

## The role of Cetrorelix in preservation of morphological and ultrastructural changes in the germinal epithelium of testicular tissue following Cyclophosphamide-induced toxicity in mice

Mohammadnejad, D.<sup>1</sup>, Eivazi-Ziaie, J.<sup>2</sup>, Azami, A.<sup>3</sup>, Valilou, M.<sup>4</sup>, Rasta, H.<sup>5</sup>, Abedelahi, A.<sup>2\*</sup>

1- Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

2- Associate Professor, Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

3- M.Sc., Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

5- Associate Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author's email: abedelahia@gmail.com

(Received: 2020/9/8 Accepted: 2020/12/23)

### Abstract

Anticancer drugs used in the treatment of neoplasia have harmful effects on organs with rapid cell division such as testicular tissue. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists may have a preventive effect on spermatogenic defect produced by anticancer drugs such as cyclophosphamide. Therefore, the aim of the present study was to investigate the preventive effect of GnRH antagonist (Cetrorelix) on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular tissue of mice. For this purpose, 30 adult 6-8 week old male mice were divided into three groups of control (no treatment), treatment 1 (50mg/kg intraperitoneal cyclophosphamide) and treatment 2 (0.25 mg/kg subcutaneous cetrorelix plus 50 mg/kg intraperitoneal cyclophosphamide). The mice were sacrificed 35 days after the last injection of cetrorelix and testicular specimens were isolated for histomorphological and ultrastructural studies. Histomorphometric studies of the seminiferous tubules in the first treatment group showed significant decrease in the number of sertoli cells and the thickness of germinal epithelium ( $p<0.05$ ). Ultrastructural study revealed that several intercellular spaces appear between sertoli cells and spermatogenic cells, and also there were a lot of degenerated mitochondria in the sertoli cells. In the second treatment group, conditions were similar to the control group to some extent. These results demonstrated that cetrorelix can protect the germinal epithelium of testis to some extent against side effects of cyclophosphamide.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Testis, Cyclophosphamide, Cetrorelix, Mouse.

## نقش سترورلیکس در حفاظت از تغییرات مورفولوژیکی و فراساختاری اپی‌تلیوم ژرمینال بافت بیضه به دنبال آسیب‌های ایجادشده توسط سیکلوفسفامید در موش سوری

داریوش محمدنژاد<sup>۱</sup>، جمال عیوضی ضیایی<sup>۲</sup>، آیدا اعظمی<sup>۳</sup>، محمدرضا ولیلو<sup>۴</sup>، سیدحسین راستا<sup>۵</sup>، علی عبدالهی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانشیار مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۳- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۴- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۵- دانشیار گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات: abedelahia@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۹/۶/۱۸ پذیرش نهایی: ۹۹/۱۰/۳)

### چکیده

داروهای مورد استفاده در درمان سرطان‌ها، اثرات مضر در ارگان‌های با تقسیمات سریع سلولی از جمله بافت بیضه دارند. آنتاگونیست‌های گنادوتروپین با مهار تقسیم در سلول‌های اسپرماتوژنیک باعث حفاظت سلول‌های مذکور از عوارض داروهای شیمی‌درمانی از جمله سیکلوفسفامید می‌گردند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی توانایی سترورلیکس (آنتاگونیست گنادوتروپین)، در مهار اثرات سوء سیکلوفسفامید در بافت بیضه موش سوری بود. بدین منظور ۳۰ سر موش سوری بالغ نر ۸-۶ هفته‌ای به ۳ گروه کنترل (هیچ دارویی را دریافت نکردند)، آزمایش ۱ (دریافت‌کننده ۵۰ mg/kg وزن بدن، سیکلوفسفامید به صورت داخل صفاقی) و آزمایش ۲ (دریافت‌کننده ۰/۲۵ mg/kg وزن بدن، سترورلیکس به صورت زیرجلدی به همراه سیکلوفسفامید به میزان ۵۰ mg/kg وزن بدن) تقسیم شدند. ۳۵ روز بعد از آخرین تزریق سترورلیکس، همه موش‌ها تحت بیهوشی کشته شده و بیضه آن‌ها برای مطالعات هیستومورفومتريک و فراساختاری برداشته شد. مطالعه لوله‌های سمینی‌فر با میکروسکوپ نوری نشان‌دهنده کاهش شدید سلول‌های اسپرماتوژنیک و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال و کاهش معنی‌دار میانگین شاخص اسپرمیوژنز (spermiogenesis index; SI) و تعداد سلول‌های سرتولی در گروه آزمایش ۱ بود ( $p < 0/05$ ). مطالعه میکروسکوپ الکترونی نیز نشان‌دهنده آسیب به سلول‌های سرتولی و پیدایش فضاهای وسیع و متعددی در بین این سلول‌ها و سلول‌های اسپرماتوژنیک بود. از طرف دیگر در سلول‌های سرتولی، میتوکندری‌های در حالت تخریب قابل تشخیص بودند. اما در گروه آزمایش ۲، شرایط تا اندازه‌ای شبیه گروه کنترل بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سترورلیکس می‌تواند اپی‌تلیوم ژرمینال را تا حدودی از اثرات سوء سیکلوفسفامید حفاظت کند.

کلیدواژه‌ها: بیضه، سیکلوفسفامید، سترورلیکس، موش سوری.

## مقدمه

2007; Zhang *et al.*, 2008; Sieniawski *et al.*, 2008; El-Awady *et al.*, 2016). تحقیقات نشان داده که سیکلوفسفامید در افراد مذکر موجب کاهش تستوسترون و آسیب به بافت بیضه شده و در نهایت موجب اختلال در اسپرماتوزن می‌گردد (Bustos-Obregon *et al.*, 2007). بنابراین حفاظت از اسپرماتوزن و حفظ باروری در طی شیمی درمانی موضوع مهمی می‌باشد (Shetty *et al.*, 2002).

