

## اثر محافظتی ملاتونین بر تغییرات هیستولوژیک بیضه موش بالغ تحت درمان با بوسولفان

فهیمه محمد قاسمی<sup>۱\*</sup>، معصومه فغانی<sup>۱</sup>، سینا خواجه جهرمی<sup>۲</sup>

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی گیلان، رشت، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی گیلان، رشت، ایران

### چکیده

زمینه و هدف: اثرات سیتو توکسیک شیمی درمانی و اثرات آن در قدرت باروری، از نظر بالینی حائز اهمیت است. ملاتونین، هورمون غده اپیفیز به عنوان آنتی اکسیدان شناخته شده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات محافظتی ملاتونین روی اختلالات اسپرماتوژن ناشی از درمان با بوسولفان با کمک ارزیابی های بافت شناسی بافت بیضه می باشد.

روش بررسی: مطالعه حاضر روی ۳۲ موش نر بالغ ۸ هفته انجام شد. حیوانات در چهار گروه شامل گروه کنترل دریافت کننده DMSO گروه ۲، دریافت کننده تک دوز ۲۰ mg/kg بوسولفان به صورت داخل صفاقی و گروه ۳ با ۱۰ mg/kg ملاتونین برای ۵ روز به صورت داخل صفاقی درمان شدند. گروه ۴ به دنبال تجویز ۲۰ mg/kg بوسولفان، به مدت ۵ روز ملاتونین دریافت می کرد. ۳۵ روز پس از شروع درمان، بیضه همه حیوانات از بدن خارج شد و ارزیابیها از طریق مشخص نمودن نمره بندی جانسون، مطالعات مورفو متري لوله های سمی نیفروس، تخمین حجم سلول های لیدیگ و شمارش سلول های زایا انجام شد. آنالیز های آماری با کمک روش ANOVA انجام گرفت و سطح آماری  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج: موش های تحت درمان با بوسولفان در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی دار در ارزیابیها براساس معیار نمره بندی جانسون و کیفیت اسپرماتوژن نشان دادند ( $p < 0.001$ ). پارامترهای کمی لوله های سمی نیفروس ( $p < 0.05$ ) و حجم هسته سلول های لیدیگ به طور معنی دار در گروه دوم در مقایسه با کنترل کاهش داشت. در حالیکه ملاتونین در گروه ۴، باعث طبیعی شدن قابل توجه پارامترهای لوله های سمی نیفروس ( $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$ ) و نتایج ارزیابی براساس معیار جانسون ( $p < 0.01$ ) در مقایسه با گروه ۲ شد. ملاتونین تعداد همه سلول های زایا را در گروه ۴ در مقایسه با گروه ۲ به صورت معنی دار ( $p < 0.05$ ) افزایش داد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ملاتونین دارای اثر محافظتی روی آسیب های بیضه القاء شده با بوسولفان است، هرچند که مکانیسم نامشخص است. احتمالاً این عمل از طریق کاهش آسیب های اکسیداتیو صورت می گیرد.

\* مسئول مکاتبه: فهیمه محمد قاسمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، مجتمع دانشگاهی گیلان، کیلومتر ۱۰ جاده ۳۶۷۷ تهران، رشت، صندوق پستی ۱۲۸۸/۸/۱۹ رایانه:

Parsahistolab@gmail.com

دریافت: ۱۲۸۸/۴/۶

پذیرش: ۱۲۸۸/۸/۱۹

کلید واژگان: اسپرماتوژن، بوسولفان، بیضه، سلول لیدیگ، شیمی درمانی، ملاتونین، ناباروری مردان. نحوه استناد به این مقاله: محمد قاسمی فهیمه، فغانی معصومه، خواجه جهرمی سینا. اثر محافظتی ملاتونین بر تغییرات هیستولوژیک بیضه موش بالغ تحت درمان با بوسولفان. فصلنامه باروری و ناباروری: سال ۱۱ (۱۳۸۹)، شماره ۲، صفحات: ۷۶-۶۷.

### زمینه و هدف

خاصیت آلکله کنندگی بیشترین اثرات سوء را روی بیضه ایجاد می کنند (۱). امروزه به خصوص در کشورهای

شیمی درمانی و اشعه درمانی با تغییرات زیادی در دستگاه تناسلی مردان همراه است و در بین این عوامل، داروهای با

به میتوکندری‌های اسپرم به دنبال راکتیوهای اکسیژن را کاهش می‌دهد (۱۴). تجویز یک دوز بالا،  $100\text{ mg/kg}$  ملاتونین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در معرض اشعه  $\alpha$  مانع ایجاد آسیب‌های حاد در بیضه آنها می‌شود (۱۴). علاوه بر این مطالعات تجویز ملاتونین در موش‌های دیابتیک تحت درمان با استروپیوزوتوسین<sup>۱</sup> (۱۵) و نیز موش‌های تحت درمان با سیس پلاتین<sup>۲</sup> باعث کاهش عوارض جانبی داروهای نامبرده روی بیضه می‌شود. Reiter معتقد است که ملاتونین می‌تواند سمیت و عوارض جانبی داروها را کاهش دهد (۱۶). در ارتباط با استفاده توام ملاتونین و بوسولفان و اثر آن روی تغییرات بیضه گزارشی در دسترس نیست. لذا هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات محافظتی احتمالی ملاتونین، روی تغییرات هیستولوژیک اسپرماتوژن در موش‌های بالغ تحت شیمی‌درمانی با داروی بوسولفان می‌باشد.

### روش بررسی

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

۱- گروه کنترل: به میزان  $1\text{ ml}/5\text{ mg}$  دی‌متیل‌سولفواکساید udagawa<sup>۳</sup> (Sigma, USA) درصد (حلال بوسولفان) مطابق (۳) به صورت تک دوز داخل صفاقی دریافت نمودند.

