

ارزیابی هورمونهای گنادوتروپین و تستوسترون در موش‌های صحرایی نر بالغ کلستاتیک

دکتر ابراهیم نصیری (استادیار)*، دکتر سید محمد حسین نوری موگهی (دانشیار)**، دکتر احمد رضا دهپور (استاد)***، دکتر فرید ابوالحسنی** حامد صادقی پور (دانشجوی پزشکی)****

* گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

** بخش بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: کلستاز انسدادی نوعی بیماری کبدی است که با تجمع اسیدهای صفراوی، افزایش تونوس اویوتیدهای درون‌ساز، نیتریک‌اکساید و سیتوکین‌ها در پلاسما همراه است. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات احتمالی هورمونهای گنادوتروپین و میزان آپوتوز سلول‌های زاینده در موش کلستاتیک می‌باشد.

مواد و روشها: برای این مطالعه سه گروه موش صحرایی بکار بردیم: شاهد (بدون جراحی)، شاهد جراحی با Sham (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی). سه هفته بعد از انجام جراحی غلظت سرم هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون توسط ایمونورادیومتریک اسی (IRMA) و آپوتوز سلول‌های زاینده بیضه با روش TUNEL اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش بیانگر کاهش معنی‌دار هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در گروه کلستاتیک نسبت به گروه‌های شاهد و شاهد-جراحی است. که در این رابطه میانگین غلظت هورمون FSH در موش‌های کلستاتیک نسبت به گروه‌های شاهد و شاهد-جراحی است ($P < 0/05$). در حالی که تغییر معنی‌داری در شاخص آپوتوز گروه کلستاتیک نسبت به گروه‌های دیگر مشاهده نشد ($P < 0/19$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: از نتایج این مطالعه حدس زده می‌شود که آپوتوز سلول‌های زاینده بیضه موش‌های بالغ تنها وابسته به هورمون‌های گنادوتروپین و تستوسترون نیست بلکه فاکتورهای دیگری نیز ممکن است دخالت داشته باشند.

مقدمه

کلستاز انسدادی نوعی بیماری کبدی است که بیشتر بعثت گیر کردن سنگ صفراوی در مجرای صفراوی مشترک، آمپول واتر یا کارسینومای سرپانکراس بوجود می‌آید. این بیماری با تجمع نمکهای صفراوی و بیلی روبین در پلاسما همراه است. تحقیقات جدید در کلستاز انسدادی افزایش اویپوئیدی درون‌ساز، نیتریک اکساید و سیتوکین‌ها را در پلاسما نشان می‌دهد (۱،۲،۳،۴،۵). بیشتر این فاکتورها روی محور جنسی مؤثر بوده، باعث تغییر در ترشح گنادوتروپین و تستوسترون می‌گردند. اویپوئیدهای اندوژن ترشح گنادوتروپین‌ها را با مهار هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) - Gonadotropin-releasing hormone مترشح از هیپوتالاموس، کاهش می‌دهد (۶). نیتریک اکساید اگزوژن باعث مهار محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) - Hypothalamus-Pituitary-Gonad می‌شود (۷) که اثرات آن بر آپوتوز، بر اساس مقدار آن در نوع بافت و سلول، متفاوت است در بعضی از شرایط باعث القاء آپوتوز می‌شود. بقای سلول‌های زاینده بیضه وابسته به حضور گنادوتروپین است و کاهش آن منجر به افزایش آپوتوز سلولهای زاینده می‌گردد (۸). بنابراین بنظر می‌رسد که در کلستاز انسدادی احتمال تغییر در ترشح گنادوتروپین و تستوسترون وجود داشته می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات احتمالی هورمونهای گنادوتروپین، تستوسترون و میزان آپوتوز سلولهای زاینده در موش کلستاتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کیت‌های ایمونو-رادایومتریک (IRMA) Immunoradiometric Assay برای سنجش هورمون‌های FSH, LH و تستوسترون از شرکت (DSL) Diagnostic Systems Laboratories, Inc (ویستر، تگزاس، امریکا) خریداری شد و برای بررسی آپوتوز سلولهای زاینده از کیت

تشخیصی-Klenow FragEL DNA Fragmentation از شرکت Oncogen (USA, MI) استفاده گردید.

موشهای صحرایی نر ۱۶-۱۲ هفته ای با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم، نژاد Sprague-Dawley از بخش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو کرج تهیه گردیدند.