برای حفظ اسپرماتوزن از اثرات سوء داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی، راه‌های مختلفی وجود دارد. یکی از این روش‌ها این است که در طی شیمی درمانی بتوان مانع از تقسیم سلول‌های اسپرماتوزنیک شده و این سلول‌ها دیگر به عنوان سلول هدف برای این داروها قرار نگیرند و از اثرات سوء این داروها محافظت شوند، چراکه داروهای مذکور فقط سلول‌های در حال تقسیم را مورد هدف قرار می‌دهند. برای جلوگیری از تقسیم سلول‌های اسپرماتوزن نیز روش‌های مختلفی وجود دارد. یکی از این روش‌ها، مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیزی است، زیرا که اسپرماتوزن تحت تأثیر هورمون‌های FSH (follicle stimulating hormone) و LH (luteinizing hormone) می‌باشد. برای مهار FSH و LH از طریق محور هیپوتالاموس - هیپوفیزی نیز روش‌های متعددی نظیر استفاده از آگونیست و یا آنتاگونیست‌های GnRH (gonadotropin releasing hormone) وجود دارد (Vaisheva *et al.*, 2007; Harel *et al.*, 2011). استفاده از آنتاگونیست GnRH برای متوقف کردن اسپرماتوزن اولین بار توسط گلود و همکارانش در سال ۱۹۸۱ مطرح شد که می‌توان با مهار محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی موجب کاهش LH و FSH

روش‌های مختلفی برای درمان بیماران مبتلا به سرطان از جمله جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی بکار می‌رود (Kenney *et al.*, 2001). یکی از داروهایی که به‌طور وسیع در شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد سیکلوفسفامید می‌باشد (Jonat *et al.*, 2002; Kaffashielahi, 2013; Okuda, 2014; Krüger-Genge *et al.*, 2018). سیکلوفسفامید داروی آلیکله کننده‌ای است که از زمان‌های قدیم در درمان انواع سرطان‌ها از جمله سارکوما، بیماری‌های هوجکین، مولتیپل اسکلروزیس و همچنین به عنوان داروی سرکوب کننده سیستم‌های ایمنی، آرتزیت روماتوئید و سایر بیماری‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kenney *et al.*, 2001; Uber *et al.*, 2007; Okuda, 2014; Wong *et al.*, 2019). بررسی‌های متعدد نشان داده که تزریق داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی موجب اختلال در تولید گنادوتروپین‌ها و آسیب بافت بیضه و در نهایت موجب اختلال در اسپرماتوزن و آزواسپرمی و بدنال آن نازایی می‌گردند (Kenney *et al.*, 2001; Drumond *et al.*, 2011; Mohammadnejad *et al.*, 2012; Nejad *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014). تقریباً تمامی داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی، سلول‌های در حال تقسیم سریع در بدن، از جمله سلول‌های سرطانی، سلول‌های مغز استخوان، اپی‌تلیوم دستگاه گوارش و گنادها را مورد هدف قرار داده و نابود می‌کنند. متأسفانه این داروها هوشمند نبوده و بعد از استفاده، همه سلول‌های مذکور، اعم از سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم را مورد هدف قرار می‌دهند (Li *et al.*, 2006; de Jong *et al.*, 2006).

### مواد و روش‌ها

- حیوانات مورد استفاده: در این مطالعه تجربی که با همکاری مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد، از موش‌های سوری نر ۸-۶ هفته‌ای با میانگین وزنی  $29 \pm 2$  گرم که از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری شده بود، استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ثابت  $22 \pm 2$  درجه سلسیوس و با دسترسی کافی به آب و غذا در قفس‌های مخصوص حیوانات نگه‌داری می‌شدند. کلیه مراحل آزمایش و نگه‌داری حیوانات، تحت نظر کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفت.

- آماده سازی و تیمار حیوانات: بدین منظور، تعداد ۳۰ سر موش سوری به‌طور تصادفی در ۳ گروه مساوی تقسیم شدند. حیوانات گروه اول به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که هیچ دارویی را دریافت نکردند. گروه دوم، گروه آزمایش ۱ بود که موش‌های این گروه، روزانه  $50 \text{ mg/kg}$  وزن بدن، سیکلوفسفامید را به عنوان داروی مورد استفاده در شیمی درمانی به مدت ۵ روز متوالی به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه سوم هم به عنوان گروه آزمایش ۲ در نظر گرفته شد و حیوانات این گروه هم، سیکلوفسفامید را به همراه آنتاگونیست سترورلیکس دریافت کردند. به‌طوری‌که تزریق سترورلیکس هفته‌ای ۳ بار بصورت زیرجلدی هر بار به میزان  $0/25 \text{ mg/kg}$  وزن بدن و تزریق سترورلیکس ( $0/25 \text{ mg/kg}$  وزن بدن) یک هفته قبل از تزریق سیکلوفسفامید ( $50 \text{ mg/kg}$  وزن

شده و از این طریق موجب توقف اسپرماتوژنز و در نهایت موجب حفاظت از این سلول‌ها طی شیمی درمانی گردید (Glode *et al.*, 1981). همچنین در این ارتباط، گزارش‌ها نشان می‌دهد که سترورلیکس هم به عنوان آنتاگونیست GnRH از مدت‌ها قبل برای درمان برخی از بدخیمی‌ها نظیر سرطان پروستات (Cook and Sheridan, 2000)، اندومتر رحم و تخمدان (Gründker *et al.*, 2004) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حالت طبیعی GnRH موجب ترشح LH و FSH از سلول‌های گنادوتروپیک هیپوفیز قدامی می‌شود. سترورلیکس در واقع با GnRH طبیعی بدن رقابت کرده و به رسپتورهای سطحی گنادوتروپیک‌ها وصل می‌شود و موجب توقف ترشح LH و FSH شده و به این صورت باعث مهار اسپرماتوژنز می‌گردد (Reissmann *et al.*, 2000).

با توجه به مطالب ذکرشده، در مطالعه حاضر از سترورلیکس به عنوان یک آنتاگونیست GnRH برای جلوگیری از آسیب به بافت بیضه و مهار اسپرماتوژنز در هنگام شیمی درمانی به عنوان یک پروتکل حفاظتی در برابر اثرات سوء سیکلوفسفامید استفاده شد. در این تحقیق سعی شده‌است تا مطالعه جامع‌ای بر روی تغییرات هیستومورفومتری و فراساختاری بافت بیضه به دنبال مصرف سیکلوفسفامید (بعنوان داروی شیمی درمانی) انجام شود و همچنین اثرات حمایتی سترورلیکس (به عنوان آنتاگونیست GnRH) در جلوگیری از تخریب سلول‌های اسپرماتوژنیک و حفاظت از تغییرات فراساختاری بافت بیضه پس از مصرف سیکلوفسفامید، بررسی گردد.

هر لوله سمینی فر به روش مشابه اقطار فضای خالی داخل لوله نیز اندازه گیری شده و میانگین آن‌ها نیز به دست آمد و سپس میانگین اقطار فضای خالی لوله سمینی فر از میانگین اقطار کلی لوله سمینی فر کسر گردید تا ضخامت اپی تلیوم ژرمینال بدست آید.

- **تعیین شاخص اسپرماتوژنز (spermiogenesis index; SI):** برای محاسبه SI از لوله‌های سمینی فر حاوی اسپرماتیدهای دراز در مرحله ۱۶-۱۵ استفاده شد. بدین منظور در هر نمونه، تعداد لوله‌های سمینی فر حاوی اسپرماتیدهای دراز نسبت به سایر لوله‌های سمینی فر در ۲۰ میدان میکروسکوپی با عدسی ۴۰ مورد شمارش قرار گرفت.

