

Sıçan Germ Hücrelerinde Radyasyona Bağlı Apoptoz ve Amifostin İle İlişkisi*

THE RELATIONSHIP BETWEEN RADIATION-INDUCED APOPTOSIS IN RAT GERM CELLS AND AMIFOSTINE

Dr.Ömür KARAKOYUN ÇELİK,^a Dr.Arif ARAS,^{Hata! Bağlantı geçersiz.} Dr.Dilek TUĞAN,^{Hata! Bağlantı geçersiz.} Dr.Mine HEKİMGİL,^{Hata! Bağlantı geçersiz.}

Dr.Deniz YALMAN,^{Hata! Bağlantı geçersiz.} Dr.Mustafa ESASSOLAK,^{Hata! Bağlantı geçersiz.} Dr.Ayfer HAYDAROĞLU^{Hata! Bağlantı geçersiz.}

^{Hata! Bağlantı geçersiz.}Radyasyon Onkolojisi AD, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İZMİR

Özet

Amaç: Testis dokusu, iyonizan radyasyona en yoğun apoptotik yanıt veren dokulardan biridir. Amifostin kanser ilaçları ve radyasyonun yan etkilerini önleyen bir ajandır. Bu çalışmada amifostinin, radyasyona maruziyet sonucu sıçanların testiküler germ hücrelerinde meydana gelen apoptotik ölümler üzerindeki etkisi TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labelling assay) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Ortalama ağırlıkları 250 gr olan 34 adet erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan çalışma gruplarında 12'şer adet, kontrol grubunda 10 adet olmak üzere toplam 3 gruba ayrılmıştır. Radyasyon Theratron 780-C Co⁶⁰ teleterapi cihazı ile tüm batin ve testislere 2 Gy olarak verilmiştir. Birinci gruptaki sıçanlara sadece radyasyon, ikinci gruptaki sıçanlara radyasyondan 15 dk. önce 200 mg/m² amifostin intraperitoneal olarak uygulanmış, kontrol grubundaki sıçanlara ise ne radyasyon ne de amifostin uygulanmıştır. Sıçanlar radyasyondan 10 hafta sonra histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme için sakrifiye edilmiştir. Apoptozun saptanmasında TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-X nick end labelling assay) yöntemi kullanılmıştır. Histolojik değerlendirmelerin ardından Apoptotik İndeks (AI) yüzdeleri, hazırlanan her bir kesitte rastgele odaklanan 10 ayrı seminifer tübülün değerlendirilmesiyle elde edilmiştir.

Bulgular: Kontrol grubundaki normal seminifer tübüllerde düşük oranlarda gözlenen apoptoz, spontan apoptoz olarak değerlendirilmiş olup bu grupta ortalama AI oranı %1.8'dir. Radyasyon verilmesinden on hafta geçmiş olmasına rağmen 2 Gy sonrasında her iki çalışma grubunda da yoğun apoptotik yanıtlar gözlenmiştir. Ortalama AI oranları sadece radyasyon uygulanan grupta %42, radyasyon öncesinde amifostin uygulanan grupta %37 olarak hesaplanmış olup iki çalışma grubunun AI'leri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Sonuç: Radyasyondan 15 dk. önce intraperitoneal olarak verilen amifostin, sıçanlarda radyasyonun indüklediği germ hücresi apoptozuna karşı bir koruyuculuk göstermemektedir.

Anahtar Kelimeler: Radyasyon, apoptoz, germ hücresi

T Klin Tıp Bilimleri 2004,24:142-146

Abstract

Objective: Testicular tissue produces an extensive apoptotic response to irradiation. Amifostine is a chemoprotectant that is used to prevent some of the side effects of chemotherapy (cisplatin) or radiation therapy. The purpose of this study was to evaluate the efficacy of amifostine on radiation-induced apoptosis of testicular germ cells using the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labelling assay) method.

Material and Methods: Thirty-four male Sprague-Dawley rats with a median weight of 250 grams were grouped into three groups, comprised of 12 rats in each of 2 study groups and 10 rats in a control group. Irradiation was applied with a Theratron 780-C Co⁶⁰ teletherapy machine. A single fraction of 2 Gy was given to the whole abdomen and testes. The first group received 2 Gy radiotherapy alone, while the second group received 200 mg/m² amifostin intraperitoneally 15 minutes prior to irradiation. The control group received neither radiation nor amifostine. The rats were sacrificed 10 weeks after irradiation for immunohistological evaluation. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labelling assay) was used to identify apoptosis. Apoptotic indices (AI) were obtained by evaluating ten separate seminiferous tubules on each slide randomly.

