# مطالعه مورفولوژی و مورفومتری بیضه گربه به دنبال تجویز مقادیر مختلف بوسولفان

مهدی عصمت‌پرست[۱]، پرویز تاجیک[۱*]، حمید قاسم‌زاده‌نوا[۱]


## چکیده

به منظور موفقیت در پیوند سلول‌های اسپرماتوگونی نیاز است تا در اولین گام مدل مناسبی برای تولید حیوانات آزواسپرمیک تعریف گردد. روش‌های متعددی جهت تولید حیوانات آزواسپرمیک موجود است که این موارد شامل استفاده از بوسولفان به صورت سیستمیک، رادیوتراپی، ایسکمی سرمایی و افزایش دمای بیضه می‌باشند. هدف از انجام این طرح ابداع روشی جهت تولید گربه‌های آزواسپرمیک به منظور آماده‌سازی آنها برای دریافت پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی با تزریق بوسولفان می‌باشد. در این مطالعه از ۱۵ راس گربه نر مو کوتاه خانگی ۳ الی ۵ ماهه استفاده شد. پس از اولین تزریق در هفته‌ی ۵، ۹، ۱۳ و ۱۷ دوزهای صفر، ٤ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، بوسولفان به صورت داخل وریدی به ترتیب به گربه‌های گروه‌های شاهد و تیمار تزریق شد. بیضه‌ها ۲ ماه پس از پایان تزریقات بوسیله جراحی خارج شد و مورد ارزیابی قرار گرفت .همچنین میانگین قطر مجرای داخل لوله اسپرم ساز و ضخامت اپیتلیوم زاینده براساس میکرومتر محاسبه شد. سلول‌های سرتولی و سلول‌های لیدیگ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی بافتی در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ٤ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بوسولفان، درجات متفاوتی از تخریب لوله های اسپرم ساز، کاهش تعداد لوله‌های اسپرم ساز و ضخامت اپیتلیوم زاینده مشاهده شد. بوسولفان از طریق تأثیر بر سلول‌های زاینده و سوماتیک موجود در بیضه می‌تواند در تخریب اسپرماتوژنز و القاء آزواسپرمی در بیضه نقش داشته باشد.


***واژگان کلیدی:*** *بوسولفان، اسپرماتوژنز، بیضه، گربه*

تاریخ دریافت:۱۳۹٦/۵/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۸/۲۷

## مقدمه

سلول‌های اسپرماتوگونی بیضه جزو سلول‌های بنیادی بدن هستند که قدرت خود افزایی و انتقال ژن به نسل‌های بعد را دارند(۱۷). این سلول‌ها در طول حیات مرتباً تقسیم شده و با تولید اسپرماتوزوئیدها قدرت باروری جنس نر را حفظ می‌کنند (۱۸). پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی تکنیکی به نسبت جدید می‌باشد که در آن سلول‌های بیضه‌ی حیوان دهنده به بیضه‌ی حیوان مبتلا به آزوسپرمی به عنوان گیرنده منتقل می‌شود و سبب اسپرماتوژنز در بیضه‌ی گیرنده می‌گردد(۷) این تکنیک برای نخستین بار درسال ۱۹۹٤ درموش گزارش شد(٦) پس از موش این تکنیک در رت نیز با موفقیت به کارگرفته شد (١٦). درسال ۲۰۰۲ نیز اولین مورد پیوند درحیوانات مزرعه‌ای و درگونه‌ی گاو با موفقیت ثبت شد(١٤).

هرچند که سلول‌های پیوند زده شده می‌توانند در بیضه گیرنده پیوند جایگزین شوند، اما میزان موفقیت به خالی بودن فضای بین سلول‌های سرتولی در فرد گیرنده دارد(٢٦و٢٥). یکی از مراحل اصلی در موفقیت پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، متوقف کردن و حذف روند اسپرماتوژنز خودی می‌باشد تا امکان جایگزینی سلول‌های بنیادی در بازال لامینا وجود داشته باشد. بوسولفان یکی از داروهای مورد استفاده درشیمی ـ درمانی است که دارای خاصیت آلکیله کنندگی بوده و عموماً جهت درمان لوسمی مزمن، کانسر تخمدان و همچنین قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی استفاده می‌شود(۳۲و۲). این دارو جزء گروه مواد دیاسترهای متان سولفونیک اسید و تحت عنوان ٤ و۱ بوتان دیمتیل سولفونات می‌باشد(۲۰).