- **تعیین تعداد سلول‌های سرتولی:** بدین منظور تعداد سلول‌های سرتولی هر نمونه در مقاطع عرضی لوله‌های سمینی فر در ۲۰ میدان با عدسی ۴۰ مورد شمارش قرار گرفت. لازم به ذکر است که در این مرحله، سلول‌های سرتولی با توجه به ویژگی مشخص (هسته روشن بیضوی یا مثلثی شکل با هستک مشخص) تشخیص داده شدند که شبیه هیچکدام از سلول‌های اسپرماتوژنیک واقع در لوله‌های سمینی فر نبودند.

- **مطالعه فراساختاری:** به این منظور قطعاتی از بیضه چپ موش‌ها در داخل گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد (Pro. Sci. Tech. Au) برای ۱۲ ساعت قرار گرفته و بعد از شستشو با بافر فسفات (DNAbiotech, Iran) ۰/۲ مولار، داخل فیکساتیو تتراکسید اسمیوم (TAAB, UK) به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. سپس مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی انجام شده و در نهایت داخل رزین (Pro. Sci. Tech. Au) قالب‌گیری شدند و مقطع‌گیری توسط اولترامیکروتوم (Leica

بدن) شروع و تا یک هفته بعد از توقف تزریق سیکلوفسفامید نیز ادامه داشت.

- **هیستومورفومتری بیضه:** پس از گذشت ۳۵ روز از آخرین تزریق در هر سه گروه، بیضه راست و چپ همه موش‌ها، تحت بیهوشی برداشته شد. بیضه راست داخل محلول ثبوتی فرمالین ۱۰ درصد (Merck, Germany) به مدت یک هفته قرار گرفت و بعد از پایدار شدن، مراحل پاساژ انجام گرفته و در نهایت مقاطع تهیه شده با همتوکسیلین-ائوزین (Merck, Germany) رنگ‌آمیزی و برای مطالعه با میکروسکوپ نوری (Nikon E100, Japan) آماده شدند. برای جلوگیری از تورش (bias) از روش SUR (simple uniform random) استفاده شد. به این منظور از برش‌های ۴ میکرونی در فواصل ۱۵۰ میکرونی به تعداد ۳۰ مقطع تهیه شد و با توجه به تعداد کم مقاطع عرضی لوله سمینی فر، ۱۰ برش از هر نمونه رنگ‌آمیزی و مطالعه شد. بر این اساس با تقسیم ۳۰ بر ۱۰ عدد ۳ به دست آمد و بین ۱ تا ۳ یکی به طور اتفاقی به عنوان مثال ۲ انتخاب شد. بنابراین اولین مقطع مورد مطالعه مقطع شماره ۲، مقطع بعدی ۳+۲=۵ و مقاطع بعدی به ترتیب ۸، ۱۱، ۱۴، ۱۷، ۲۰، ۲۳، ۲۶ و ۲۹ بودند (Mohammad ghasemi et al., 2000).

- **تعیین ضخامت اپی تلیوم ژرمینال:** برای اندازه‌گیری ضخامت اپی تلیوم ژرمینال از نرم افزار Motic Image Plus 3.0 استفاده شد. بدین منظور قطرهای عمود بر هم هریک از مقاطع عرضی لوله‌های سمینی فر در ۲۰ میدان از مقاطع تهیه شده با عدسی ۱۰ اندازه‌گیری شده و میانگین آن‌ها به دست آمد. همچنین در

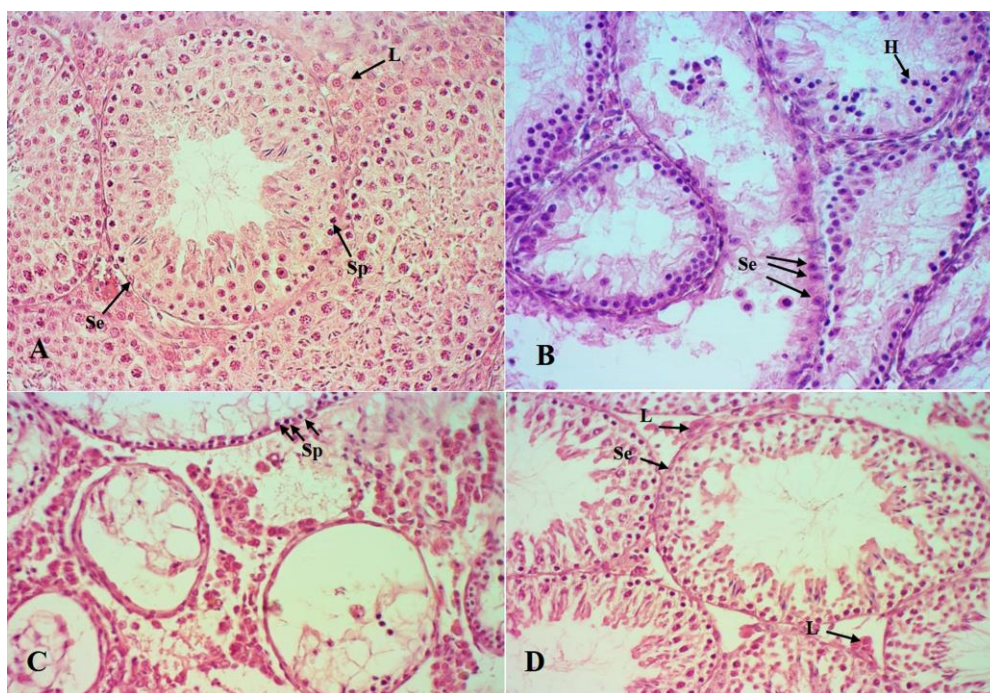
به‌عنوان مرز استنتاج اختلافات آماری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

- نتایج مربوط به مطالعه هیستومورفولوژی بیضه موش-های مورد مطالعه: مقاطع لوله‌های سمینی فر بیضه موش‌های گروه کنترل، اسپرماتوزنز طبیعی با سلول‌های در رده‌های مختلف اسپرماتوزنیک را نشان داد که در بین این سلول‌ها، سلول‌های سرتولی با هسته‌های روشن و هستک مشخص قابل تشخیص بودند. همچنین سلول‌های لاییدیک در بین لوله‌های سمینی فر قابل تشخیص بودند (شکل ۱A). در مقابل، مشاهدات ریزبینی لوله‌های سمینی فر در گروه آزمایش ۱ که داروی سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند، نشان دهنده تخریب شدید اپی‌تلیوم ژرمینال بود، به‌طوری‌که در داخل بعضی از لوله‌های سمینی فر فقط سلول‌های سرتولی دیده می‌شدند و همچنین هسته سلول‌های باقی مانده نیز نسبت به گروه کنترل پررنگ‌تر بودند (اشکال ۱B و ۱C). مطالعه لوله‌های سمینی فر در گروه آزمایش ۲ نیز که علاوه بر سیکلوفسفامید، سترورلیکس را هم دریافت می‌کردند، نشان داد که ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال نسبت به گروه آزمایش ۱ بهتر شده بود ولی در مقایسه با گروه کنترل، جداسدگی در بین اپی‌تلیوم ژرمینال دیده می‌شد (شکل ۱D).

