگونه نشانه مورفولوژیک دال بر مرگ سلولی از جمله تراکم کروماتین، متراکم شدن سیتوپلاسم، حضور اجسام آپوپتوتیک یا قطعه قطعه شدن هسته در هیچ یک از نمونه‌ها دیده نشد. ضمن این که محققان مقاله حاضر در مطالعه قبلی خود با استفاده از روش TUNEL نیز نتوانستند افزایش مرگ سلولی به‌دنبال لوپرلاید را در سلول‌های زایا نشان دهند (۳۱). مطالعه حاضر مشابه مطالعه Endo در سال ۲۰۰۳ است (۸). همچنین، هیپوفیزکتومی در رت‌های نر بالغ و هامستر و به‌دنبال آن توقف، ترشح گنادوتروپینها، نمی‌تواند باعث القاء مرگ سلول‌های زایا شود (۳۲،۳۳)، ضمن این که Billing و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که تجویز آنتاگونیست GnRH در رت‌های بالغ نر نیز نمی‌تواند مرگ را در سلول‌های زایا القاء نماید (۳۴)؛ در حالیکه درمان رت‌های نر به مدت ۴-۲ هفته نر با آنتاگونیست GnRH و همچنین هیپوفیزکتومی در رت‌های نابالغ نر باعث القاء مرگ سلول‌های زایا می‌شود (۳۴). به عبارت دیگر همه این مطالعات نشان می‌دهند که وابستگی بیضه به گنادوتروپینها یک فاکتور وابسته به سن است و در سنین مختلف اثرات گنادوتروپین بر سلول‌های زایای بیضه می‌تواند متفاوت باشد.

که بررسی آن در مطالعات بعدی به دنبال تجویز آنالوگ‌های GnRH پیشنهاد می‌شود. در این مطالعه فراساختار فلاژل دم اسپرم تغییر یافته و غلاف فیبروزه در زیر غشاء پلاسمایی اسپرم به صورت غیرممتد مشاهده می‌شود. مشابه مطالعه حاضر، درمان با تریپتولاید، نوعی دی‌ترین‌تری اپوکساید حاصل از یک نوع گیاه دارویی چینی می‌تواند منجر به ایجاد ناباروری در رت و موش‌های نر شده و باعث از بین رفتن غلاف فیبروزه دم اسپرم می‌شود (۴۲، ۴۳). طبق مطالعات، تریپتولاید فاقد هرگونه اثری بر سطوح هورمونی FSH و LH و تستوسترون و استروژن داخل بیضه‌ای می‌باشد (۴۲، ۴۳). بنابراین به نظر می‌رسد که غیرممتد شدن غلاف فیبروزه فلاژل در آزمایش حاضر، با مکانیسم ناشناخته‌ای و نه مکانیسم هورمونی ایجاد شده باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه حاضر بیشتر اثرات فراساختاری لوپرلايد بر روی سلول‌های پس از فاز میوزی اسپرماتوژنز یعنی اسپرمیوژنز می‌باشد. تجویز لوپرلايد به میزان $7/mg/kg$ در موش بالغ تأثیری بر تعداد اسپرماتوگونیاها ندارد؛ هرچند که تعداد سایر سلول‌های زایا را کاهش می‌دهد. تجویز لوپرلايد در موش بالغ باعث کاهش بلوغ و پارامترهای هیستومتریک لوله سمی‌نیفروس می‌شود.

مطالعات اندوکرینولوژی دقیق از جمله بررسی سطوح FSH و LH، تستوسترون، استرادیول و تستوسترون داخل بیضه، همچنین انجام آزمایشات استریولوژی برای بررسی دقیق‌تر تغییرات تعداد سلولی و بافت بیضه و بررسی تغییرات فراساختاری سلول‌های سوماتیک بیضه (سرتولی، لیدیک و میوئید)، بررسی تکثیر و مرگ سلول‌های زایا به دنبال درمان با لوپرلايد استات از جمله مواردی است که برای مطالعات بعدی

Udagawa معتقد است که لوپرلايد از طریق اثرات پاراکرینی روی سلول‌های سرتولی و لیدیک اسپرماتوژنز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. چرا که سلول‌های زایا فاقد گیرنده برای GnRH بوده و رسپتورهای گنادوتروپینی بر سطح سلول‌های سرتولی و لیدیک قرار دارند (۳).