بوسولفان دارای تأثیرسوء بر DNA به دلیل خاصیت آلکیله کنندگی سلول‌هایی است که دارای قدرت تقسیم بیشتری هستند، به همین دلیل بیشترین اثر خود را روی اسپرماتوگونی‌ها می‌گذارند(٦).

استفاده از بوسولفان به خصوص درسال‌های اخیر به طور عمده جهت القاء آزواسپرمی از طریق تخلیه لوله‌های اسپرم ساز قبل از پیوند سلول‌های زایا به داخل بیضه درگونه‌های مختلف حیوانی صورت گرفته است(۳۳). براساس مطالعات انجام شده در جنین و یا نـوزاد موشهای صحرایی متولد شده از مادران

* ۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران (ptajik@ut.ac.ir)

حامله که دردوران بارداری درمعرض این دارو بوده اند، این دارو باعث اختلال کارکردی گناد و کاهش سلول‌های سوماتیک و زاینده بیضه می‌شود(۵). استفاده از بوسولفان به صورت تک دوز با مقادیر بالا یعنی ٤٠-٥٥ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن درموش بالغ باعث القاء آزواسپرمی می‌شود(۱۲و٦). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که در انسان درمان ترکیبی بوسولفان همراه با سیکلو فسفاماید باعث کاهش فعالیت گنادها می‌شود (۱۳). تاکنون آزمایشات تجربی متنوعی در زمینه اثرات بوسولفان برروی اسپرماتوژنز خصوصاً درموش انجام شده است. این مطالعات هم در دوره جنینی و پره ناتال (۵) و هم در دوره بزرگسالی(۳۳) انجام گرفته است. در نهایت ابداع روشی جهت ایجاد آزواسپرمی گامی ضروری در پیوند سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال به منظور حفظ گونه‌هایی از گربه‌سانان که در معرض خطر انقراض قرار گرفته‌اند به حساب می‌آید.

## مواد و روش کار

در این مطالعه از گربه‌های نر، مو کوتاه خانگی ۳ تا ۵ ماهه استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد حیوان خانه با دسترسی کافی به آب و غذا و دمای ۲۱±۳ C° و ۱۲ساعت روشنایی نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به ۳ گروه شامل دو گروه آزمایش و یک گروه کنترل تقسیم گردیدند. تعداد حیوانات در همه گروه‌ها ۵ سر بود. پس از اولین تزریق در هفته‌ی ۵، ۹، ۱۳ و ۱۷ (قبل از بلوغ) دوزهای صفر ،٤ و ۱۰میلی گرم بوسولفان (Sigma, USA) به صورت داخل وریدی به ترتیب به گربه‌های گروه‌های شاهد و تیمار تزریق شد. جهت حل کردن دارو مطابق مطالعه (Udagawa و Jiang از DMSO (Sigma, USA استفاده شد (۱۵ و ۳۲).

برای این منظور ابتدا ۱۰ میلی‌گرم پودر بوسولفان در ۱ میلی‌لیتر از DMSO حل نموده و بلافاصله پس از آن ۱ میلی‌لیتر آب مقطر نیز به آن اضافه شد، تا محلولی با غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به دست آید. سپس براساس وزن حیوان مورد نظر تزریقات انجام گرفت. با توجه به این که بوسولفان خیلی سریع رسوب می‌نماید، بنابراین این محلول به صورت کاملاً تازه تهیه شده و عمل تزریق دارو نیز تحت بیهوشی کامل انجام شد. بیضه گربه‌ها ۲ ماه پس از پایان تزریقات بوسیله جراحی خارج شد و مورد ارزیابی قرار گرفت.

**ارزیابی لوله‌های اسپرم ساز**

جهت ارزیابی لوله‌های اسپرم ساز، پس از گذشت سه روز از ثابت نمودن و اطمینان از ثبوت بافتی بیضه‌ها، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری پاساژ بافتی شدند. به منظور مطالعه با پاساژ از اتانول با درجات صعودی، گزیلن و پارافین مذاب استفاده شد. برای به حداکثر رساندن تعداد برش های مناسب لوله‌های اسپرم ساز در مقطع عرضی، بیضه‌ها در جهت محور طولی در پارافین قالب گیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, Germany)مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. از هر بیضه ٤ تا ۵ اسلاید تهیه و به طریقه هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olampus, Japan) و با بزرگ‌نمایی ٤۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند.