۲- گروه تحت درمان با بوسولفان: به میزان  $20\text{ mg/kg}$  بوسولفان (Sigma, USA)، به صورت داخل صفاقی و تک دوز دریافت نمودند.

۳- گروه تحت درمان با ملاتونین: که به مدت ۵ روز روزانه  $10\text{ mg/kg}$  ملاتونین (Sigma, USA) به صورت داخل صفاقی Atesşahin دریافت نمودند. جهت حلایت ملاتونین مطابق (۱۵) از اتانول ۱٪ استفاده می‌شد.

پیشرفت، درمان موفق بدخیمهای و امید به زندگی در این افراد به میزان بالایی افزایش یافته است و عمدۀ این افراد، به ویژه افراد جوان، پس از بهبودی تمايل به داشتن قدرت باروری و فرزند هستند (۲). از جمله عوامل شیمی‌درمانی آکیله کننده می‌توان بوسولفان را نام برد که به منظور درمان لوسومی مزمن، سرطان تخدان و همچنین قبل از پیوند معز استخوان در بیماران سرطانی استفاده می‌شود (۳). بیشتر مطالعات در مورد اثرات توکسیک بوسولفان بر بیضه به طور عمدۀ روی مدل‌های جوندگان مانند موش و رت بوده و به خصوص در سال‌های اخیر به منظور القاء آزواسپرمی قبل از پیوند سلول‌های ژرمینال به بیضه در گونه‌های مختلف استفاده شده است (۴,۵). مصرف این دارو پس از یک یا دو تزریق داخل صفاقی، بخش عمدۀ از اسپرماتوگونیها را از بین می‌برد (۴,۵). ضمن اینکه بهبودی باروری در موش‌های تحت درمان با بوسولفان در طول زمان به طور خود بخود صورت نمی‌گیرد؛ زیرا، بافت بیضه و لوله‌های سمی نیفروس و سلول‌های زایا به شدت آسیب می‌بینند (۶,۷).

لاتونین که یکی از ترشحات غده اپی فیز است در تنظیم برخی پدیده‌های فیزیولوژی مؤثر می‌باشد. ملاتونین دارای عملکرد نورونی-هورمونی، تنظیم کننده تولید مثل، ایمنی و دما است. علاوه بر این موارد ملاتونین روی تکثیر و تزايد و تمایز سلولی اثر دارد (۸). همچنین اثرات ضد سرطانی و ضد پیری آن نیز گزارش شده است (۹). ملاتونین امکان برداشت و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد شامل رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و آنیون‌های پراکسی نیترات را دارا می‌باشد (۱۰). مصرف ملاتونین در موش‌های اکسیداتیو آزمایشگاهی، سلولها را در برابر آسیب‌های اکسیدان را به طرق متعددی کاهش می‌دهد (۱۱). ضمن این که نشان داده شده که ملاتونین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی روی اسپرم انسان است (۱۲). گیرنده‌های ملاتونین روی بافت‌های مختلف از جمله پروستات، سلول‌های پوشش اپیدیدیم و به میزان کمی روی اسپرم بیان می‌شوند (۱۲).

همچنین تجویز ملاتونین در انسان آسیب‌های وارد

1- Streptozotocin  
2- Cisplatin

- ۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود.
- ۳: هیچ اسپرماتوسیت اولیه دیده نمی‌شود. فقط اسپرماتوگونی دیده می‌شود.
- ۲: هیچ سلول زایا وجود ندارد. فقط سلول سرتولی دیده می‌شود.
- ۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می‌شود و لوله‌ها آتروفیک هستند.

#### ارزیابی کمی پارامترهای لوله سمی‌نیفروس

جهت ارزیابی کمی پارامترهای لوله سمی‌نیفروس، از گردیدهای مدرج خطی بر لنز چشمی میکروسکوپ استفاده شد. در هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ لوله سمی‌نیفروس در مقطع عرضی گرد و یا تقریباً گرد انتخاب و مطالعه شد. لوله‌هایی که بیضوی بودند یا برش مایل داشتند مطالعه نشدند. با بزرگنمایی  $\times 400$  اقطار لوله‌های سمی‌نیفروس یعنی از غشاء پایه یکطرف 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 سمی‌نیفروس و ضخامت اپیتیلیوم ژرمینال براساس میکرومتر محاسبه شد (۱۴).

#### محاسبه حجم سلولهای لیدیگ

با کمک گردید خطی و با بزرگنمایی  $\times 1000$ ، حجم هسته سلولهای لیدیگ محاسبه شد. بدین ترتیب که در هر حیوان  $R = \sqrt{D_2 \times D_1 / 2}$  سلول مطالعه گردید. ابتدا از فرمول  $R = \sqrt{D_2 \times D_1 / 2}$  شاعر به دست آمد. که در این فرمول  $R$  معادل شعاع و  $D_1$  و  $D_2$  به ترتیب اقطار کوچک و بزرگ سلول است. همچنین برای مطالعه حجم از فرمول  $V = \frac{4}{3} \pi R^3$  استفاده شد.  $\pi = 3.14$  عدد ثابت بود (۱۸).

#### شمارش سلولهای زایا

براساس ریخت‌شناسی هر سلول، سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد و اسپرمازووا در مقطع عرضی ۲۰ لوله سمی‌نیفروس در هر حیوان شمارش شد. فقط لوله‌های گرد مورد شمارش قرار گرفتند و لوله‌هایی که مایل و یا بیضوی بودند و یا حاوی

۴- گروه تحت درمان ترکیبی: ابتدا یک تک دوز  $20\text{ mg/kg}$  بوسولفان دریافت می‌کردند و پس از آن به مدت ۵ روز، روزانه  $10\text{ mg/kg}$  ملاتونین دریافت نمودند.