قبل از انجام مطالعه، موشها به بخش حیوانات آزمایشگاهی بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی منتقل شد و با حیوانات براساس مقررات و دستورالعمل تدوین شده توسط (NIH) Health National Institute USA رفتار شد. موشها بطور تصادفی به سه گروه هشت تایی تقسیم شدند. گروه شاهد (بدون جراحی)، گروه شاهد-جراحی با Sham (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه آزمایش یا کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) و در تمام مدت مطالعه غذای پلیت و آب به میزان کافی در اختیار حیوانات قرار داشت و با برقراری سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. انسداد مجرای صفراوی بر اساس پروتکل موجود در مطالعات قبلی صورت گرفت (۱۲،۱۳). برای این منظور توسط کامین (داخل صفافی ۵۰ mg/kg) و کلروپرومازین (۱۰ mg/kg) تحت بیهوشی کامل قرار گرفتند و سپس لاپاراتومی انجام گردید. در گروه شاهد-جراحی، مجرای صفراوی با استفاده از پنست فقط مشاهده شد در گروه کلستاتیک مجرای صفراوی با دو گره در فاصله چند میلی‌متری بسته شد و حد فاصل بین دو گره با قیچی قطع گردید سپس جدار شکم در دو لایه فاسیا و پوست بخیه گردید. میزان مرگ و میر بعد از عمل در گروه آزمایش حدوداً ۱۰٪ بودند. بعد از ۲۱ روز موشهای صحرایی ابتدا از اثر بیهوش گردید و سپس قطع نخاع شدند و مقدار ۵ سی‌سی خون با استفاده از سرنگ استریل از قلب استخراج شد و سپس با سانتریفوژ نمونه‌ها در ۱۵۰۰ rpm بمدت ۱۰ دقیقه سرم جدا گردید. سرم‌ها تا زمان آزمایش در منهای هفتاد درجه نگهداری گردید. همزمان بیضه‌های حیوان برداشته شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی برای ارزیابی آپوتوز سلول‌های زاینده در محلول فیکساتیوئین نگهداری شد. مقادیر LH, FSH و

الف) کلستازیس موجب کاهش معنی دار هورمونهای LH ، FSH و تستوسترون می‌شود

با توجه به نمودار ۱- الف) میانگین غلظت هورمون FSH در موش‌های کلستاتیک ($1/0.38 \text{ ng/ml} \pm 13/22$) نسبت به گروه‌های شاهد ($1/276 \text{ ng/ml} \pm 18/14$) و شم ($1/0.72 \pm 17/92$) بطور معنی دار کاهش یافت ($P= 0/0192$). نمودار ۱- ب) تاثیر کلستازیز بر روی هورمون LH را نشان می‌دهد. که در این رابطه میانگین غلظت هورمون LH در موش‌های کلستاتیک ($0/21 \text{ ng/ml} \pm 0/83$) نسبت به گروه‌های شاهد ($0/26 \text{ ng/ml} \pm 2/058$) و شم ($0/17 \text{ ng/ml} \pm 1/84$) بطور معنی دار کاهش داشت ($p= 0/0029$).

نمودار ۱- ج) تاثیر کلستازیز بر روی هورمون تستوسترون را نشان می‌دهد که در این رابطه میانگین غلظت هورمون تستوسترون در رت‌های کلستاتیک ($0/16 \text{ ng/ml} \pm 1/052$) نسبت به گروه‌های شاهد ($0/18 \text{ ng/ml} \pm 2/41$) و شم ($0/14 \text{ ng/ml} \pm 2/31$) بطور معنی دار کاهش نشان داد ($p= 0/0023$).

ب) عدم تاثیر کلستاز انسدادی بر روی آپوپتوز سلولهای زاینده

سلولهای زاینده آپوپتوتیک در تمامی گروه‌ها دیده شد ولی شاخص آپوپتوز (شکل ۱- و نمودار ۲-) در رت‌های کلستاتیک ($1/374 \pm 9/897$) نسبت به گروه‌های شاهد ($0/91 \pm 7/086$) و sham ($1/101 \pm 7/726$) تغییرات معنی‌داری را نشان نداد ($P= 0/195$).