**ارزیابی کمی پارامترهای لوله اسپرم ساز**

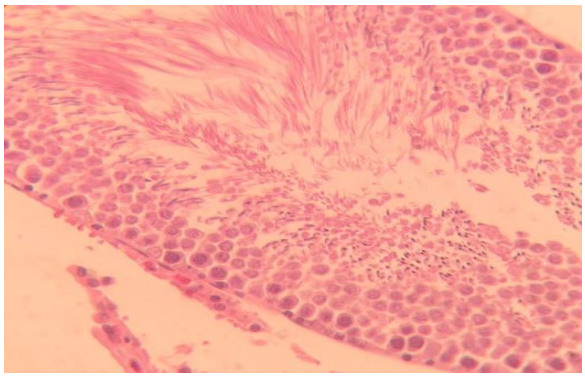
جهت ارزیابی کمی پارامترهای لوله اسپرم ساز، از گریدهای مدرج خطی بر لنز چشمی میکروسکوپ استفاده شد. در هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ لوله اسپرم ساز در مقطع عرضی گرد و یا تقریبا گرد انتخاب و مطالعه شد. لوله‌هایی که بیضوی بودند یا برش مایل داشتند مطالعه نشدند. با بزرگ نمایی ٤۰۰ اقطار لوله‌های اسپرم ساز یعنی از غشاء پایه یک طرف لوله تا غشاء پایه طرف دیگر براساس میکرومتر محاسبه گردید. ابتدا دو قطر عمود بر هم محاسبه و سپس میانگین اقطار در هر لوله محاسبه شد. همچنین به طریق مشابه، میانگین قطر مجرای داخل لوله اسپرم ساز و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال براساس میکرومتر محاسبه شد(۱۰).

**تحلیل آماری**

نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه و کلیه پارامترهای کمی محاسبه شده با استفاده از برنامه آماریSPSS و آزمون واریانس ANOVAیک طرفه تحلیل شدند. یافته ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر P≤۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گشت. همچنین جهت ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از تست توکی استفاده شد.

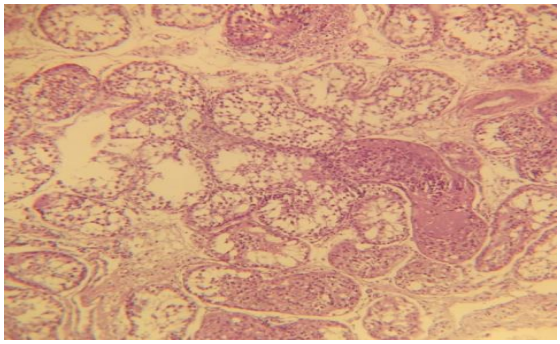
## نتایج

در بررسی بافت شناسی گروه کنترل، اسپرماتوژنز فعال در لوله‌های اسپرم ساز در مراحل مختلف همراه با اسپرم های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در داخل لوله‌ها رده های مختلف سلول‌های اسپرماتوگونی که در مراحل مختلف تقسیم به همراه سلول‌های سرتولی دیده شدند. در این لوله‌ها اپیتلیوم زاینده از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود و انواع سلول‌های زایا شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتیدهای جوان گرد و اسپرماتیدهای بالغ دراز یا اسپرماتوزوئید و همچنین سلول‌های سرتولی مشاهده شدند (نگاره ۱)



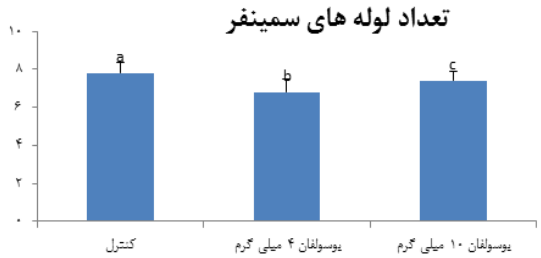
نگاره ۱- بیضه گروه شاهد که اسپرماتوژنز کامل مشاهده می شود(هماتوکسیلین ائوزین×٤۰۰).