۳۵ روز پس از شروع درمان، همه حیوانات به طریقه جابجایی نخاع، کشته و بیضه آنها از حفره شکم خارج شد. به منظور ثبوت بافتی، بیضه‌ها به داخل محلول فیکساتیو فرمالدئید بافری ۱۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور می‌شدند.

#### ارزیابی لوله‌های سمی‌نیفروس

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 اتابول با درجات صعودی، گزین و پارافین مذاب استفاده شد. برای به حداقل 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 به ضخامت  $5\text{ }\mu\text{m}$  تهیه شد. از هر بیضه ۴ تا ۵ اسلاید تهیه و به طریق هماتوکسیلین و اوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و با درشت نمایی  $\times 400$  مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. به منظور مطالعه بلوغ و کیفیت لوله‌های سمی‌نیفروس از روش جانسون استفاده می‌شد (۱۷). جدول جانسون بلوغ و به عبارتی دیگر کیفیت لوله‌ها را نشان می‌دهد. این جدول دارای نمره‌بندی ۱-۱۰ است. براساس معیارهای زیر به هر مقطع عرضی لوله سمی‌نیفروس داده می‌شود:

۱۰: اسپرماتوژن زنگ کامل، تعداد زیادی سراسپرم که در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند.

۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد ولی لومن گرد و منظم دیده نمی‌شود.

۸: تعداد اسپرم خیلی کم است.

۷: اسپرم دیده نمی‌شود ولی تعداد زیادی اسپرماتید گرد دیده می‌شود.

۶: تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می‌شود.

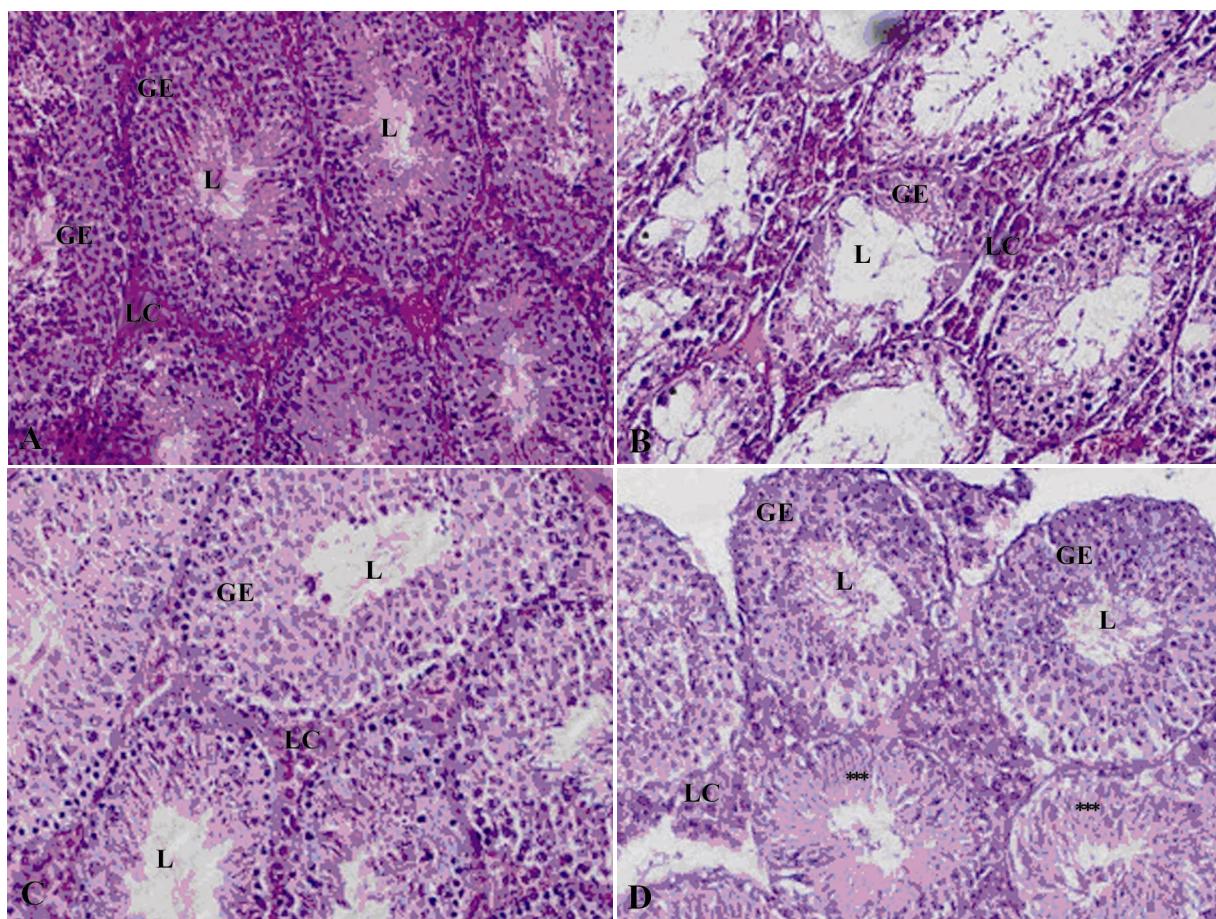
۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمی‌شود. تعداد زیادی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود.

## نتایج

در مطالعه بافت‌شناسی، در گروه کنترل اسپرماتوژنز فعال در لوله‌های سمی‌نیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌های اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در این لوله‌ها اپیتیلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود و انواع سلول‌های زایا شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتیدهای جوان گرد و اسپرماتیدهای بالغ دراز یا اسپرماتوزئید و همچنین سلول‌های سرتولی مشاهده شدند. در بافت بین‌بینی،

سلول‌های ریزش یافته به داخل لومن بودند مورد شمارش سلوکی قرار نگرفتند.