نتایج میکروسکوپ الکترونی مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اتصال اکتوپلاسمیک سلول‌های سرتولی در موش‌های تحت درمان تغییر کرده است و حتی در برخی نواحی به طور نسبی حذف شده است. تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک نوع ویژه‌ای از اتصال سلولی است که بین سلول سرتولی و اسپرماتیدها وجود دارد و نقش مهمی در تکامل و کارکرد سلول‌های زایا دارد (۳۵، ۳۶). به عبارت دیگر نقش زیادی در مورفوژنز و تکامل اسپرماتیدهای گرد به دراز دارد (۳۶). مشابه یافته مطالعه کنونی، درمان با فلوتاماید که نوعی آنتی‌آندروژن محسوب می‌شود نیز باعث حذف نسبی تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک می‌شود (۳۷). همچنین آنالوگ‌های GnRH از طریق کاهش FSH و LH و تستوسترون می‌توانند دارای خواص آنتی‌آندروژنیک باشند (۳۷، ۳۸). از طرف دیگر به دنبال تجویز بیسفنول A یا بتا استرادیول-۳- بنزوات در موشها و رت‌های بالغ و نیز تجویز ۱۷- بتا استرادیول در نوزادان موش، تغییرات فراساختاری مشابهی گزارش شده است (۳۹) شایان ذکر است که داروهای فوق‌الذکر دارای خواص استروژنی هستند؛ ضمن این که تعادل بین استروژن و آندروژن‌ها در برقراری اسپرماتوژنز طبیعی بسیار با اهمیت می‌باشد (۴۰). علاوه بر این FSH نقش مهمی در نگهداری اتصالات سلولی در اپی‌تلیوم ژرمینال دارد (۴۱). بنابراین ارزیابی‌های هورمونی FSH و LH و تستوسترون و همچنین استروژن و اثرات آنها روی اسپرمیوژنز و اتصالات سلول‌های اسپرماتید- سرتولی (تخصص یافتگی اکتوپلاسمیک) از جمله مواردی است

پیشنهاد می‌شود.

هزینه‌های این تحقیق را تأمین نمودند. همچنین از سرکار خانم آیدا اعظمی کارشناس آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

با سپاس از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که

References

- Gobello C. New GnRH in canine reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2007;100(1-2):1-13.
- Chillik C, Acosta A. The role of LHRH agonists and antagonists. *Reprod Biomed Online.* 2001;2(2):120-28.
- Udagawa K, Takeda M, Hosaka M, Kubota Y, Ogawa T. Recovery of spermatogenesis by high dose gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in rat crypt orchid testis after orchiopexy: *J Urol.* 2002;168(3):1279-83.
- 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;8:615-22.
- Tunn UW, Bargelloni U, Cosciani S, Fiaccavento G, Guazzieri S, Payano F. Comparison of LH-RH analogue 1-month depot and 3-month depot by their hormone levels and pharmacokinetic profile in patients with advanced prostate cancer. *Urol Int.* 1998;60 suppl 1:9-16.
- Berges R, Bello U. Effect of a new leuprorelin formulation on testosterone levels in patients with advanced prostate cancer. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22(4):649-55.
- Sartor O. Eligard: leuprolide acetate in a novel sustained-release delivery system. *Urology.* 2003;61(2 suppl 1):25-31.
- Endo F, Manabe F, Takeshima H, Akaza H. Protecting spermatogonia from apoptosis induced by doxorubicin using the luteinizing hormone-releasing hormone analog Leuprorelin. *Int J Urol.* 2003;10:72-9.
- Manabe F, Takeshima H, Akaza H. Protecting spermatogenesis from damage induced by doxorubicin using the luteinizing hormone-releasing hormone agonist leuprorelin: an image analysis study of rat experimental model. *Cancer.* 1997;79(5):1041-21.
- Meistrich ML. Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. *Acta Paediatr Scand.* 1999;88:19-22.
- Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of A spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod.* 1996;54:1200-08.
- Glode LM, Robinson Gould SF. Protection from cyclophosphamide induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *The Lancet.* 1981;(23):1132-34.
- Ogawa T, Dobrinski I, Brinster RL. Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell.* 1999;31:461-72.
- Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL. Effect of the GnRH agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tissue Cell.* 2001;33:200-7.
- Valiente C, Corrada Y, De La Sota PE, Galassi Gerez P, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acycline, on canine testicular characteristics. *Theriogenology.* 2007, In press.
- Saratsis Ph, Ypsilantis Y, Tselkas K. Semen quality during vincristine treatment in dogs with transmissible venereal tumor. *Theriogenology.* 2000; 53:1185-92.
- Yeung Ch, Weinbauer GF, Cooper TG. Effect of acute androgen withdrawal by GnRH antagonist on epididymal sperm motility and morphology in the cynomolgus monkey. *J Androl.* 1999;20(1):72-9.
- Adler ID. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res.* 1996;352(1-2):169-72.
- Cheng Yan C, Mruck DD. Cell junction dynamic in the testis: sertoli-germ cell interaction and male contraceptive development. *Physiol Rev.* 2002;82: 825-74.
- Bancroft JD. *Theory and practice of histological techniques.* 3rd Edition, Edited by Churchill Livingstone. 2002; London.pp:305-310.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1998;96(10):857-81.