در حالی که در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ٤ و۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن بوسولفان، درجات متفاوتی از تخریب لوله‌های اسپرم ساز، دژنره شدن سلول‌های زاینده و ناپدید شدن اسپرم‌های بالغ و اکثر سلول‌های اسپرماتوگونی و تعدادی کم اسپرماتوسیت اولیه دیده شد(نگاره۲).

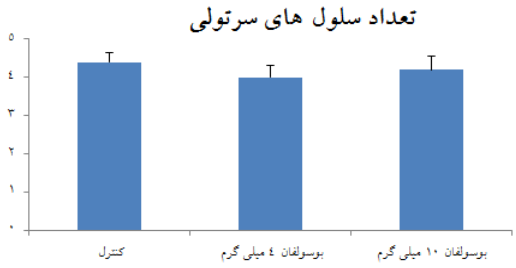


نگاره ۲- بیضه گروه تحت درمان با ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن، بوسولفان که کاهش ضخامت اپیتلیوم اسپرم ساز همراه با هیالینیزاسیون لوله‌ها مشاهده می‌شود(هماتوکسیلین ائوزین×۱۰۰).

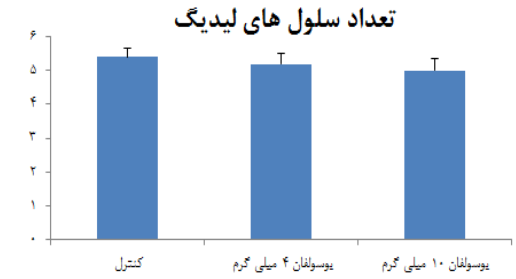
در بررسی آسیب شناسی بافتی به عمل آمده، تعداد لوله‌های اسپرم ساز درگروه‌های تحت درمان با بوسولفان ٤ و ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می داد. در ارتباط با تعداد سلول‌های سرتولی مابین گروه‌های کنترل و تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار۲). از نظر تعداد سلول‌های لیدیگ نیز تفاوت معنی داری مابین گروه‌های کنترل و تیمار شاهده نشد (نمودار۳). اما در ارتباط با میانگین قطر لوله‌ها اسپرم ساز در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ٤ و۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن، به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می‌دهد، که این کاهش قطر لوله با افزایش دوز افزایش می‌یافت (P≤ ۰/۰۵).



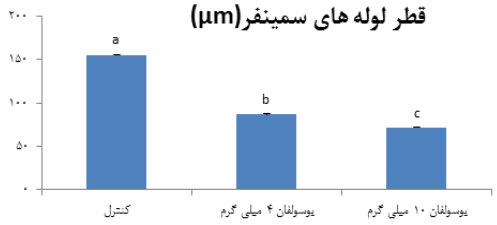

نمودار۱- تعداد لوله‌های اسپرم ساز در گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت و این میزان در گروه کنترل ۰/۵۸ ± ۷/۸ درگروه تحت درمان با بوسولفان٤ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن، به میزان ٦/٦٦±۰/٦٨ و در گروه تحت درمان با بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به میزان ۰/۵۱±۷/٤بود(P≤ ۰/۰۵ ).




نمودار ۲- تعداد سلول‌های سرتولی در گروه کنترل ۰/۲٤۳±٤/٤ و در گروه تیمار بوسولفان با دوز ٤ میلی گرم / کیلو گرم وزن بدن ۰/۳۱٦± ٤ و در گروه تیمار با بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم / کیلو گرم وزن بدن، تعداد سلول‌های لیدیگ۰/۳٤۷±٤/۲ می‌باشد. از نظر آماری هیچ تفاوت معنی‌داری مابین گروه‌های تحت درمان و گروه شاهد مشاهده نشد.




نمودار ۳- تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه کنترل۰/۲٤٥±٥/٤ و در گروه تیمار بوسولفان با دوز ٤ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن۰/۳۷± ٥/۲ و در گروه تیمار با بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تعداد سلول‌های لیدیگ ٥ ±۳۱٦/۰ می‌باشد. از نظر آماری هیچ تفاوت معنی‌داری مابین گروه‌های تحت درمان و گروه شاهد مشاهده نشد.