**آنالیز آماری:** نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه و بلوغ اسپرماتوژنز و همچنین کلیه پارامترهای کمی محاسبه شده با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل شدند. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر  $p \leq 0.05$  معنی‌دار تلقی گشت. همچنین جهت ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از تست توکی استفاده شد.



شکل ۱. A- فوتومیکروگراف نوری از لوله‌های سمی‌نیفروس موش کنترل. به اسپرماتوزئنз فعال در لوله‌ها توجه شود. B- لوله‌های سمی‌نیفروس در گروه تحت درمان با بوسولفان را نشان می‌دهد. به تخریب اسپرماتوزئنز و حضور واکوئل (\*) در ضخامت اپیتیلیوم ژرمینال و از بین رفتن سلول‌های زایا و کاهش اقطار لوله‌های سمی‌نیفروس توجه نمائید. C- اسپرماتوزئنز در موش تحت درمان با ملاتونین را نشان می‌دهد اسپرماتوزئنز مانند کنترل فعال است. D- لوله‌های سمی‌نیفروس در گروه تحت درمان با بوسولفان + ملاتونین را نشان می‌دهد. ملاتونین باعث حفظ اسپرماتوزئنز در موش تحت شیمی‌درمانی شده است. اغلب لوله‌ها اسپرماتوزئنز فعال را نشان می‌دهند. هرچند که در برخی لوله‌ها (\*\*\* ) هنوز اسپرماتوزئنز فعال نشده است لومن (L)، اپیتیلیوم ژرمینال (GE) سلول لیدیگ (LC)، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، اثوزین. بزرگنمایی ۱۶۰ برابر.

جدول ۱. اثر بوسولفان و ملاتونین بر نمره بندی جانسون و تعداد سلولهای زایای لوله سمی‌نیفروس موش بالغ ( $M \pm SD$ )

گروه	نمره بندی جانسون	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوستیت اولیه	تعداد اسپرماتوستیت گرد	نمره بندی جانسون
کنترل	۹/۵۱±۰/۴۲	۳/۸۳±۰/۸۰	۶۳/۹۰±۸/۲	۱۴۰/۵۵±۳۰/۲۶	۱۲۹/۸۴±۴۰/۷۷
بوسولفان	۲/۱۰±۰/۶۴ <sup>ab</sup>	۱/۳۶±۰/۰۵ <sup>ab</sup>	۱۷/۸۴±۲/۵۰ <sup>ab</sup>	۶۰/۸۹±۱۱/۷۴ <sup>ab</sup>	۲۸/۳۲±۹/۲۶ <sup>ab</sup>
ملاتونین	۹/۵۸±۱/۱ <sup>b</sup>	۲/۵۰±۰/۶۱ <sup>b</sup>	۶۰/۲۷±۶/۴۰ <sup>b</sup>	۱۳۵/۲۰±۲۱/۵۰ <sup>b</sup>	۱۳۱/۴۲±۳۶/۲۰ <sup>b</sup>
ملاتونین+بوسولفان	۷/۴±۱/۲۷ <sup>a</sup>	۳/۳۰±۰/۴ <sup>a</sup>	۴۸/۲۲±۶/۴۰ <sup>a</sup>	۱۲۰/۴۴±۲۰/۷۰ <sup>a</sup>	۱۰۰/۳۴±۳۴/۰ <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: در مقایسه با گروه کنترل  $P < 0.001$ . <sup>b</sup>: در مقایسه با گروه ملاتونین + بوسولفان  $P < 0.001$ .

مورد مطالعه در جدول ۱ بیان شده است. در گروه کنترل میانگین نمره بندی جانسون در آنها  $9/51 \pm 0/43$  بود. در حالیکه در گروه تحت درمان با بوسولفان نمره بندی جانسون  $2/10 \pm 0/64$  بود که به صورت معنی دار ( $P < 0.001$ ) کاهش داشت (جدول ۱). همانطور که در جدول مشخص است تعداد کلیه سلولهای زایا نیز در گروه تحت بوسولفان به صورت معنی دار ( $P < 0.001$ ) در مقایسه با کنترل کاهش دارند. در گروهی که فقط ملاتونین مصرف نموده بود، میانگین جانسون  $9/58 \pm 1/1$  بود که در مقایسه با کنترل تغییری نشان نداد. ضمن این که تعداد کلیه سلولهای زایا نیز در مقایسه با کنترل تفاوتی نشان نداد. در حالیکه مصرف بوسولفان توان با ملاتونین، میانگین جانسون را به  $1/27 \pm 0/7$  افزایش داد که در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان معنی دار ( $P < 0.001$ ) بود. علاوه بر آن، تعداد کلیه سلولهای زایا در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان افزایش یافت. به عبارتی دیگر مصرف ملاتونین باعث افزایش بلوغ و کمیت سلولهای لوله سمی‌نیفروس در گروه تحت شیمی درمانی شد.

میانگین تغییرات کمی اقطار لوله‌های سمی‌نیفروس و سلولهای لیدیگ در گروههای مورد مطالعه در جدول ۲ بیان شده است. مصرف بوسولفان نه تنها ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال را  $28/50 \pm 2/85 \mu m$  در مقایسه با کنترل  $65/00 \pm 4/25 \mu m$  کاهش داد بلکه باعث کاهش معنی دار ( $P < 0.05$ ) در قطر لوله‌های سمی‌نیفروس نیز شد (جدول ۲). در گروهی که فقط ملاتونین دریافت کرده بود هرچند که از نظر

بافت همبندی سست هماره با عروق خونی، اعصاب، سلولهای بافت همبندی و همچنین سلولهای اسیدوفیل لیدیگ به صورت تکی و یا تجمعات سلولی با هسته گرد قابل مشاهده بودند (شکل A).