(RM2125 RTS, Germany) انجام یافت. مقاطع نیمه نازک ۰/۵ میکرونی با تولوئیدین بلو (Merck, Germany) رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری (Nikon E100, Japan) مورد مطالعه قرار گرفتند. مقاطع نازک ۸۰ نانومتری هم با اورانیل استات (Riedel-de Haen, Germany) و سیترات سرب (Riedel-de Haen, Germany) رنگ شده و با میکروسکوپ الکترونی (LEO 906, Germany) مستقر در مرکز تحقیقات علمی و کاربردی دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد مطالعه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در بررسی حاضر، مطالعه فراساختاری بیشتر بر روی سلول‌های سرتولی متمرکز شد، چرا که این سلول‌ها نقش حفاظتی از سلول‌های اسپرماتوزنیک را دارند و عامل اصلی در ایجاد سدخونی-بیضوی هستند که برای حفاظت سلول‌های حاصل از تقسیم میوزی سلول‌های اسپرماتوزنیک در برابر سیستم ایمنی نقش بسیار مهمی دارند. همچنین این سلول‌ها نقش بسیار مهمی در ایجاد تخصص یافتگی اکتوپلاسمی (ectoplasmic specialization; ES) در بین اسپرماتیدهای در حال دراز شدن و سرتولی‌ها دارند.

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های کمی به‌دست آمده، به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده و تحلیل آن‌ها هم با استفاده از روش‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تکمیلی توکی (Tukey) صورت گرفت. همچنین  $p < 0/05$



شکل ۱- فوتومیکروگرافی از لوله‌های سمینی فر موش‌های مورد آزمایش: (A) گروه کنترل، به اسپرماتوزنز فعال و طبیعی درون لوله‌های سمینی فر و سلول‌های لایدیک بین لوله‌ها دقت شود. (B و C) گروه آزمایش ۱، هسته سلول‌های اسپرماتوگونی به‌طور واضح پررنگ و متراکم بودند. به افزایش تعداد سلوهای سرتولی و کاهش شدید اپی تلیوم ژرمینال دقت شود. (D) گروه آزمایش ۲، سلول‌های اسپرماتوگونی در چندین لایه دیده می‌شوند (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی  $\times 660$ ). L: سلول‌های لایدیک، Sp: سلول‌های اسپرماتوگونی، Se: سلوهای سرتولی، H: هسته سلول‌های اسپرماتوگونی.

وجود، تفاوت ضخامت اپی تلیوم نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ( $p < 0/05$ ).

- نتایج مربوط به سنجش شاخص SI: چنانچه در جدول ۱ نشان داده شده‌است، میانگین SI در گروه کنترل  $2/2 \pm 0/2$ ، در گروه آزمایش ۱،  $4/9 \pm 0/4$  و در گروه آزمایش ۲،  $4/1 \pm 0/1$  بود. همچنین نتایج نشان دادند که میانگین SI در گروه آزمایش ۱ نسبت به گروه کنترل، اختلاف آماری معنی‌داری داشت ( $p < 0/001$ )، اما نتایج مذکور در مورد حیوانات گروه آزمایش ۲ نسبت به یافته‌های گروه کنترل در این

- نتایج مربوط به مطالعه هیستومورفومتری بیضه موش‌های مورد مطالعه: میانگین ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در گروه کنترل،  $19/1 \pm 7$  میکرومتر، در گروه آزمایش ۱،  $14/4 \pm 5$  میکرومتر و در گروه آزمایش ۲،  $16/4 \pm 3/1$  میکرومتر بود (جدول ۱). تحلیل آماری ارقام بدست آمده هم نشان داد که ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در گروه آزمایش ۱ نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ( $p < 0/05$ ). همچنین هر چند که در گروه آزمایش ۲، ضخامت اپی تلیوم نسبت به گروه آزمایش ۱ افزایش یافته بود ولی با این

نشان داد که تعداد سلول‌های سرتولی در گروه آزمایش ۱ نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافته بود ( $p < 0/05$ ) ولی در گروه آزمایش ۲ تعداد سلول‌های سرتولی مشابه گروه کنترل بود (جدول ۱).

خصوصاً، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0/05$ ).

نتایج تعیین تعداد سلول‌های سرتولی: میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه کنترل  $10/1 \pm 3$ ، در گروه آزمایش ۱،  $13/01 \pm 0/1$  و در گروه آزمایش ۲،  $7/1 \pm 0/1$  بود. مقایسه آماری ارقام به دست آمده نیز

جدول ۱- مقایسه ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال (میکرومتر)، میانگین SI و تعداد سلول‌های سرتولی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)، در لوله‌های سمینی فر بیضه موش‌های گروه‌های مورد مطالعه

گروه مورد مطالعه	ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال	میانگین SI	تعداد سلول‌های سرتولی
کنترل	$19/7 \pm 1$	$4/0 \pm 2/2$	$10/3 \pm 1$
آزمایش ۱	$5 \pm 14^*$	$1/0 \pm 9/4^*$	$13/0 \pm 0/1^*$
آزمایش ۲	$16/4 \pm 3/1^*$	$4/0 \pm 1/1$	$7/1 \pm 0/1$

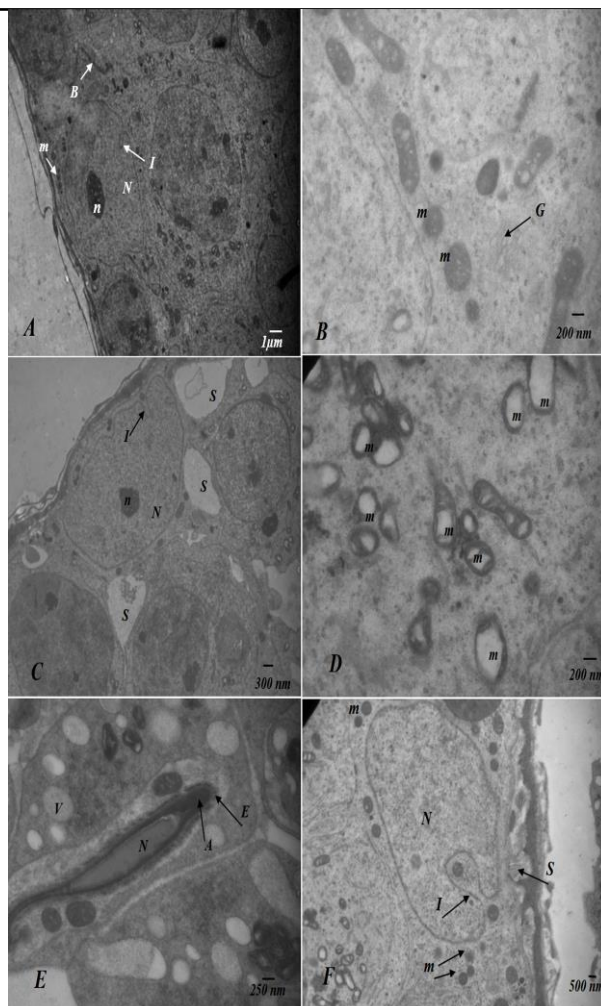
\* اختلاف آماری معنی‌دار با گروه کنترل وجود دارد ( $p < 0/05$ ).