نمودار ٤- قطر لوله‌های سیمنفر، براساس یافته‌های مورفومتریک میانگین قطر لوله‌ها در گروه تحت درمان با دوز ٤ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن ۳/۰۷٦ ±۸٦ و در دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به میزان ۱/۰٦۸ ±۷۱/۸ میکرومتر می‌باشد که این میزان نسبت به گروه کنترل که ۳/۳٥۳ ±۱٥٥/۸ میکرومتر به طور معنی‌داری کاهش در قطر لوله‌ها را نشان می‌دهد، که این کاهش با افزایش دوز افزایش می‌یافت (P≤ ۰/۰٥)

## بحث

بوسولفان داروئی است که در کلینیک جهت درمان لوسمی و قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران استفاده می‌شود (۳۲و۲). ضمن اینکه در آزمایشات تجربی جهت پیوند سلول‌های ژرمینال نیز استفاده می‌شود (۱۲). در مطالعه حاضر جهت بررسی مطالعه کمی و حجم پارامترهای بیضه از نمونه‌برداری تصادفی ساده و یکنواخت و روش کاوالیری استفاده نمودیم که روش ساده و در عین حال کارآمد و قوی برای محاسبه حجم می‌باشد (۳۳و۲۹). امروزه مطالعات استریولوژیکی دارای اهمیت و کاربرد زیادی در مطالعه کمی پارامترهای مختلف بیضه هستند چرا که این مطالعات در عین این که ساده و دقیق هستند دارای فوایدی نیز هستند، از جمله اینکه: ۱) از آنجائیکه نمونه‌برداری در این مطالعات به صورت تصادفی و یکنواخت است بنابراین همه اجزا ی موجود در بیضه دارای شانس یکسانی برای نمونه‌برداری هستند. ۲) در این روش نمونه‌برداری به صورت بدون سوگیری است چرا که هیچ گونه پیش فرض قبلی در مورد شکل اندازه و یا جهت قرارگیری سلول‌های موجود در بافت وجود ندارد (۳٤و۲۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که گروه‌های تحت درمان با ٤ و ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن بوسولفان دچار اختلال کاهش ضخامت اپیتلیوم وقطر لوله‌های اسپرم ساز می‌شوند که این یافته ها با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد(۱۱و۱۲) که این اثر ناشی از خاصیت آلکیله کنندگی DNA توسط این دارو بوده و مکانیسم اثر آن روی سلول‌هائی است که قدرت تکثیری زیادی دارند لذا بدیهی است که می‌تواند با تخریب شدید سلول‌های اسپرماتوگونی همراه باشد، با تخریب سلول‌های اسپرماتوگونی تعداد کل سلول‌های ژرمینال و در نتیجه ضخامت اپیتلیوم لوله‌ها کاهش می یابد. تجربه حاضر نشان داد که با افزایش دوز دارو میزان تخریب بافت و اختلالات اسپرماتوژنز شدیدتر می‌گردد. در مطالعه حاضر علیرغم این که تعداد کل سلول‌های ژرمینال کاهش یافت اما تعداد سلول‌های سرتولی تغییری نداشت که