در گروه تحت درمان با  $20 mg/kg$  بوسولفان، تخریب اسپرماتوژنز به وضوح قابل مشاهده است. در اغلب لوله‌ها تعداد زیادی از سلولهای زایا از بین رفتہ بودند و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال به طور معنی داری کاهش داشت. در ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال واکوئلها مشهود بودند. تعداد زیادی از لوله‌ها قادر اسپرماتید گرد و اسپرماتید دراز بودند. عمدۀ لوله‌ها دارای اسپرماتوگونی و تعدادی کم اسپرماتوستیت اولیه بودند. هرچند که بندرت هنوز برخی لوله‌ها دارای اسپرماتید نیز بودند. کلیه عناصر تشریحی موجود در بافت بینایی هماره با سلولهای لیدیگ در فاصله بین لوله‌های سمی‌نیفروس دیده شد (شکل A-B).

در گروهی که میزان  $10 mg/kg$  ملاتونین مصرف کرده بود تغییرات ریخت‌شناسی خاصی در مقایسه با کنترل دیده نشد (شکل C). در گروه تحت درمان ترکیبی، لوله‌ها دارای انواع متنوع سلولهای زایا بودند و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال به صورت قابل توجه بیشتر از گروه دوم و در ضخامت آن، واکوئل خیلی کمتر دیده می‌شد. در اغلب لوله‌ها اسپرماتوژنز فعل دیده می‌شد هرچند که هنوز برخی از آنها فعال نشده بودند (شکل D).

میانگین نمره بندی جانسون، درصد لوله‌های بالغ سمی‌نیفروس و همچنین تعداد سلولهای زایا در گروههای

جدول ۲. اثر بوسولفان و ملاتونین بر لوله سمی نیفروس و سلول لیدیک موش بالغ ( $M \pm SD$ )

گروه	قطر لوله ( $\mu m$ )	قطر لومن ( $\mu m$ )	ضخامت اپیتالیوم ( $\mu m$ )	قطر هسته سلول لیدیک ( $\mu m$ )	حجم هسته سلول لیدیک ( $\mu m^3$ )
کنترل	۱۵۶/۲۵±۷/۷۲	۷۹/۰۰±۵/۴	۶۵/۰۰±۴/۲	۶/۸۲±۰/۵۱	۱۱۱/۹۱±۲/۱
بوسولفان	۹۵/۳۷±۲/۴۶ <sup>ab</sup>	۶۷/۰۰±۶/۷۸ <sup>ab</sup>	۲۸/۰۰±۲/۸۵ <sup>ab</sup>	۵/۲±۰/۶۴ <sup>ab</sup>	۸۵/۳۷±۵/۹۵ <sup>ab</sup>
ملاتونین	۱۵۰/۱۲±۸/۶۵ <sup>b</sup>	۸۶/۸۷±۵/۵۱ <sup>ab</sup>	۶۱/۰۰±۶/۶۳ <sup>ab</sup>	۶/۷±۰/۵۵ <sup>a</sup>	۱۱۰/۰۲±۴/۳۷ <sup>b</sup>
ملاتونین+بوسولفان	۱۲۹/۱۲±۹/۲۳ <sup>a</sup>	۷۸/۳۷±۶/۱۳	۵۱/۱۳±۵/۵۱ <sup>a</sup>	۶/۷۱±۰/۳۹	۱۰۳/۰۰±۳/۸۱ <sup>a</sup>

a: در مقایسه با گروه کنترل  $P < 0.05$ . b: در مقایسه با گروه ملاتونین + بوسولفان  $P < 0.05$ .

تغییرات کمی، کیفی و بلوغ اسپرماتوژن زبررسی می‌نماید که مارکرهای مهمی برای کیفیت اسپرماتوژن زبررسی دارد و این پارامترها می‌توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند.

در این مطالعه تجویز تک دوز  $20\text{ mg/kg}$  بوسولفان، باعث کاهش بلوغ اسپرماتوژن زبررسی و عده پارامترهای کمی بیضه شد. مصرف بوسولفان باعث از بین رفتن کلیه سلول‌های زیایی بیضه شد که این اثر ناشی از خاصیت آکلیله کنندگی بوسولفان است که دارای اثرات مخرب روی سلول‌های در حال تکثیر می‌باشد (۱۹). هرچند که عده‌ایی دیگر نیز بر این عقیده‌اند که مصرف بوسولفان می‌تواند باعث توقف تقسیم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و یا مرگ آنها گردد (۲۰). این مطلب خود می‌تواند با کاهش بلوغ اسپرماتوژن زبررسی باشد. هرچند که تعداد زیادی از سلول‌های زیایی از بین رفته بودند؛ ولی در داخل لوله‌ها و بر روی غشاء پایه هنوز اسپرماتوگونیها می‌تواند دلیلی بر این باشد که این سلولها بتوانند پس از مدتی با تقسیم خود سلول‌های زیایی را در لوله سمی نیفروس ایجاد بنمایند. نشان داده شده که در موشها به دنبال تجویز بوسولفان، سلول‌های اسپرماتوگونی باقیمانده می‌توانند مجموعه‌ایی از سلولها را تشکیل دهند؛ هرچند که این سلولها نمی‌توانند تمایز شوند (۲۱).