در حالت تخریب بودند که با واکوئله شدن کریستاهای میتوکندری‌ها، قابل تشخیص بودند. همچنین تخصص‌یافتگی اکتوپلاسمی بسیار نامنظم‌تر به نظر می‌رسید و سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی دارای واکوئله‌های متعدد بودند (اشکال ۲C، ۲D و ۲E). همچنین در یافته‌های مربوط به نمونه‌های مربوط به حیوانات گروه آزمایش ۲، سلول‌های سرتولی از لحاظ فراساختاری مشابه سلول‌های سرتولی گروه کنترل بوده و فضاهایی در بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های مجاور دیده نمی‌شد. با این وجود هنوز فضاهایی بین سلول‌های سرتولی با غشاء پایه در بعضی قسمت‌ها مشاهده شد (شکل ۲F).

نتایج مربوط به مطالعه فراساختاری بیضه موش‌های مورد مطالعه

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی در مورد نمونه‌های مربوط به حیوانات گروه کنترل نشان داد که سلول‌های سرتولی با هسته روشن و هستک مشخص در روی غشاء پایه قرار گرفته بودند و بین آن‌ها در بعضی از قسمت‌ها، سدخونی-بیضوی قابل مشاهده بود. همچنین با درشت‌نمایی بیشتر، در داخل سلول‌ها، ارگانل‌هایی مانند میتوکندری و دستگاه گلژی قابل تشخیص بودند و هیچگونه جداشدگی بین این سلول‌ها و سلول‌های اسپرماتوزئیک مشاهده نمی‌شد (اشکال ۲A و ۲B). اما نتایج مربوط به نمونه‌های مربوط به موش‌های گروه آزمایش ۱ نشان داد که فضاهای وسیع و متعددی در بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتوزئیک وجود داشتند. همچنین مطالعه با درشت‌نمایی بالاتر نشان داد که میتوکندری‌ها





شکل ۲- الکترون میکروگرافی از سلول‌های سرتولی بافت بیضه موش‌های مورد مطالعه: A و B) گروه کنترل، به سلول سرتولی با هسته روشن (N) و هسته مشخص (n) و فرورفتگی در غشا هسته (I) و میتوکندری‌های پراکنده (M)، دستگاه گلژی (G) و سد خونی بیضوی (B) دقت شود. C، D و E) گروه آزمایش ۱، به فضاهای بین سلول‌های سرتولی با سایر سلول‌ها (S)، میتوکندری‌های واکنش (M) و تخصص‌یافتگی اکتوپلاسمی نامنظم (E) و واکنش‌های متعدد درون سلول‌های سرتولی (V) دقت شود. به فرورفتگی در غشاء هسته (I) و هسته اسپرماتید (N) در حال دراز شدن آکروزوم (A) دقت شود. F) گروه آزمایش ۲، به عدم وجود فضا بین سلول‌های سرتولی و سلول‌های مجاور دقت شود. در این عکس هسته سلول‌های سرتولی (N)، فرورفتگی غشا هسته (I)، میتوکندری‌های نرمال (M)، فضاهای بین سلول سرتولی و غشای پایه (S) مشخص می‌باشند.

## بحث و نتیجه‌گیری

هدف تحقیق حاضر، مطالعه اثرات مهاری سترورلیکس به عنوان آنتاگونیست GnRH بر آسیب‌های ناشی از سیکلوفسفامید بود. مطالعات قبلی نیز نشان داده بودند که عوامل شیمی درمانی از جمله سیکلوفسفامید اثرات سوء بر اسپرماتوژنز دارند

(Elangovan *et al.*, 2006; Dere *et al.*, 2013; )

(Yuan *et al.*, 2014). نتایج مطالعه ما نشان داد که بدنبال استفاده از سیکلوفسفامید، سلول‌های اپی‌تلیوم ژرمینال از بین رفته‌اند، به طوری که در بعضی از لوله‌ها فقط سلول‌های سرتولی دیده می‌شدند و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال نیز کاهش یافته بود. در واقع

پررنگ‌تر شدن هسته سلول‌های باقی‌مانده در پژوهش حاضر باشند.

همچنین در تحقیق حاضر، تعداد سلول‌های سرتولی افزایش پیدا کرده بود (جدول ۱). البته در این مورد گزارشات ضد و نقیضی وجود دارد، چرا که بعضی از محققین مانند آیچ و مانا در سال ۲۰۰۱ و همچنین اسمارت و همکارانشان در سال ۲۰۱۸ نشان داده‌اند که تعداد سلول‌های سرتولی بدنال شیمی درمانی تغییر نمی‌کند (Aich and Manna, 2001; Smart *et al.*, 2018) ولی سائو و همکارانشان در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که تعداد این سلول‌ها به بدنال شیمی درمانی کاهش پیدا می‌کند (Cao *et al.*, 2017). اما در مطالعه‌ای، کاهش تعداد سلول‌های سرتولی به بدنال اشعه درمانی در بافت بیضه پیوندی، گزارش شده است (Jahnukainen *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد که افزایش تعداد سلول‌های سرتولی در مطالعه حاضر را به دو صورت می‌توان توجیه کرد، اول این‌که به علت از بین رفتن سلول‌های اسپرماتوژنیک، کاهش قطر لوله‌های سمینیفر و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال، در واقع سلول‌های سرتولی بارزتر و فشرده‌تر شده و به نظر می‌آید که تعدادشان افزایش پیدا کرده است (Nejad *et al.*, 2012; Mohammadnejad *et al.*, 2008) و دوم اینکه چون تعادلی بین تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی‌ها وجود دارد و آپوپتوزیس در شرایط نرمال، تعادل بین جمعیت سلول‌های سرتولی و اسپرماتوژنیک را حفظ می‌نماید (Francavilla *et al.*, 2002)، بنابراین تعداد سلول‌های سرتولی به بدنال از بین رفتن تعداد بیشتری از سلول‌های اسپرماتوژنیک

یافته‌های پژوهش حاضر، همسو با نتایج سایر محققین، نشان داد که داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی بر سلول‌هایی که به سرعت تقسیم می‌شوند اثر کرده و مانع تقسیم و در نهایت از بین رفتن آنها می‌شوند (Howell and Shatel, 2005; El-Awady *et al.*, 2018; DeVita *et al.*, 2016). البته در این خصوص، بعضی از محققین بیان کرده‌اند که از بین رفتن سلول‌های اسپرماتوژنیک به بدنال شیمی درمانی، به علت افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک می‌باشد (Andriana *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2005; Ramazani *et al.*, 2015).