این موضوع معرف مقاومت این سلول‌ها است که این یافته با مطالعات Vecino و Aich مطابقت دارد(۱). در این مطالعه مورفولوژی سلول‌های سرتولی با افزایش دوز بوسولفان بی نظمی بیشتری را نشان داد، که احتمالاً ناشی از تغییرات مولکولی این سلول‌ها در پاسخ به بوسولفان باشد(۳۲) در تائید یافته فوق Bar-Shira Maymon و همکارانش در سال ۲۰۰٤ (٤) نشان دادند که میزان مارکر CK-18 در سلول‌های سرتولی به دنبال شیمی درمانی افزایش می یابد و این در حالی است که در اسپرماتوژنز طبیعی پس از بلوغ این مارکر در سلول‌های سرتولی حضور ندارد. بنابراین چنین استنباط می‌گردد که غیرفعال شدن سلول‌های سرتولی به دنبال شیمی درمانی ممکن است در اختلال اسپرماتوژنز و ناباروری نقش داشته باشد(۳۲). سلول‌های سرتولی که ۳٪ سلول‌های لوله اسپرم ساز بالغ را تشکیل می‌دهند تنها سلول‌های سوماتیک موجود در لوله‌ها هستند و در ارتباط نزدیک با سلول‌های ژرمینال یک محیط مناسب (Niche) برای اسپرماتوژنز را فراهم می سازند. این سلول‌ها نقش بسیار مهمی در تکامل نسل سلول‌های ژرمینال و پشتیبانی از این سلول‌ها و حفظ خاصیت عدم تمایز و پر استعداد بودن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را دارا هستند. بنابراین هرگونه تغییر در این سلول‌ها می‌تواند منجر به اختلال و نقص اسپرماتوژنز گردد(۲۷). به دنبال درمان با بوسولفان مهمترین عامل در تخریب سلو ل های اسپرماتوگونی و ژرمینال عدم توازن بین تکثیر سلولی و آپوپتوژنز است. به عبارت دیگر احتمالا بوسولفان باعث القاء آپوپتوژ نز در روند اسپرماتوژنز می‌شود که یافته‌های Choi و همکارانش در سال ۲۰۰٤ مؤید این مطلب است(۹). همچنین براساس یافته‌های مطالعات دیگر در درمان با داروی سیس پلاتین و سیکلو فسفاماید از گروه داروهای ضد سرطان باعث القاء آپوپتوزیز در لوله اسپرم ساز می‌شود (۲٤ و۸). در مطالعهٔ حاضر تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه‌های تحت درمان با ٤ و ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن تغییری نداشت که با مطالعه Aich مشابهت دارد(۱) Janes در سال ۱۹۸۵ و Boujrad در سال ۱۹۹۵ عنوان نمودند که تجویز بوسولفان در دوره جنینی و نوزادی باعث کاهش سلول‌های سرتولی و لیدیگ می‌شود (۵) که این یافته‌ها احتمالا ناشی از حساسیت متفاوت داروهای فوق در این مرحله است.

با توجه به موارد فوق احتمالا سن حیوان، غلظت و دوز دارو در میزان و شدت تخریب بافت و سلول مؤثر می‌باشد. براساس مطالعات انجام شده در رت، اولین رده سلول‌های لیدیگ در بیضه در طی روز ۱۵ جنینی از سلول‌های مزانشیمی موجود در بیضه منشاء می‌گیرد(۳). بدیهی است که بوسولفان بتواند بر روی تکثیر و در نتیجه تمایز سلول‌های مزانشیمی به عنوان پیش ساز سلول لیدیگ اثر سوء گذاشته و باعث کاهش سلول‌های لیدیگ گردد. همچنین سلول‌های سرتولی که در دوره جنینی موش‌ها از روز ۱٦ جنینی تکثیر یافته و به حداکثر تعداد خود در ۲ روز قبل از تولد می رسد، ضمن اینکه تا ۲ هفته پس ازتولد نیز این سلول‌ها افزایش می‌یابند و سپس در طول دوره زندگی تعداد آنها ثابت می‌ماند (۲۱). با توجه به اینکه بوسولفان دارای خاصیت آلکیله کنندگی بوده و برروی سلول‌های با قدرت میتوزی بالا اثر می‌گذارد بدیهی است که تجویز بوسولفان در دوره جنینی و نوزادی بتواند هم با کاهش سلول‌های لیدیگ و هم سرتولی همراه باشد. در این مطالعه تعداد لوله‌های اسپرم ساز، اپی تلیوم ژرمینال، و میانگین قطر لوله اسپرم ساز در گروه‌های آزمایش تحت درمان با دوزهای ٤ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به صورت معنی داری کاهش یافتند. به عبارت دیگر نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که همزمان با کاهش سلول‌های ژرمینال و اپیتلیوم ژرمینال حجم بیضه، توبول‌ها نیز کاهش می‌یابد، ضمن این که تعداد سلول‌های سرتولی در این بررسی تغییری نکرد. به عبارت دیگر شاید بتوان گفت که حجم بیضه و لوله‌های اسپرم ساز در گربه، وابسته به تعداد سلول‌های زاینده می‌باشد. ضمن این که Yang و همکارانش در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که در رات ارتباط مستقیمی بین حجم بیضه و تعداد سلول‌های ژرمینال وجود