- 22- Lewis-Johnes DI, Kerrigan DD. A modified Johnsen's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. *IRCS Med Sci.* 1985;13:510-1.
- ۲۳- محمد قاسمی فهیمه، سلیمانی راد جعفر، قنبری احمد علی. مطالعه مورفولوژی بیضه موش بالغ بدنبال تجویز مقادیر مختلف بوسولفان. فصلنامه پزشکی باروری و ناباروری. دوره هفتم، شماره اول؛ بهار ۱۳۸۵، صفحات: ۲۷-۲۵.
- 24- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AF. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, tenth edition. Edited by McGraw Hill, Mexico. 2001; pp:1552-5.
- 25- Kangasniemi M, Wilson G, Huhtaniemi I, Meistrich M. Protection against procarbazine-induced testicular damage by GnRH-agonist and anti- androgen treatment in the rat. *Endocrinology.* 1995;136:3677-80.
- 26- Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singht J. Spermatogenesis without gonadotropins maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. *Endocrinology.* 1999;140(9):3938-46.
- 27- Marshall GR, Ramaswamy S, Plant TM. Gonadotropin-independent proliferation of the pale type A spermatogonia in the adult rhesus monkey. *Biol Reprod.* 2005;73(2):222-9.
- 28- McLachlan RI, Weford NG, Kretser DM, Robertson DM. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin releasing hormone immunized adult rat. *Endocrinology.* 1995;136(9):4035-43.
- 29- Meistrich ML, Shetty G. Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone. *J Androl.* 2003;24(2):135-48.
- 30- Kangasniemi M, Wilson G, Parchuri N, Huhtaniemi I, Meistrich ML. Rapid protection of rat spermatogenic stem cells against procarbazine by treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) and an antiandrogen (flutamide). *Endocrinology.* 1995;136:2881-8.
- ۳۱- فهیمه محمد قاسمی. بررسی فراساختاری و مطالعه آپوپتوز در بیضه موشهای بالغ بدنبال درمان با بوسولفان و درمان حمایتی با انالوگ GnRH. پایان نامه دکتری تخصصی بافت شناسی. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. تابستان ۱۳۸۵.
- 32- Gosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LEJR, Russel LD. Structural manifestations of the rat sertoli cells to hypophysectomy: A correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology.* 1992;131(1):485-97.
- 33- Gosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LEJR. Russel LD. Structural response of the hamster sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Anat Rec.* 1993;237(2):296.
- 34- Billing H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 1995;136(1):5-12.
- 35- Toyama Y, Maekawa M, Yuasa S. Ectoplasmic specialization in the sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. *Anat Sci Int.* 2003;78(1):1-16.
- 36- O'Donnell L, Stanton PG, Bartles JR, Robertson DM. Sertoli cell ectoplasmic specialization in the seminiferous epithelium of the testosterone suppressed adult rat. *Biol Reprod.* 2000;63:99-108.
- 37- Anahara R, Toyama Y, Mori C. Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the sertoli cell and spermatids in mouse testes. *Reproductive Toxicology.* 2004;18:589-596.
- 38- Behre HM, Nashan D, Hubert W, Nieschlag E. Depot gonadotropin releasing hormone agonist blunts the androgen-induced suppression of spermatogenesis in a clinical trial of male contraception. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74(1):84-90.
- 39- Haywood H, Spaliviero J, Jimenz M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli cell and germ cell development in hypogonadal mice (hpg) expressing transgenic follicle stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology.* 2003;144(2):509-17.
- 40- Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito CH, Toshimori K. Adverse effects of bisphenil A to spermatogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol.* 2004;67(4):373-381.
- 41- Muffly KE, Nazian SJ, Cameron DF. Effects of follicle-stimulating hormone on the junction-related Sertoli cell cytoskeleton and daily sperm production in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biol Reprod.* 1994;51(1):158-66.
- 42- Sinha Hikim AP, Helue Y, Wang C, Reutrakul V, Sangsuwan R, Swerdloff RS. Post testicular aninfertility action of triptolide in the male rat: Evidence for severe impairment of cauda epididymal sperm ultrastructure. *J Androl.* 2000;21(3):431-7.
- 43- Huynh PN, Hikim AP, Wang C, Stefonovic K, Lue YH, Leung A, et al. Long term effects of triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function and fertility in male rats. *J Androl.* 2000;21(5):689-99.