همچنین یافته‌های مطالعه حاضر، نشان دهنده پررنگ شدن هسته سلول‌های باقی‌مانده نیز بود که مطابق با یافته سایر محققین می‌باشد چرا که تغییرات در DNA به بدنال استفاده از مواد شیمی‌درمانی نیز گزارش شده است (El-Awady *et al.*, 2016). البته گزارش شده عوامل دیگری نیز در ایجاد اختلال در اسپرماتوژنز به بدنال مصرف سیکلوفسفامید دخیل هستند، به طوری که به بدنال استفاده از این داروها، سطح FSH، LH و تستوسترون بالا می‌رود (Udagawa *et al.*, 2001; Shetty and Meistrich, 2005) که افزایش تستوسترون در داخل بیضه اثرات مضر بر اسپرماتوژنز دارد (Shetty *et al.*, 2000) چرا که موجب کاهش بیان SCF (stem cell factor) می‌شود که برای اسپرماتوژنز ضروری است (Udagawa *et al.*, 2001). لذا احتمالاً تغییرات حاصله در مقادیر عوامل نامبرده نیز می‌توانستند توجیه کننده کاهش ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال و همچنین

(سدخونی - بیضوی) می شود (Su et al., 2011). همچنین بخش دیگری از مطالعه فراساختاری بافت بیضه موش‌ها در تحقیق حاضر، تغییرات شدیدی را در ES گروه آزمایشی نشان داد (شکل ۲E) که همسو با یافته‌های هیوود و همکاران بود (Haywood et al., 2003). پس می‌توان نتیجه گرفت در این مطالعه تزریق سیکلوفسفامید موجب آسیب به سلول‌های سرتولی و در نهایت آسیب جدی به ES و نقص در شکل‌گیری سلول‌های اسپرماتوژنیک گردیده‌است. تخصص یافتگی اکتوپلاسمی (ES)، ناحیه بسیار تخصصی در بین اسپرماتیدهای در حال دراز شدن و سلول‌های سرتولی است و نقش اساسی در عملکرد سلول‌های ژرمینال دارد (O'Donnell et al., 2000) و نه تنها موجب اتصال مکانیکی سلول‌ها به هم شده بلکه موجب شکل‌گیری و تمایز اسپرماتیدها نیز می‌شود (Wolski et al., 2005)، به طوری که در تحقیقی نشان داده شده که با از بین بردن این ناحیه، دراز شدن اسپرماتیدها (تمایز اسپرماتیدها) شکل نمی‌گیرد (Nejad et al., 2008).

از طرف دیگر در گروه آزمایشی ۲ که موش‌های مورد آزمایش مربوطه، به همراه سیکلوفسفامید، سترورلیکس را هم دریافت می‌کردند، مشخص شد که سترورلیکس تا حدودی توانایی ترمیم اپی تلیوم ژرمینال را دارا می‌باشد (جدول ۱). البته در مورد اثرات مهاری آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های GnRH گزارشات ضد و نقیضی وجود دارد (Nanomura et al., 1991; Mohammadnejad, et al., 2013; Xie, et al., 2018) که به نظر می‌رسد، این نتایج متناقض شاید به این دلیل باشد که سلول‌های

توسط سیکلوفسفامید، افزایش می‌یابند (تکثیر جبرانی).

از طرف دیگر، مطالعه فراساختاری بافت بیضه موش‌های مورد آزمایش با میکروسکوپ الکترونی نیز فضاهای خالی در بین سلول‌های سرتولی و سایر سلول‌های اسپرتوماگونی و غشاء پایه را نشان داد. تغییراتی از قبیل جدا شدن سلول‌های اسپرماتوگونی از سلول‌های سرتولی نشانه‌هایی از تغییرات قبل از آپوتوز می‌باشد (Newton et al., 1993). سلول‌های سرتولی رسپتورهایی برای FSH (Bhattacharya, 2019) و تستوسترون دارند (Allan et al., 2004) که بیانگر نقش این هورمون‌ها بر عملکرد سلول‌های سرتولی است و ایجاد فضاها در اطراف این سلول‌ها مانع از رسیدن این هورمون‌ها به سلول‌های سرتولی شده و در نهایت اختلالاتی در عملکرد این سلول‌ها ایجاد می‌نماید. از طرف دیگر جدا شدن سلول‌های سرتولی از سلول‌های اسپرماتوژنیک می‌تواند مانع از رسیدن پیام‌های پاراکرینی از سلول‌های سرتولی به سلول‌های اسپرماتوژنیک شده و عملکرد سلول‌های اسپرماتوژنیک را مختل نماید (Bhattacharya, 2019). از طرف دیگر این سلول‌ها نقش مهمی در ایجاد سد خونی-بیضوی و اسپرماتوژنز نرمال دارند که موجب می‌شود که عوامل ایمنی بدن به سلول‌های در حال تقسیم اسپرماتوژنیک دسترسی نداشته باشد و این سلول‌ها در محیطی عاری از آنتی‌ژن‌ها، تکامل پیدا کنند و همانطور که گفته شد سیکلوفسفامید موجب تغییراتی در سلول‌های سرتولی می‌شود و این تغییرات هم موجب تغییر در عملکرد این سلول‌ها و در نهایت تغییر در ساختار اتصالات بین سلول‌های سرتولی

موجب مهار تمایز اسپرماتوگونی بعد از رادیوتراپی می‌شود (Shetty *et al.*, 2002). همچنین گزارش شده که با کاهش دادن میزان تستوسترون بعد از رادیوتراپی، می‌توان موجب بهبود اسپرماتوژنز شد (Meistrich and Shetty, 2003).

به‌طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که تزریق سیکلوفسفامید اثرات مخرب بر اسپرماتوژنز دارد و استفاده از سترورلیکس به عنوان آنتاگونیست GnRH تا حدودی می‌تواند سلول‌های اسپرماتوژنیک لوله‌های سمینی‌فر را از اثرات مضر سیکلوفسفامید محافظت کند. با این حال انجام مطالعات بیشتری در زمینه شناخت مکانیسم دقیق سترورلیکس در مهار اثرات مخرب سیکلوفسفامید بر بافت بیضه، ضروری به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی و همچنین مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر تامین هزینه اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچگونه تضاد منافی ندارند.

بازال رفتارهای متفاوتی را نسبت به درمان نشان می‌دهند و نیز حتی نشان داده شده که موش‌های صحرائی با نژادهای مختلف، حساسیت‌های متفاوتی را نسبت به آسیب‌ها نشان می‌دهند (Hild *et al.*, 2001; Bakhtiari *et al.*, 2020).