دارد(۳٤). تغییر در حجم و بافت بینابینی بیضه و اختلالات اسپرماتوژنز ناشی از آن در برخی تحقیقات دیگر نیز به دنبال هورمون درمانی و کریپتوارکیدیسم گزارش شده است (۱۹ و ۲۸). همچنین Tan و Ballester نشان دادند که افزایش حجم بافت بینابینی بیضه می‌تواند یک واکنش جبرانی به دنبال کاهش حجم بیضه باشد (۳ و ۳۰). بررسی کمی تعداد سلول‌های اقطار توبول‌ها و حجم بیضه و سایر پارامترهای آن می‌تواند کمک موثری در درک بهتر فرایند اسپرماتوژنز باشد، ضمن این که با این روش‌ها می‌توان ارتباط بین یافته‌های کمی، علائم فیزیولوژیک و بالینی را در مورد کارکرد بیضه بدست آورد(۲۳). از طرف دیگر بررسی حجم بیضه و یا توبول‌های آن نه تنها برای تعیین حجم پارامتر مورد نظر و تفسیر کارکرد پاتولوژی بیضه اهمیت دارد بلکه حجم خود به عنوان یک کمیت حد واسط برای تخمین مساحت مقطع، طول توبول‌ها و یا سایر اجزاء موجود در بافت نیز کاربرد دارد، که در درک شروع و پیشرفت اختلالات اسپرماتوژنز و باروری حائز اهمیت است. به عبارت دیگر تعیین حجم بیضه و توبول‌های آن شاخص مهمی در تشخیص بلوغ اسپرماتوژنز و پاتولوژی آن است(۲۲).

به طور خلاصه نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز بوسولفان در دوزهای ٤ و ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن با کاهش تعداد لوله‌های اسپرم ساز، اپی تلیوم زاینده و میانگین قطر لوله اسپرم ساز همراه است و دردوز ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن این اثرات شدیدتر است.

همچنین نتایج نشان داد که دوز تجویز بوسولفان چه در دوزهای پائین و چه دوز بالاتر تاثیری بر شمارش سول‌های سرتولی گربه نداشت.

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

## تشکر و سپاسگزاری

قسمتی از این پژوهش با استفاده از اعتبار قطب کاربرد سلول‌های بنیادی در سلول درمانی ومهندسی بافت دانشگاه تهران انجام شده است. نویسندگان برخود لازم می‌دانند تشکر خویش را بدین وسیله اعلام نمایند.

## فهرست منابع

1- Aich, S., Manna, C.K. (2001): Histophysiological changes of the testicular tissue due to busulphan administration in the wild Indian house rat. Acta. Biol. Hung. 52 (1):105-16.
2- Anderson, P.h.O., Knoben, J.E., Troutman, W.G. (2002) Handbook of clinical data 10th Edition. Mc Graw Hill. P: 136-140.
3- Ballester, J., Dominguez, J., Munoz, M.C., Sensat, M., Rigau, T. (2005): Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin- diabetic rats. J. Androl. 26(6):706-15
4- Bar-Shira Maymon, B., Yogev, L., Marks, A., Hauser, R., Botchan, A., Yavets, H. (2004): Sertoli cell inactivation damage to the human testis after cancer chemotherapy. Fertil. Stril. 81(5):1391-1394.
5- Boujrad, N., Hochereau-de Riviers, M.T., Kamtchouing, P., Perreau, C., Carreau, S. (1995): Evolution of somatic and germ cell populations after busulfan treatment in utero or neonatal cryptorchidism in the rat. Andrologia. 27(4):223-8.
6- Brinster, R.L., Avarbock, M.R. (1994): Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(1): 1303-7.
7- Brinster, RL., Zimmerman, JW.(1994): Spermatogenesis following male germ cell transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91(1):1298–11302.