Results: A low rate of AI (1.8%) observed in the control group was evaluated as spontaneous apoptosis. Although the interval after irradiation was 10 weeks, both groups receiving 2 Gy exhibited intense apoptotic responses. The mean AI was 42% in the radiation alone group and 37% in the radiation plus amifostine group. There was no statistically significant difference between the AI's of the study groups.

Conclusion: Intraperitoneal administration of amifostine, 15 minutes prior to irradiation, did not prevent radiation-induced germ cell apoptosis in rats.

Key Words: Radiation, apoptosis, germ cell

T Klin J Med Sci 2004,24:142-146

Geliş Tarihi/Received: 05.09.2003 Kabul Tarihi/Accepted: 06.04.2004

*V. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 20-23 Nisan 2002, Kuşadası.

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Deniz YALMAN
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi AD,
35100 Bornova/İZMİR
dyalman@med.ege.edu.tr

Copyright © by Türkiye Klinikleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar, testis germ hücresi ölümünün apoptoz yoluyla meydana geldiğini göstermiştir.¹⁻⁵ Spontan apoptoz, germ hücrelerinin gelişimi esnasında oluşan ve hasarlı germ hücrelerinin eliminasyonunu sağlayan fizyolojik bir süreç olup ayrıca iyonizan radyasyon, kemoterapi ve hormonal manipülasyonlar gibi bir

takım dış uyarılar da apoptoza yol açmaktadır.⁶⁻¹⁴ Oakberg¹⁵ ve Clermont,¹⁶ testis germ hücrelerinde dejenerasyonun anormal kromozoma sahip hücrelerin eliminasyonunu sağlayan bir mekanizma olabileceğini ileri sürmelerine rağmen günümüzde apoptozun spermatojenik germ hücrelerinde yüksek oranlarda gözlenmesinin nedeni henüz bilinmemektedir.

Kanserin iyonizan radyasyon ile tedavisinde terapötik kazancı artırmanın bir yolu, antitümöral etkinliği değiştirmeksizin normal dokuları radyasyon hasarından koruyan hücre koruyucu ajanların kullanılmasıdır. Amifostin, hücre koruyucu olarak kullanılan ajanlar içerisinde organa özgül olmaksızın geniş bir hücre koruyucu yelpaze sunan bir tiyol bileşiğidir. Hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar, amifostinin radyoterapinin sitotoksik etkisini etkilemeksizin normal dokular üzerindeki zararlı etkileri azalttığını göstermiştir.

Milas ve arkadaşları,¹⁷ amifostinin tek fraksiyon yüksek doz radyoterapiye karşı testis dokusu üzerindeki koruyucu etkisini repopule olan ve olmayan seminifer tübüllerin incelenmesi yoluyla göstermişlerdir. Bu çalışmada ise amifostinin radyasyona bağlı germ hücresi apoptozu üzerindeki koruyucu etkisi TUNEL yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntemler

Bu deneysel çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (E.Ü.T.F) Hayvan Etik Kurulu'ndan izin alınarak E.Ü.T.F Deneysel Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Çalışmada Ege Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Hayvan Bakım Merkezi'nde yetiştirilmiş ortalama ağırlıkları 250 gram olan 34 adet "Sprague Dawley" cinsi erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, çalışma gruplarında 12'şer adet, kontrol grubunda 10 adet olmak üzere toplam 3 gruba ayrılmış ve çalışmanın başlatılmasından bir hafta öncesinden sakrifiye edilene kadar geçen süre içerisinde E.Ü.T.F. Deneysel Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda, sıçanlar için uygun olan kafeslerde, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık

ortamda, konvansiyonel sıçan besinleri ve su *ad libitum* verilerek yaşatılmıştır.