در مطالعه حاضر در ضخامت اپیتالیوم ژرمینال واکوئلهای دیده می‌شود که این واکوئلهای می‌توانند در نتیجه از بین رفتن سلول‌های زیایی باشند. در واقع این واکوئلهای می‌توانند

ریخت‌شناسی تفاوت خاصی با کنترل دیده نشد؛ ولی ضخامت اپیتالیوم ژرمینال به صورت معنی‌دار  $61/00\pm 6/63\mu m$  در مقایسه با کنترل  $65/00\pm 4/2\mu m$  کاهش نشان داد؛ که شاید ناشی از اثرات ملاتونین بر روی محور هیپوتالاموسی هیپوفیزی - گنادی باشد.

مصرف تک دوز  $20\text{ mg/kg}$  بوسولفان کاهش معنی‌داری در عده پارامترهای لوله سمی نیفروس شامل: قطر لوله‌ها و ضخامت اپیتالیوم ژرمینال ایجاد نمود هرچند که به دلیل کاهش پارامترهای نامبرده، ضخامت مجرای داخلی لوله‌ها افزایش معنی‌دار نشان می‌داد. حجم هسته سلول‌های لیدیگ در گروه تحت درمان با بوسولفان  $85/37\pm 5/95\mu m^3$  بود که در مقایسه با کنترل  $111/91\pm 2/1\mu m^3$  کاهش معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). مصرف ملاتونین در گروه تحت درمان ترکیبی نه تنها باعث افزایش ضخامت اپیتالیوم ژرمینال و اقطار لوله‌ها شد؛ بلکه حجم هسته سلول‌های لیدیگ را  $103/00\pm 3/81\mu m^3$  به صورت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان  $85/37\pm 5/95\mu m^3$  افزایش داد.

به عبارتی دیگر تجویز ملاتونین به میزان  $10\text{ mg/kg}$  به مدت ۵ روز در گروه تحت شبیه درمانی با بوسولفان، منجر به کاهش عوارض ناشی از مصرف بوسولفان بر روی بیضه شد.

## بحث

مطالعه حاضر اثرات بوسولفان و ملاتونین را روی

آندرودزن تولیدی توسط سلول‌های لیدیگ کاهش یافته است؛ هرچند که محققان مطالعه حاضر مطالعه‌ای در این زمینه انجام ندادند. ضمن این که در مطالعه Chatterjee روی بیماران مبتلا به لنفوم و تحت شیمی‌درمانی سطح تستوسترون سرم به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (۳۰). در مطالعه حاضر اثر تجویز ملاتونین به تنها و به صورت توأم با بوسولفان روی اسپرماتوژن نیز مورد بررسی قرار گرفت. ملاتونین به عنوان مهم‌ترین ترشح غده اپی فیز آنتی‌اکسیدانتی بسیار مؤثر و خنثی کننده رادیکال‌های آزاد است (۸). ملاتونین به دلیل داشتن اندازه کوچک و خاصیت چربی دوستی زیاد به راحتی از غشاء سلول عبور می‌کند و در کل سلول پخش می‌شود. غلظت آن در هسته سلول بسیار بالا است و DNA را در برابر عوامل مخرب حفظ می‌نماید (۸). مطالعه حاضر نشان داد که مصرف  $10\text{ mg/kg}$  ملاتونین برای مدت ۵ روز، به صورت توأم با بوسولفان، اثرات سوء بوسولفان را روی اسپرماتوژن کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که بهبودی روند اسپرماتوژن در گروه آخر تحت درمان ترکیبی، ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانتی ملاتونین باشد. به طور مشابه با مطالعه حاضر، مصرف ملاتونین در رت‌های تحت درمان با سیس پلاتین (۱۵) و همچنین رت‌های دیابتیک تحت درمان با استرپتوزوتوسین آسیب وارد به بیضه را کاهش می‌دهد (۱۴). بنابراین به نظر می‌رسد که مطالعه حاضر نیز سمیت و عوارض جانبی بوسولفان را کاهش داده است (۱۶). دوز مصرفی ملاتونین در مطالعه حاضر مشابه مطالعه Guneli و Atessahin بود (۱۴, ۱۵).

در مطالعه حاضر از بوسولفان استفاده شد؛ چرا که این دارو می‌تواند سلول‌های زایا را در مراحل اولیه تقسیم (اسپرماتوگونی) به میزان شدیدتری در مقایسه با سایر داروهای گنادوتوكسیک دیگر تخریب نماید (۳). بنابراین، باید که بهبودی اسپرماتوژن به دنبال بوسولفان مشکل‌تر از دیگر داروهای گنادوتوكسیک و یا ضد سرطان باشد (۳). مصرف تک دوز بوسولفان در دوز  $40\text{ mg}$  تا  $50\text{ mg}$  به ازاء کیلوگرم در موشها، با آزواسپرمی همراه است (۴, ۵). هرچند که دوز القاء کننده آزواسپرمی با کمک بوسولفان وابسته