تستوسترون پلازما با استفاده از روش ایمونورادیومتریک (IRMA) براساس دستورالعمل‌های شرکت تولید کننده کیت و با استفاده از دستگاه گاما کانتر اندازه‌گیری شد.

شاخص آپوپتوز با شمارش سلولهای TUNEL مثبت در ۱۵۰ برش عرضی از مناطق لوله‌های منی‌ساز محاسبه گردید. پس از شمارش سلولهای اسپرماتوگونیای آپوپتوتیک و غیر آپوپتوتیک شاخص آپوپتوز برای هر لوله منی‌ساز با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید:

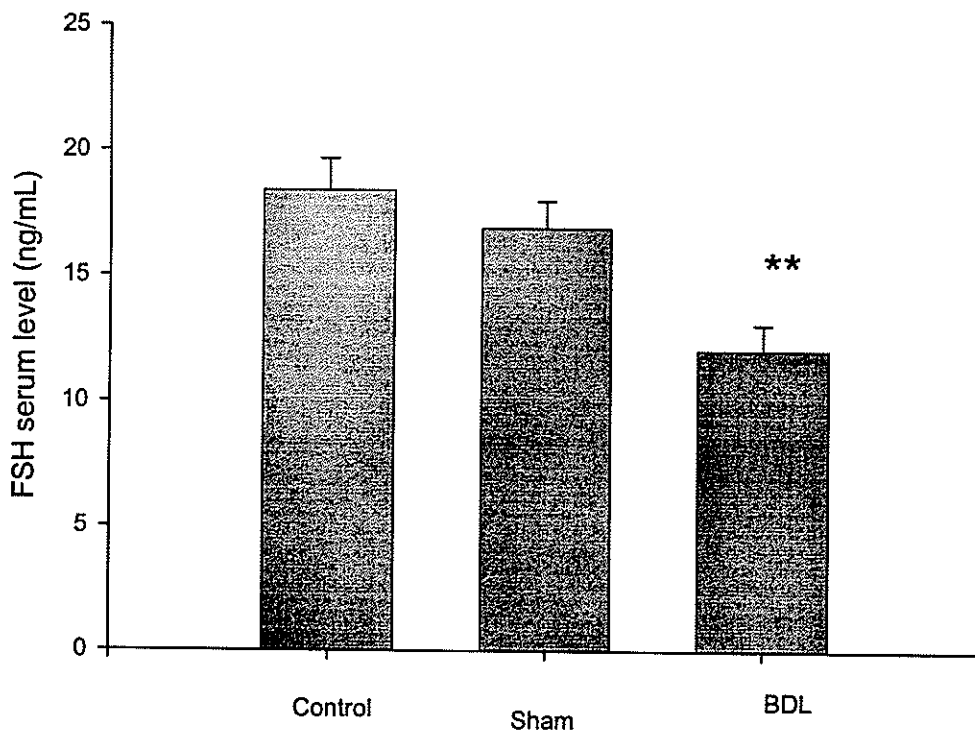
$$\text{Apoptotic index} = \frac{\text{تعداد سلولهای آپوپتوتیک} \times 100}{\text{تعداد کل سلولها}}$$

آنالیز آماری:

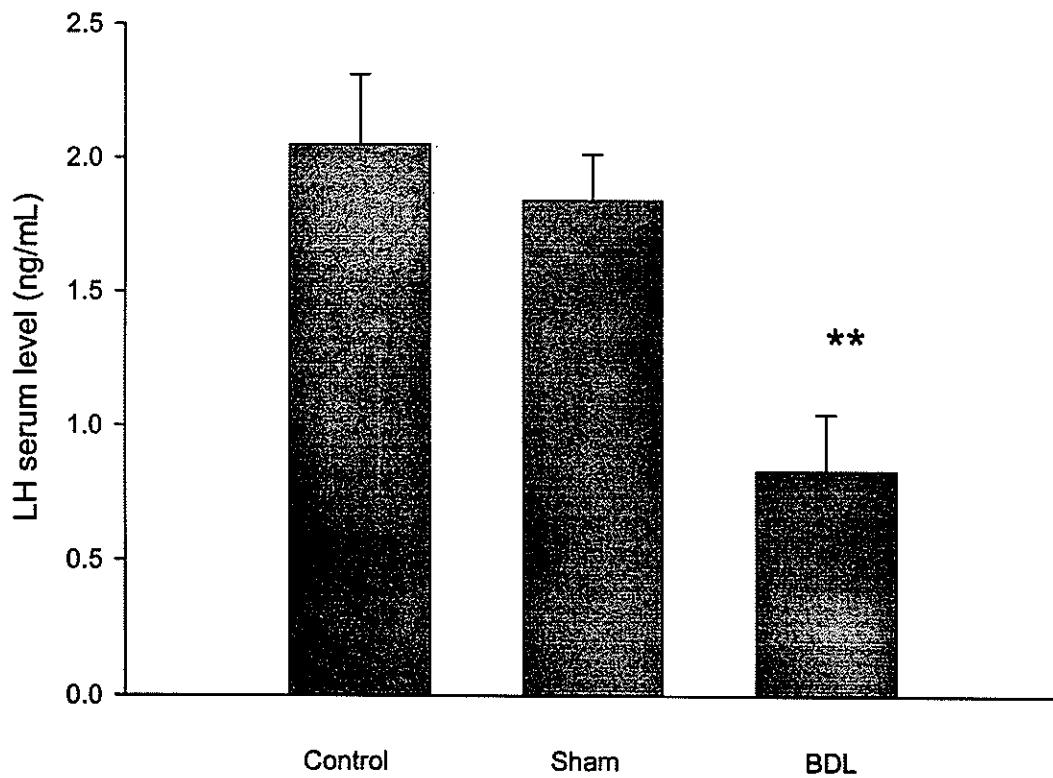
تمامی مقادیر بصورت میانگین \pm خطای انحراف استاندارد نشان داده شده است، ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA انجام گردید و بین دو گروه با T-Test محاسبه گردید و بر همین اساس ارزش P کمتر از ۰/۰۵ ($p < 0.05$) از لحاظ آماری معنی دار است.

یافته‌ها

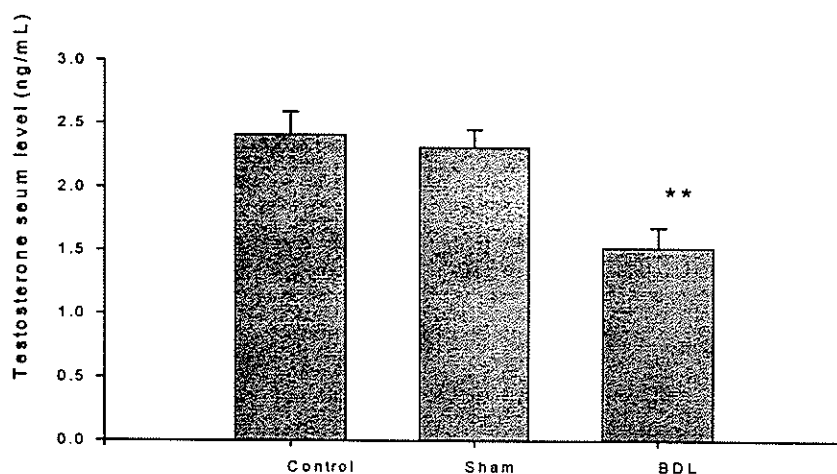
یک روز بعد از لاپاراتومی رت‌های کلستاتیک علائم کلستازیس (زردی، ادرار تیره، و استاتوره) را بروز دادند و پس از ۲۱ روز رت‌ها کشته شدند و هورمون‌های LH ، FSH و تستوسترون در سرم اندازه‌گیری شد و میزان آپوپتوز سلولهای زاینده در هر گروه با شمارش سلولهای زاینده TUNEL مثبت در مجاری منی‌ساز گرد بررسی شد.