Genel anestezi intramusküler ketamin (10 mg/kg) ile sağlanmıştır. Ardından sırayla kontrol grubuna (radyasyon ve amifostin uygulanmayan grup) ve 1. gruba (yalnız 2 Gy radyasyon uygulanan grup) salın; 2. gruba (2 Gy radyasyon ve amifostin uygulanan grup) intraperitoneal yol ile radyasyondan 15 dakika önce 200 mg/m² amifostin uygulanmıştır. Mukavva karton üzerine 6'lı ya da 3'erli gruplar halinde yerleştirilip flaster ile yapıştırılan sıçanlar Theratron 780-C Co⁶⁰ teleterapi cihazı ile 80 cm SSD'de tek fraksiyon 2 Gy dozda, testis cildi üzerine 0,5 cm kalınlığında 5 x 5 cm ebadında bölüs maddesi konularak tüm batin ve testisleri içeren sahadan ışınlanmıştır.

Sıçanlar işlemiden 10 hafta sonra yüksek doz fentobarbütal verilerek sakrifiye edilmiştir. Testisler sıçanların karınları tıraş edildikten sonra alt abdomen duvarına orta hat insizyonu yapılarak skrotumdan yavaşça çıkarılıp bovin solüsyonunda tespit edilmiş ve klasik parafine gömme işlemlerine tabi tutulmuştur.

Apoptozun Saptanması

Doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında en duyarlı ve en hızlı metod olan TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptoza giden hücrelerin görümlenmesini sağlamaktadır. Çalışmamızda apoptozun immünohistokimyasal metodla saptanması ve ölçülmesi için "In Situ Cell Death Detection, POD" kiti (Roche Molecular Biochemicals, Germany) kullanılmıştır. Deparafinizasyon sonrasında, kesitler ilk olarak stabilizasyonun sağlanması için "proteinase-K" (Roche) ile 60 °C'de inkübe edilmiş daha sonra endojen peroksidazın bloke edilmesi için "Blocking Solution" ile (metanol içinde %3'lük H₂O₂) oda ısısında 10 dakika, permeabilizasyonun sağlanması için "permeabilisation solution" (%0.1'lik sodyum sitrat-%0.1 Triton® x-100) içinde 4 °C'de 2 dakika bekletilmiştir. İşaretleme için kesitler TUNEL reaksiyon karışımı

reaksiyon karışımı (Fluorescein-dUTP) ilave edildikten sonra nemli ortamda, 37 ° C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sinyal dönüşümü ve analizin sağlanması için kesitler üzerine 50 mikrogram "Converter-POD" ilave edilerek nemli ortamda 30 dakika daha inkübe edilmiş ve substrat solüsyonu ile (DAB: Diaminobenzidin) peroksidaz aktivitesi görünür hale getirilmiştir. Daha sonra hematoksilin ile zıt boyama yapılarak ışık mikroskopunda incelemeye alınmıştır.

Apoptotik İndeksin (Aİ) Değerlendirilmesi

Her bir sıçana ait apoptotik indeks oranı, hazırlanan bir kesitteki rastgele odaklanan 10 ayrı seminifer tübülün değerlendirilmesi ile elde edilmiştir. Her bir tübüldeki apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle ortaya çıkan oranların ortalaması alınmış, bu oran 100 ile çarpılarak % Aİ değeri elde edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farklılığın saptanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır.

Bulgular

Radyasyon uygulanmayan kontrol grubundaki sıçanların seminifer tübüllerinde gözlenen spontan apoptoz ağırlıklı olarak spermatogonia ve spermatozoidlerde gözlenmiş ve ortalama Aİ oranı %1.8 olarak bulunmuştur. Yapılan tek yönlü varyans analizinde kontrol grubundaki sıçanlarda bulunan apoptotik indeks oranı diğer iki gruba göre istatistiksel anlamlı fark göstermektedir (p=0,05). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 2 Gy radyasyon alan çalışma gruplarında ortalama Aİ değerlerinde yaklaşık 20 kat bir artış gözlenmiştir. Ortalama Aİ değerleri yalnız 2 Gy radyasyon uygulanan birinci gruba ait sıçanların seminifer tübüllerinde %42, 2 Gy radyasyon ve amifostin uygulanan ikinci gruba ait seminifer tübüllerde ise %37 olarak bulunmuştur. Ancak "paired samples T test" kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmede amifostin uygulanmasının apoptotik yanıt üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Farklı gruplar arasında ve her bir sıçanın seminifer tübülleri içerisinde 10. haftada

gözlenen geç apoptozis; spermatogonia, mayotik olarak bölünen spermatozoid ve spermatozoidlerin tümünde gözlenmiş olup seminifer epitel siklusunun herhangi bir evresine özgü apoptozis açısından tutarlı bir ilişki saptanmamıştır (Resim-1A, 1B, 1C).