نشان‌دهنده از دست دادن اتصالات سلولی و یا کاهش مولکول‌های چسبنده مانند کاده‌رینها<sup>۱</sup> باشد و می‌تواند به عنوان یکی از علائم پره‌آپوپتوز مطرح باشد (۲۲). ضمن این که براساس مطالعات قبلی تجویز تک دوز  $40\text{ mg/kg}$  و همچنین  $20\text{ mg/kg}$  بوسولفان در موشها می‌تواند تغییرات آپوپتویک را در سلول‌های زایای بیضه القاء نماید (۲۳, ۲۴). علاوه بر این بوسولفان نه تنها تغییرات ریخت‌شناسی فراساختاری را در سلول‌های زایا بلکه در سلول‌های سوماتیک بیضه شامل سلول‌های لیدیگ، سرتولی و میوئید نیز القاء می‌کند که می‌تواند باعث تغییرات زیادی در بیضه و اسپرماتوژن شوند. ضمن این که اسپرماتوژن نتیجه اثرگذاری سلول‌های زایا و سوماتیک بر یکدیگر است (۲۵). به عبارت دیگر کاهش بلوغ اسپرماتوژن، تعداد سلول‌های زایا و پارامترهای کمی لوله سمی‌نیفروس در گروه تحت شیمی‌درمانی می‌تواند ناشی از تغییرات توأم سلول‌های زایا و سوماتیک باشد. ضمن این که در مطالعه کنونی اقطار و حجم هسته و سلول لیدیگ نیز کاهش نشان داد. در تایید این کارکردی این سلولها می‌شود (۲۶). ضمن این که در بررسی با میکروسکوپ الکترونی نیز اندازه و ارگانلهای موجود در سلول‌های لیدیگ تحت درمان با  $20\text{ mg/kg}$  بوسولفان، مانند شبکه آندوپلاسمی صاف، میتوکندری و همچنین قطرات چربی کاهش می‌یابد (۲۵). به طور کلی در بسیاری حیوانات شبکه آندوپلاسمی صاف و میتوکندری در سلول‌های استروئید ساز، مانند لیدیگ فراوانند. به دنبال هیپوفیزکتومی (۲۷) و کریپتورکیدیسم (۲۸) نیز حجم پارامترهای سلول لیدیگ کاهش می‌یابد. این نتایج پیشنهاد کننده این مطلب است که احتمالاً فعالیت سنتزی سلول‌های لیدیگ در گروه تحت درمان با بوسولفان کاهش یافته است. ضمن این که ثابت شده است که بین حجم سلول‌های لیدیگ و مقدار شبکه آندوپلاسمی و ظرفیت ترشحی سلول لیدیگ ارتباط مستقیم وجود دارد؛ به عبارت دیگر، سلول‌های لیدیگ فعالتر دارای حجم بالاتری هستند (۲۹). پس احتمالاً در این مطالعه میزان

اسپرماتوژن‌ز در موش تحت شیمی‌درمانی با بوسولفان می‌شود؛ که خود این عوامل نیز به نوعی باعث مهار محور هیپوفیزی- هیپوتالاموسی می‌شوند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بین ملاتونین و گیرنده‌های GnRH در موشها رابطه معکوس وجود دارد و ملاتونین ترشح FSH و LH را کاهش می‌دهد (۳۶). ضمن این که گزارش‌های قبلی نشان‌دهنده این است که ملاتونین دارای خاصیت ضدتکثیری هم روی سلول‌های زایا (۳۷) و هم روی سایر سلول‌های دیگر است (۳۸، ۳۹). هرچند که مکانیسم‌های فوق، ثابت شده نمی‌باشد و برای اثبات آنها مطالعات بیشتری در زمینه سلولی، مولکولی و ایمونوهیستوشیمی و همچنین آندوکرینولوژی مورد نیاز می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ۲۰ mg/kg بوسولفان، باعث کاهش اسپرماتوژن‌ز و بلوغ سلول‌های ژرمینال و همچنین تغییرات کمی پارامترهای بیضه می‌شود. تجویز ملاتونین به میزان ۱۰ mg/kg، به مدت ۵ روز از شروع شیمی‌درمانی به میزان قابل توجهی، تغییرات سوء شیمی‌درمانی بر اسپرماتوژن‌ز را کاهش می‌دهد و نقش حفاظتی خوبی روی بیضه دارد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که ملاتونین ممکن است نقش مفید و مهمی برای کاربردهای کلینیکی اختلالات کارکردی بیضه به دنبال مصرف داروهای ضد سرطان داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت حمایت مالی این مطالعه و با سپاس از سرکار خانم مژگان بشیری کارشناس آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده پزشکی، جهت همکاری صمیمانه در زمینه برش، رنگ‌آمیزی و تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی.

به گونه‌است و در حیوانات مختلف متفاوت است (۳۱). بنابراین مطالعه کنونی نشان داد که دوز ۲۰ mg/kg بوسولفان در موش، با القاء ازواسپرمی همراه نمی‌باشد. هرچند که موجب تخریب شدید اسپرماتوژن‌ز و اولیگواسپرمی می‌شود.

نتایج مطالعه کمی در گروه تحت درمان ترکیبی، با افزایش بلوغ اسپرماتوژن‌ز در این گروه مطابقت دارد. احتمالاً این تغییرات و روند حفظ اسپرماتوژن‌ز با بلوغ بهتر در گروه چهارم نسبت به گروه دوم می‌تواند ناشی از چند مکانیسم باشد:

الف- خاصیت آنتی اکسیدانی قوی ملاتونین، چرا که ملاتونین می‌تواند فعالیت و یا بروز ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند: سوپر اکسید دیس موتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پر اکسیداز را تحریک نماید (۸).

ب- خواص آنتی آپوپوتیک ملاتونین، که با مهار روند آپوپتوز سلول‌های زایا مانع تخریب اسپرماتوژن‌ز شده است (۱۵). در تایید این مطلب، اثرات آنتی آپوپوتیک ملاتونین بر روی بافت‌های مختلف در چندین آزمایش دیگر نشان داده شده است (۱۵).