در مورد اثرات مهاری سترورلیکس در تحقیق حاضر، می‌توان گفت که سیکلوفسفامید علاوه بر آن- که بر روی سلول‌های در حال تقسیم اثر مستقیم دارد و موجب مرگ آن‌ها می‌شود، بلکه قسمتی از اثرات خود را از طریق تغییرات هورمونی اعمال می‌کند، چرا که بعد از شیمی درمانی مقدار هورمون‌های FSH و LH و تستوسترون افزایش پیدا می‌کند (Udagawa *et al.*, 2001; Shetty and Meistrich, 2005) و افزایش تستوسترون در بیضه اثرات مضر بر روند اسپرماتوژنز دارد (Shetty *et al.*, 2000). بنابراین به نظر می‌رسد که با کاهش دادن مقدار این هورمون‌ها، می‌توان بافت بیضه را از اثرات مضر داروهای شیمی درمانی حفظ کرد و این همان مکانیسمی است که آنتاگونیست‌های GnRH انجام می‌دهند. به عبارت دیگر آنتاگونیست‌های GnRH موجب کاهش FSH، LH و تستوسترون شده و در نتیجه موجب مهار تکثیر اسپرماتوگونی‌ها می‌شوند و از طرف دیگر با کاهش FSH و تستوسترون موجب حفظ اسپرماتوگونی‌های باقی مانده از اثرات مضر افزایش این هورمون‌ها می‌شوند. در همین راستا شتی و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که افزایش تستوسترون موجب کاهش ترمیم اسپرماتوژنز و افزایش FSH و نیز

## منابع

- Aich, S. and Manna, C.K. (2001). Histo physiological changes of the testicular tissue due to busulphan administration in the wild Indian. *Acta Biologica Hungarica*, 52(1): 105-116.
- Allan, C.M., Garcia, A., Spaliviero, J., Zhang, F.D. and Jimenz, M. (2004). Complete sertoli cell proliferation induced by follicle stimulation hormone (FSH) Independently of luteinizing hormone activity: Evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology*, 145(4): 1587-1593.
- Andriana, B.B., Tay, T.W., Maki, I., Awal, M.A., Kanai, Y., Kurohmaru, M., *et al.* (2004). An ultra structural study on cytotoxic effect of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goat in vitro. *Journal of Veterinary Science*, 5(3): 235-240.
- Bakhtiary, Z., Shahrooz, R., Ahmadi, A. and Soltananejad, F. (2020). Protective effect of ethyl pyruvate on testicular histology and fertilization potential in cyclophosphamide treated mice. *Veterinary Research Forum*, 11(1): 7-13.
- Bhattacharya, I., Basu, S., Pradhan, B.S., Sarkar, H., Nagarajan, P. and Majumdar, S.S. (2019). Testosterone augments FSH signaling by upregulating the expression and activity of FSH-Receptor in Pubertal Primate Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 482: 70-80.
- Bustos-Obregon, E., Carvallo, M., Hartley-Belmar, R., Sarabia, L. and Ponce, C. (2007). Histopathological and histometrical assessment of boron exposure effects on mouse spermatogenesis. *International Journal of Morphology*, 25(4): 919-925.
- Cao, Y., Wang, X., Li, S., Wang, H., Yu, L. and Wang, P. (2017). The effects of l-carnitine against cyclophosphamide-induced injuries in mouse testis. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 120(2): 152-158.
- Charak, B.S., Gupta, R., Mandrekar, P., Sheth, N.A., Banavali, S.D., Saikia, T.K., *et al.* (1990). Testicular dysfunction after cyclophosphamide-vincristine procarbazine-prednisolone chemotherapy for advanced Hodgkin's disease. A long-term follow-up study. *Cancer*, 65(9): 1903-1906.
- Cook, T. and Sheridan, W.P. (2000). Development of GnRH antagonists for prostate cancer: new approaches to treatment. *Oncologist*, 5(2): 162-168.
- de Jong, W.K., Groen, H.J., Koolen, M. G., Biesma, B., Willems, L.N., Kwa, H.B., *et al.* (2007). Phase III study of cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide compared with carboplatin and paclitaxel in patients with extensive disease small-cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 43(16): 2345-2350.
- Dere, E., Anderson, L.M., Hwang, K. and Boekelheide, K. (2013). Biomarkers of chemotherapy-induced testicular damage. *Fertility and Sterility*, 100(5): 1192-1202.
- DeVita, V.T., Rosenberg, S.A. and Lawrence, T.L. (2018). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 11th ed., Philadelphia: Lippincott, pp: 1533-1577.
- Drumond, A.L., Weng, C.C., Wang, G., Chiarini-Garcia, H., Eras-Garcia, L. and Meistrich, M.L. (2011). Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. *Reproductive Toxicology*, 32(4): 395-406.
- Elangovan, N., Chiou, T.J., Tzeng, W.F., and Chu, S.T. (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*, 222(1-2): 60-70.
- El-Awady, R.A., Semreen, M.H., Saber-Ayad, M.M., Cyprian, F., Menon, V. and Al-Tel, T.H. (2016). Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates synergism between doxorubicin and anew imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. *DNA Repair (Amst)*, 37: 1-11.
- Francavilla, S.P., D Abrizio, P., Cordeschi, G., Pelliccione, F., Necozone, S., Ulisse, S., *et al.* (2002). Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 8(3): 213-220.