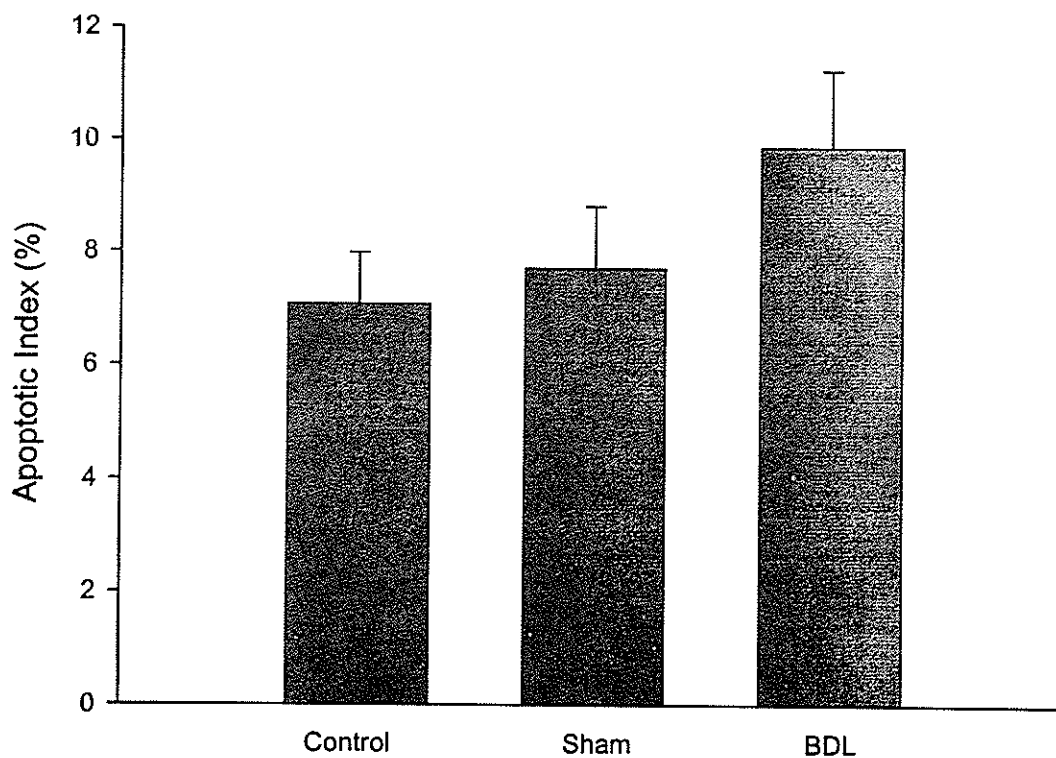
نمودار ۱-الف) تاثیر کلستازیس (BDL=Bile Duct Ligation) بر سطح سرمی FSH نشان می‌دهد. علامت (*) نشانگر معنی‌دار بودن اختلاف میانگین گروه کلستازیس با گروه‌های شاهد و Sham دارد ($P=0.0192$).



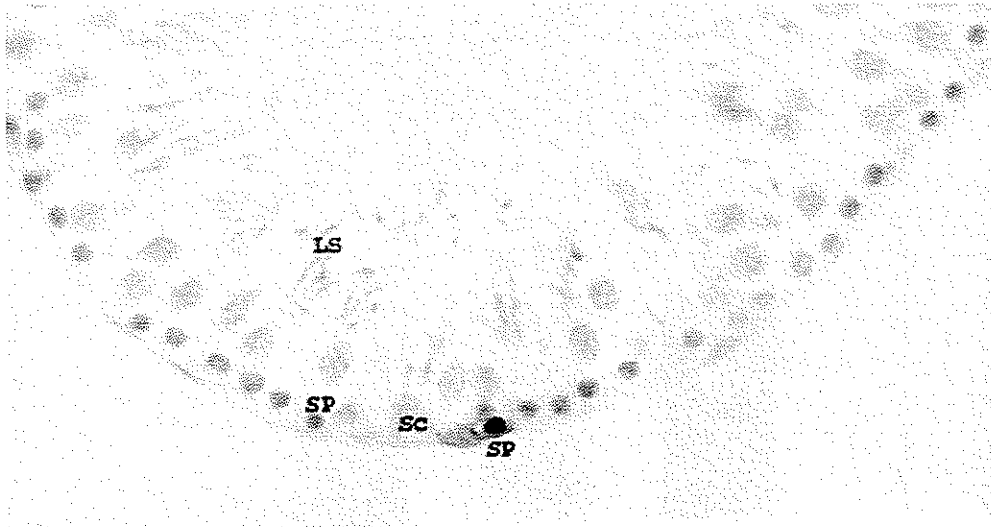
نمودار ۱-ب) تاثیر کلستازیس (BDL=Bile Duct Ligation) بر سطح سرمی LH نشان می‌دهد. علامت (*) نشانگر معنی‌دار بودن اختلاف میانگین گروه کلستازیس با گروه‌های شاهد و Sham دارد ($p=0.0029$).