ج- خواص آنتی پرولیفراتیو ملاتونین، شاید ملاتونین با مهار روند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، روند تمایز آنها را به اسپرماتوسیت مهار می‌نماید. در تایید این مطلب Glode و همکاران برای اولین بار پیشنهاد نمودند که هر عاملی که بتواند باعث کاهش ترشح FSH<sup>1</sup> و LH<sup>2</sup> شود و بتواند محور هیپوفیزی- هیپوتالاموس- گنادی را مهار کند احتمالاً می‌تواند باعث مهار تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در طی شیمی‌درمانی شود. Glode و همکاران ثابت نمودند که درمان با آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپین GnRHa<sup>3</sup> قبل و در طی مصرف سیکلوفسفاماید، باعث حفظ روند اسپرماتوژن‌ز در موش می‌شود (۳۲). به طور مشابهی تجویز لوپرلاید استات (۲۵، ۳)، بوسرلین (۳۳)، تستوسترون (۳۴) و همچنین هورمون‌های استروژن و FSH<sup>4</sup> باعث حفظ

1- Follicle Stimulatory Hormone

2- Luteinizing Hormone

3- Gonadotropin Releasing Hormone analogue

## References

1. Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;34:12-7.
2. Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol.* 2001;15(6):611-7.
3. Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Tamura Y, Kita K, Mitsumasa T, Hosaka M. GnRH analog, leuprorelinacetate acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *Int J Urol.* 2001;8(11):615-22.
4. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11298-302.
5. Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod.* 1999; 60(6):1429-36.
6. Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod.* 2003;69(2):412-20.
7. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science.* 2002;296(5576):2174-6.
8. Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol.* 2009;44(5):328-34.
9. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal model. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(3):237-50.
10. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys.* 2001;34:237-56.
11. Sönmez M, Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol.* 2007;23(2):226-31.
12. Gavella M, Lipovac V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl.* 2000;44(1):23-7.
13. Gwayi N, Bernard RT. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia.* 2002;34(6):391-6.
14. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res.* 2008;40(4):354-60.
15. Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı AO, Yilmaz S, Yüce A, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res.* 2006;41(1):21-7.
16. Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(10):1299-321.
17. Lewis-Johnes DI, Kerrigan DD. A modified johnsen's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. *IRCS Med Sci.* 1985;13:510-11.
18. Redins CA, Redins GM, Novaes JC. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Braz J Biol.* 2002;62(3):517-23.
19. Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res.* 1987;176(2):259-68.
20. Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. The morphological changes of adult mouse testes after 60Co gamma-Radiation. *Iran Biomed J.* 2008;12(1):35-42.
21. van Keulen CJ, de Rooij DG. Spermatogenetic clones developing from repopulating stem cells surviving a high dose of an alkylating agent. *Cell Tissue Kinet.* 1975;8(6):543-51.
22. Newton SC, Blaschuk OW, Millette CF. N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn.* 1993;197(1):1-13.
23. Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL-and p53-independent manner. *FEBS Lett.* 2004;575(1-3):41-51.
24. Mohammad Ghasemi F, Soleimanirad J, Ghanbari AA. [An ultrastructural study on the apoptotic features of spermatogenic cells following busulfan treatment in adult mice]. *J Reprod Infertil.* 2007;8 (4):319-29.Persian
25. Mohamad Ghasemi F. [Ultrastructural evaluation and study of incidence of apoptosis in adult mouse

- testis following treatment with busulfan and GnRH analog supportive therapy] [Dissertation]. [Tabriz]: Tabriz University Of Medical Sciences; 2006 July. Part 3, Results; p. 110-18. Persian.
26. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*. 2001;7(4):363-9.
  27. Qin DN, Lung MA. Morphometric study on Leydig cells in capsulotomized testis of rats. *Asian J Androl*. 2002;4(1):49-53.
  28. Mendis-Handagama SM, Kerr JB, De Kretser DM. Experimental cryptorchidism in the adult mouse. III. Qualitative and quantitative electron microscopic morphology of Leydig cells. *J Androl*. 1991;12(5):335-43.
  29. França LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*. 2003;68:1554-61.
  30. Chatterjee R, Mills W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone AH. Germ cell failure and Leydig cell insufficiency in post-pubertal males after autologous bone marrow transplantation with BEAM for lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 1994;13(5):519-22.
  31. Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Hahnel AC. Dose-response of RAG2<sup>-/-</sup>/Gammac<sup>-/-</sup> mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction*. 2003;126(2):205-16.
  32. Glode LM, Robinson J, Gould SF. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *Lancet*. 1981;1(8230):1132-4.
  33. Mohamad Ghasemi F, Bahadori MH, Faghani M, Nasiri E, Soleimani Rad J. [Buserelin inhibits apoptosis in male germ cells induced by busulfan in mouse testis]. *J Iran Anat Sci*. 2009;7(45-54). Persian.
  34. Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Tamura Y, Kita K, Kubota Y. Testosterone administration promotes regeneration of chemically impaired spermatogenesis in rats. *Int J Urol*. 2006;13(8):1103-8.
  35. Jafarian A, Akhondi MM, Pezhhan N, Sadeghi MR, Zarnani AH, Salehkhou S. [Stimulatory effects of Estradiol and FSH on the restoration of spermatogenesis in azoospermic mice]. *J Reprod Infertil*. 2008;9(4):317-24. Persian.
  36. Johnston JD, Messager S, Ebliing FJ, Williams LM, Barrett P, Hazlerigg DG. Gonadotrophin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2831-5.
  37. d'Istria M, Serino I, Izzo G, Ferrara D, De Rienzo G, Minucci S. Effects of melatonin treatment on Leydig cell activity in the testis of the frog *Rana esculenta*. *Zygote*. 2004;12(4):293-9.
  38. Tam CW, Chan KW, Liu VW, Pang B, Yao KM, Shiu SY. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J Pineal Res*. 2008;45(4):403-12.
  39. Pizarro JG, Yeste-Velasco M, Esparza JL, Verdaguer E, Pallàs M, Camins A, et al. The antiproliferative activity of melatonin in B65 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell cycle-related genes. *J Pineal Res*. 2008;45(1):8-16.