- Glode, L.M., Robinson, J. and Gould, S.F. (1981). Protection from CP induced testicular damage with an analogue of gonadotrophin-releasing hormone. *Lancet*, 1(8230): 1132-1136.
- Gründker, C., Schlotawa, L., Viereck, V., Eicke, N., Horst, A., Kairies, B., *et al.* (2004). Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *European Journal of Endocrinology*, 151(1): 141-149.
- Harel, S., Fermé, C. and Poirot, C. (2011). Management of fertility in patients treated for Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 96(11): 1692-9169.
- Haywood, H., Spaliviero, J., Jimenz, M., King, N.J., Handelsman, D.J. and Allan, C.M. (2003). Sertoli cell and germ cell development in hypogonadal mice (hpg) expressing transgenic follicle stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*, 144(2): 509-517.
- Hild, S.A., Meistrich, M.L., Blye, R.P. and Reel, J.R. (2001). Lupron depot prevention of antispermatogenic/antifertility activity of the indenopyridine, CDB-4022 in the rat. *Biology of Reproduction*, 65(1): 165-172.
- Hou, M., Chrysis, D., Nurmio, M., Parvinen, M., Eksborg, S., Söder, O., *et al.* (2005). Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostin can not protect against this cytotoxicity. *Cancer Research*, 65(21): 9999-10005.
- Howell, S.J. and Shatel, S.M. (2005). Spermatogenesis after cancer treatment: Damage and Recovery. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 34: 12-17.
- Jonat, W., Kaufmann, M., Sauerbrei, W., Blamey, R., Cuzick, J., Namer, M., *et al.* (2002) Goserelin versus CP, methotrexate and fluorouracil as adjuvant therapy in premenopausal patients with node-positive breast cancer: The Zoladex Early Breast Cancer Research Association Study. *Journal of Clinical Oncology*, 20(24): 4628-4635.
- Kaffashielahi, R. (2013). Protective effects of Resveratrol against chemotherapy drug cisplatin induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 7(4): 286-299. [In Persian]
- Kenney, L.B., Laufer, M.R., Grant, F.D., Grier, H. and Diller, L. (2001). High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer*, 91(3): 613-621.
- Krüger-Genge, A., Steinbrecht, S., Küpper, J.H., Lendlein, A. and Jung, F. (2018). Evidence for cytostatic effect of cyclophosphamide on human vein endothelial cells in cancer therapy: Preliminary in vitro results. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 69(1-2): 267-276.
- Li, D.J., Xu, Z.S., Zhang, Z.H. and Huang, Q.Y. (2006). Antagonistic effects of vitamin E on the testicular injury by cyclophosphamide in mice. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 12(4): 318-322.
- Meistrich, M.L. and Shetty, G. (2003). Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone. *Journal of Andrology*, 24(2): 135-148.
- Mohammad Ghasemi, F., Dezfolyan, A., Mohmoudzadeh Sagheb, H.R. and Shohani, B. (2000). Application of the stereology technique in evaluation the addictive effects of morphine on the cerebella cortex volum in male rat. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 7(15): 3-13.
- Mohammadnejad, D., Abedelahi, A. and Rashtbar, M. (2013). Protective role of GnRH on chemotherapy-induced spermatogenesis disorder: a morphological study. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2): 323-328.
- Mohammadnejad, D., Abedelahi, A., Soleimani-rad, J., Mohammadi-roshandeh, A., Rashtbar, M. and Azami, A. (2012). Degenerative effect of cisplatin on testicular germinal epithelium. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(2): 173-177.
- Mohammadnejad, D., Soleimani-rad, J., Abedelahi, A. and Peirovi, T. (2013). Study of the preventive effects of cetrorelix on blood-testis barrier and spermatogenesis injuries caused by

- chemotherapy with cisplatin in adult Balb/C mice. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 7(1): 1774-1785. [In Persian]
- Nanomura, M., Okada, K., Hida, S. and Yoshid, O. (1991). Does a gonadotropin releasing hormone analogue prevent cisplatin-induced spermatogenic impairment? An experimental study in the mouse. *Urological Research*, 19(2): 135-140.
  - Nejad, D.M., Rad, J.S., Roshankar, L., Karimipor, M., Ghanbari, A.A., Aazami, A., *et al.* (2008). A study on the effect of thiotepa on mice spermatogenesis using light and electronic microscope. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(15): 1929-1934.
  - Nejad, D.M., Rad, J.S. and Roshandeh, M.A. (2013). Preventive effects of Cetorelix on the changes induced by Cisplatin on spermatogenic and myoid cells and basal lamina of seminiferous ducts in the testis of Balb/C mouse. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 6(4): 1665-1674. [In Persian]
  - Newton, S.C., Blaschuk, O.W. and Millette, C.F. (1993). N-cadherin mediates sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Developmental Dynamics*, 197(1): 1-13.
  - O'Donnell, L., Stanton, P.G., Bartles, J.R. and Robertson, D.M. (2000). Sertoli cell ectoplasmic specialization in the seminiferous epithelium of the testosterone suppressed adult rat. *Biology of Reproduction*, 63(1): 99-108.
  - Okuda, D.T. (2014). Immunosuppressive treatments in multiple sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 122: 503-511.
  - Reissmann, T., Schally, A.V., Bouchard, P., Riethmiller, H. and Engel, J. (2000). The LHRH antagonist cetorelix: a review. *Human Reproduction Update*, 6(4): 322-331.
  - Shetty, G. and Meistrich, M.L. (2005). Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 34: 36-39.
  - Shetty, G., Wilson, G., Hardy, M.P., Niu, E., Huhtaniemi, I. and Meistrich, M.L. (2002). Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. *Endocrinology*, 143(9): 3385-3396.
  - Shetty, G., Wilson, G., Huhtaniemi, I., Shuttlesworth, G.A., Reissmann, T. and Meistrich, M.L. (2000). Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulate and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology*, 141(15): 1735-1745.
  - Sieniawski, M., Reineke, T., Nogova, L., Josting, A., Pfistner, B., Diehl, V., *et al.* (2008). Fertility in male patients with advanced Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP: a report of the German Hodgkin study Group (GHSG). *Blood*, 111(1): 71-76.
  - Smart, E., Lopes, F., Rice, S., Nagy, B., Anderson, R.A., Mitchell, R.T., *et al.* (2018). Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. *Scientific Reports*, 8(1): 1773.
  - Su, L., Mruk, D.D. and Cheng, C.Y. (2011). Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*, 208(3): 207-223.
  - Uber, W.E., Self, S.E., Van Bakel, A.B. and Pereira, N.L. (2007). Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation. *American Journal of Transplantation*, 7(9): 2064-2074.
  - Udagawa, K., Ogawa, T., Watanabe, T., Yumura, Y., Takeda, M. and Hosaka, M. (2001). GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *International Journal of Urology*, 8(11): 615-622.
  - Vaisheva, F., Delbes, G., Hales, B.F. and Robaire, B. (2007). Effects of the chemotherapeutic agents for non-hodgkin lymphoma, CP, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Journal of Andrology*, 28(4): 578-587.
  - Veccino, P., Uranga, J. and Arechaga, J. (2001). Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma*, 217(4): 191-198.

- 
- Wong, W.J., Ruhangaza, D., Manirakiza, A., Omondi, J., Mugabe, M.C., Isabelle, I., *et al.* (2019). Concomitant classic Hodgkin lymphoma and schistosomiasis. *American Journal of Hematology*, 94(7): 840-841.
  - Wolski, K.M., Perrault, C., Tran-son-Tay, R. and Cameron, D.F. (2005). Strength measurement of the sertoli-spermatid Junctional complex. *Journal of Andrology*, 26(3): 354-359.
  - Xie, R., Chen, L., Wu, H., Chen, T., Wang, F., Chen, X., *et al.* (2018). GnRH antagonist improves pubertal CP-induced long-term testicular injury in adult rats. *International Journal of Endocrinology*, 2018.
  - Yuan, D., Wang, H., He, H., Jia, L., He, Y., Wang, T., *et al.* (2014). Protective effects of total flavonoids from Epimedium on the male mouse reproductive system against cyclophosphamide-induced oxidative injury by upregulating the expressions of SOD3 and GPX1. *Phytotherapy Research*, 28(1): 88-97.
  - Zhang, Q.H., Wu, C.F., Duan, L. and Yang, J.Y. (2008). Protective effects of ginsenoside Rg (3) against cyclophosphamide-induced DNA damage and cell apoptosis in mice. *Archives of Toxicology*, 82(2): 117-123.