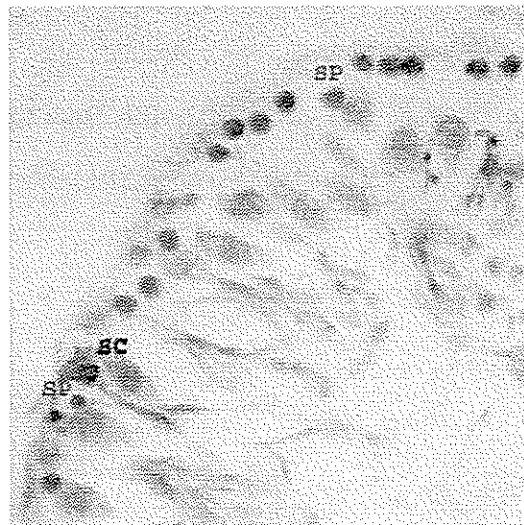
نمودار ۱-ج) تاثیر کلستازیس (BDL=Bile Duct Ligation) بر سطح سرمی Testosterone نشان می‌دهد. علامت (*) نشانگر معنی‌دار بودن اختلاف میانگین گروه کلستازیس با گروه‌های شاهد و Sham دارد (p= ۰/۰۰۲۳).



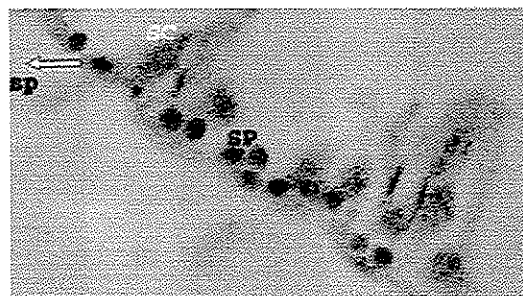
نمودار ۲- تاثیر کلستازیس (BDL=Bile Duct Ligation) بر آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه، اعداد بصورت میانگین ± خطای استاندارد معیار بیان شده است (P= ۰/۱۹۵).



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۱- رنگ آمیزی TUNEL سلولهای زاینده مجرای منی ساز بیضه در سه گروه کنترل (الف)، شم (ب) و کلستازیس (ج). سلولهای آپوتوتیک TUNEL مثبت، به رنگ قهوه‌ای و سلولهای غیر آپوتوتیک توسط متیل گرین به رنگ سبز نشان داده شده است. اسپرما توگونی SP، اسپرما تید دراز نابالغ LS، اسپرما توسیت پاکی تن P و غشاء پایه BM.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که در موش‌های کلاستاتیک، کاهش معنی‌داری در ترشح LH, FSH و تستوسترون در پلازما ایجاد شده است. از آنجائیکه در کلاستاز چندین فاکتور، شامل: اویونیدها، نیتریک اکساید و سیتوکین‌ها افزایش می‌یابند (۱،۲،۳،۴،۵) لذا احتمال می‌رود که افزایش این فاکتورها دلیلی برای کاهش میزان LH, FSH و تستوسترون در پلاسمای موش‌های کلاستاتیک باشد.

کاهش گنادوتروپین‌ها در موش‌های معتاد دیده شده است و تجویز اویونیدهای اگزوزن همانند مرفین باعث کاهش سطح سرمی تستوسترون می‌گردد. بنظر می‌رسد اویونیدهای اندوزن ترشح گنادوتروپین را با مهار GnRH از هیپوتالاموس کاهش می‌دهد (۹،۱۰).

بنابراین ممکن است افزایش اویونید در کلاستاز در کاهش گنادوتروپین‌ها نقش داشته باشد. در جریان کلاستاز انسدادی افزایش بیش از حد نیتریک اکساید اتفاق می‌افتد که مقدار زیاد آن برای بسیاری از سلولها، عوارض سمی (Cytotoxic) دارد (۱۱). در مطالعاتی که با نیتریک اکساید اگزوزن صورت گرفته است، نیتریک اکساید باعث مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد (HPG) شده است (۷) و تجویز آزاد کننده نیتریک اکساید (DETO/ NO) باعث مهار فرآیند استروئیدوزنیز در سلولهای لایدیگ گردیده است (۱۲)، لذا این احتمال وجود دارد که افزایش نیتریک اکساید ناشی از کلاستاز بر کاهش گنادوتروپین‌ها و تستوسترون دخالت داشته باشد.