8- Cai, L., Hales, B.F., Robaire, B. (1997): Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. Biol. Reprod. 56(6):1490-7.
9- Choi, Y.J., Ok, D.W., Kwon, D.N., Chung, J.I., Kim, H.C. (2004): Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correleates with loss of c-kitexpression in a Fas/FasL-and P53-independent manner. FEBS. Lett. 575(1-3):41-51.
10- Guneli, E., Tugyan, K., Ozturk, H., Gumustekin, M.,Cilaker S., Uysal, N. (2008): Effect of melatonin on testiculardamage in streptozotocin-induced diabetes rats.Eur. Surg. Res. 40(4):354-60.
11- Haddad, S., Carvalho, T.L., Anselmo-Franci, J.A., Petenusci, S.O., Favaretto, A.L. (1997): Ultrasound stimulation of rat testes damaged by busulfan. Ultrasound Med. Biol. 23(9):1421-25.
12- Honaramooz, A., Behboodi, E., Hausler, C., Blash, S., Ayres, S., Azuma, C. (2005): Depletion of Endogenous Germ Cells in Male Pigs and Goats in Preparation for Germ Cell Transplantation. J. Androl. 26(6):698–705.
13- Howell, S.J., Shalet, S.M. (2005): Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. J. Natl. Cancer. Inst. Monogr. (34):12-17.
14- Izadyar, F., Den Ouden, K., Stout, TA., Stout, J., Coret, J., Lankveld, DP., Spoormakers, TJ., Colenbrander, B. (2003): Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduc. 126(6):765-74.
15- Jiang, F.X. (1998): Behavior of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat. Anat. Embryol. 198(1): 53-61.
16- Jiang, FX., Short, RV. (1995): Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. Int. J. Androl. 18(6): 326-30.
17- Kubota, H., Brinster, RL. (2008.): Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. Methods. Cell. Biol.86: 59-84.
18- Kubuta, H., Avarbock, MR., Brinster, RL. (2004): Growth factors essential for self renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(47):16489- 94.
19- Meistrich, M.L., Wilson, G., Huhtaniemi, I. (1999): Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis. Cancer Res. 59(15): 3557-60.
20- Molenaar, R., de Rooij, D.G., Rommerts, F.F., Reuvers, P.J., Van der Molen, H.J. (1985): Specific destruction of Leydigcells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. Biol. Reprod. 33(5):1213-22
21- O' Donell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. (2001): Estrogen and spermatogenesis. Endocr. Rev., 22(3):289-318
22- Osinubi, A.A., Noronha, C.C., Okanlawon, A.O. (2005) Morphometric and stereological assessment of the effects of long-term administration of quinine on the morphology of rat testis. West. Afr. J. Med. 24(3):200-5.
23- Petersen, P.M., Giwercman, A., Gundersen, H.J., Pakkenberg, B. (2000): Efficient and unbiased tools for quantitating laydig and sertoli cells in testes from testes biobsies. Img. Anal. Stereol. 19:113-117.
24- Sawhney, P., Gimmona, C.J., Meistrich, M.L., Richburg, J.H. (2005): Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J Mice. J. Androl. 26(1): 136-45.
25- Shinohara, T., Orwig, KE., Avarbock, MR., Brinster, RL. (2002): Gem line stem cell competition in postnatal mouse testes. Biol. Reprod. 66:1491–1497.
26- Shinohara, T., Orwig, KE., Avarbock, MR., Brinster, RL. (2001): Remodeling of the postnatal mouse testis is accomplished by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 6186–6191.
27- Shinohara, T., Orwig, K.E., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (2003): Restoration of spermatogenesis in infertile mice by sertoli cell transplantation. Biol. Reprod. 68(3):1064-71.

28- Siril Ariyaratne, H.B., Ian Mason, J., Mendis- Handagama, S.M. (2000): Effects of thyroid and luteinizing hormones on the onset of precursor cell differentiation into leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis. Biol. Reprod. 63(3):898-904.
29- Tae, H.J., Jang, B.G., Ahn, D.C., Choi, E.Y., Kang, H.S. (2005): Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (Phasianus colchicus karpowi) during the breeding and non-breeding seasons. Vet. Res. Commun. 29(7):629-43.
30- Tan, K.A., Walker, M., Morris, K., Greig, I., Mason, J.I., Sharpe, R.M. (2006): Infant feeding with soy formula milk: effects of puberty progression, reproductive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood. Hum. Reprod. 21(4): 896-904.
31- Trevor, A.J., Katzung, B.G., Masters, S.B. (2002): A long medical book Katzung & Trevors Pharmacology examination and board review 6th Edition. Mc Graw Hill. P: 206-8.
32- Udagawa, K., Ogawa, T., Watanabe, T., Yumura, Y., Takeda, M., Hosaka, M. (2001): GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. Int. J. Urol. 8(11):615-22.
33- Veccino, P., Uranga, J., Arechaga, J. (2001): Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. Protoplasma. 217(4):191-8.
34- Yang, Z.W., Guo, Y., Lin, L., Wang, X.H., Tong, J.S., Zhang, G.Y. (2004): Quantitative (stereological) study of incomplete spermatogenic suppression induced by testosterone undecanoate injection in rats. Asian J. Androl. 6(4):291-7.