در موش‌های کلاستاتیک، سیتوکین‌ها (همچون TNF, IL-6, IL-1) افزایش می‌یابد (۴،۱۳). مطالعات نشان داد که سیتوکین‌ها از طریق مهار فرآیند استروئیدوزن در سلولهای لایدیگ باعث کاهش تستوسترون میشوند (۱۳) و این احتمال وجود دارد که سیتوکین‌ها در کلاستاز انسدادی در کاهش گنادوتروپین‌ها و تستوسترون بی‌تاثیر نباشد. بقای سلولهای زاینده بیضه وابسته به گنادوتروپین‌ها است، هیپوفیزکومی در موش علاوه بر تشدید آپوپتوز سلول‌های زاینده باعث تغییرات مورفولوژی در سلول‌های سوماتیک بیضه نیز شد و تجویز

گنادوتروپین‌ها باعث مهار آپوپتوز گردید (۱۴). در این پژوهش کاهش گنادوتروپین‌ها و تستوسترون در موش‌های کلاستاتیک مشاهده شد ولی افزایش معنی‌داری در آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد که احتمالاً علت عدم تغییر آپوپتوز، بالغ بودن موش‌ها باشد زیرا در مطالعات Billig و همکارانش، در تجویز آنتاگونیست‌های گنادوتروپین به موشهای بالغ و نابالغ مشخص گردید که آپوپتوز در موشهای نابالغ افزایش یافته ولی در موش‌های بالغ علیرغم کاهش گنادوتروپین‌ها تا مرز ۸۰٪ تغییر در آپوپتوز سلولهای زاینده مشاهده نشد (۱۴). بنابراین می‌توان احتمال داد که فاکتور سن یکی از عوامل مؤثر در بقای سلولهای زاینده باشد و هورمونهای گنادوتروپین و تستوسترون در زمان بلوغ تنظیم کننده اصلی آپوپتوز سلولهای زاینده بیضه نباشند (۱۵). علاوه بر این تنظیم آپوپتوز سلولهای زاینده توسط یکسری ژنهای مختلف کنترل میشود از جمله آنها پروتئین‌های خانواده BCL-2 است که دو دسته‌اند: پروآپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک، که ظاهراً با هم تعادل دینامیکی دارند. عمل رقابتی پرو و آنتی آپوپتوتیک فعالیت پروتازها (Caspases) را که مخرب سلولی هستند کنترل می‌نماید (۱۶). آپوپتوز سلول‌های بیضه تنها وابسته به عوامل هورمونی نیست بلکه بسیاری از فاکتورهای غیر هورمونی که هنوز بسیاری از آنها ناشناخته هستند دخالت دارند (۱۷). روند اسپرماتوزن در مجاری منی‌ساز یک روند پیچیده‌ای بوده و توسط فاکتورهای داخلی مترشحه از سلول‌های بافت بیضه بخصوص سلول سرتولی و فاکتورهای خارجی تنظیم می‌گردد. و هر گونه عاملی که سبب ایجاد تغییر در فعالیت طبیعی سلول‌های بافت بیضه و نقش طبیعی فاکتورهای داخلی و خارجی گردد میتواند در روند اسپرماتوزن اختلال ایجاد کند.

جمع‌بندی نتایج حاصل از مطالعات فوق نشان می‌دهد که کلاستاز انسدادی حاد باعث کاهش هورمون‌های LH, FSH و تستوسترون می‌شود و این کاهش شاید بخاطر افزایش تون اویونیدها، نیتریک اکساید و یا رادیکال‌های آزاد دیگر در موش‌های کلاستاتیک باشد. کلاستاز انسدادی حاد تاثیری معنی‌داری بر آپوپتوز سلول‌های زاینده اسپرماتوگونی در بیضه موش‌های صحرایی ندارد. لذا بنظر می‌رسد که فاکتورهای

فاکتورهای بقاء سلول‌های زاینده در جریان کلستاز انسدادی می‌تواند دانش ما را در مورد تظاهرات کلستاز کامل‌تر کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پرسنل مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بخصوص از آقای دکتر هدایتی و خانم دکتر آذری که در انجام سنجش هورمونی و آقای دکتر E.V. Younglai از دانشگاه McMaster کانادا که ما را در روش TUNEL Apoptosis یاری نمودند تقدیر و قدردانی می‌گردد.

افزایش یافته در جریان کلستاز، علی‌رغم کاهش دادن هورمون‌های گنادوتروپینی و تستوسترون نتوانسته‌اند منجر به تغییرات ریخت‌شناسی و افزایش آپوپتوز سلول‌های زاینده بیضه گردد. بنابراین بنظر می‌رسد که وجود اختلال در محور هورمونی هیپوفیز-بیضه‌ای به تنهایی نمی‌تواند عامل ایجاد آپوپتوز سلول‌های زاینده و اختلال در روند اسپرماتوزن باشد. احتمالاً فاکتورهای دیگری که هنوز ناشناخته‌اند همراه با اختلال هورمونی روی آپوپتوز سلول‌های زاینده بیضه تأثیر دارند. بررسی‌های آینده در مورد شناخت عوامل دیگر

منابع

1. Arezo Nahavandi, Ahmad Reza Dehpour, Alireza Mani, Homayoun Homayounfar, Ali Abdoli, Mohammad Reza Abdolhoseini. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *European Journal of Pharmacology* 2001; 411:135-41.
2. Ahmad R. Dehpour, Arash Seyyedi, Hossein Rastegar, Khodadad Namirania, Leila moezi, Hamed Sadeghipour, Mehdi Dehghani, Masoumeh Jorjani, Farshad Roushanzamir, and Abolhasan Ahmadiani. The nonadrenergic noncholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated Rats. *European Journal of Pharmacology* 2002;445:31-36.
3. Khodadad Narimani, Morteza Samini, Sharam Ejtemaei Mehr, Seyed Ali Gaskari, Hossein Rastegar, Houman Homayoun, Ahmad Reza Dehpour. Mesenteric Vascular bed responsiveness in bile duct-ligated Rats:roles of opioid and nitric oxide systems. *European Journal of Pharmacology* 2001; 423:185-93.
4. Bettina Zietz, Irina Wengler, Helmut Messmann, Guntram Lock, Jurgen Schomerich, Rainer H. Straub. Early shifts of adrenal steroid synthesis before and after relief of short-term cholestasis. *Journal of Hepatology* 2001; 35:329-337.
5. Mossad A.M. Abou-seif and Abd-Allah Youssef. Oxidative stress and male IGF-1, gonadotropin and related hormones in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(7):618-623.
6. Cicero TJ. Effects of exogenous and endogenous opiates on the hypothalamic-Pituitary-gonadal axis in the male. *Fed-Proc.* 1980; 39(8):2551-54.
7. Pinilla L., Gonzalez L.C., Tena-Sempere M., Bellido C., Aguilar E. Effects of systemic blockade of nitric oxide synthase on pulsatile LH, prolactin and GH secretion in adult male rats. *Horm Res* 2001;55(5):229-235.
8. Hakan Billig, Itsuko Furuta, Catherine Rivier, Juha Tapanainen, Martti Parvinen and Aaron J.W. Hsueh. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 1995;136(1):5-12.
9. Cicero TJ, Meyer ER, Wiest WG, and et al. Effects of chronic morphine administration on the reproductive system of male rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975;192(3):542-8.
10. Cicero TJ, Bell RD, Meryer ER, and et al. Narcotic and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: acute androgen dependent systems. *J. Pharmacol Exp Ther.*1977;201(1):76-83.
11. Marinella Rosselli, Raghvendra K. Dubey, Bruno Imthurn, Ervin Macas and Paul J. Keller. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decrease sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reproduction* 1995; 10(7):1786-90.
12. Karina Del Punta, Eduardo H. Charreau and Omar P. Pignataro. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1996; 137(12): 5337-43.
13. Constantine Tsigos, Dimitris A. Papanicolauo, Ioannis Kyrou, Sotirios A. Raptis, George P. Chrousos. Dose-dependent effect of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 1999; 19(11):1271-1276.
14. Hakan Billig, Itsuko Furuta, Catherine Rivier, Juha Tapanainen, Martti Parvinen and Aaron J.W. Hsueh. Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 1995;136(1):5-12.
15. M. Fujisawa. C. Hiramane, H. Tanaka, H.Okada, S. Arakawa, and S. Kamidono. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *Word Journal Urology* 1999; 17:296-300.
16. Wei Yan, Michel Samson, Bernard Jegou, and Jorma Toppari. Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Molecular Endocrinology* 2002;14(5):682-99.
17. Amiya P. Sinha Hikim and Ronald S. Swedloff. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999; 4:38-47.