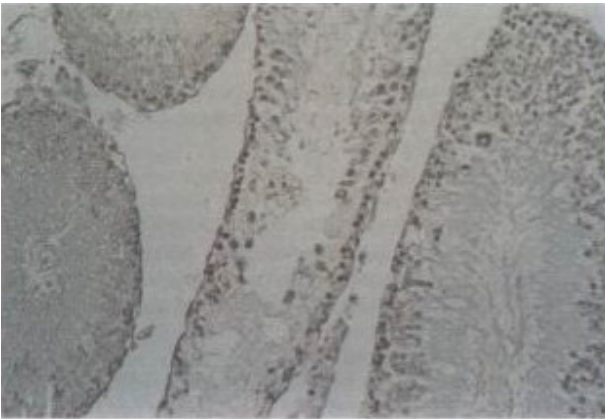
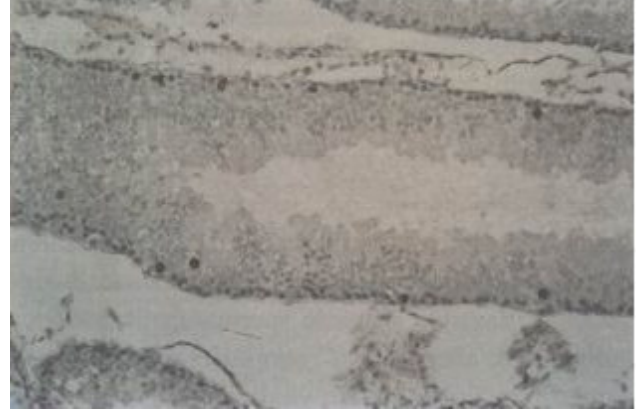
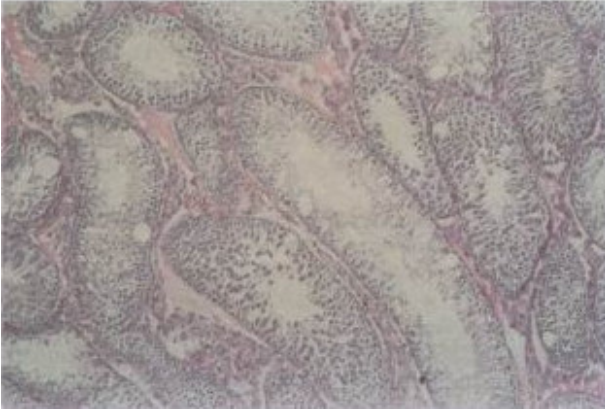
Tartışma

Radyoterapi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemi olmakla birlikte tümöral dokuya seçici olmadığından tümör komşuluğundaki sağlıklı dokulara da hasar vermekte, akut ve geç dönemde oluşan yan etkiler yaşam kalitesini etkilemektedir. Sağkalım sürelerinin giderek uzadığı kanser hastalarında ortaya çıkan bu yan etkileri önlemek için sitoprotektif ajanlar geliştirilmiştir.

Kromozomal mutajen olan radyasyonun fertilité üzerindeki etkileri bilinmektedir. Bu nedenle radyoterapi uygulanan ve uzun süre yaşayan genç erkek hastalarda üreme sisteminde oluşan yan etkiler ayrı bir önem taşımaktadır.

Bu çalışmada testis dokusunun seçilme nedeni testislerin düşük doz radyasyon uygulamalarına karşın oluşan hasarın saptanmasına olanak sağlayacak kadar radyoduyarlı bir doku olmasıdır. Bu özelliği nedeniyle amifostinin olası koruyucu etkinliğinin daha iyi gözlemlenebileceği düşünülmüştür. Deneysel olarak testislerin değerlendirilmesinde seminifer epitel siklusu kavramı kullanılmaktadır. Sıçanlarda bu süre yaklaşık beş haftadır. Çalışmamızda geç dönem yan etkilerin gözlenmesi bakımından en azından 2 seminifer epitel siklusunun atlatılmasından sonra sıçanların sakrifiye edilmesi düşünülmüş ve 10. haftada sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Doz olarak 2 Gy uygulamamızın nedeni ise bu dozun geç dönem yan etkilerin değerlendirilmesinde eşik tolarans dozu olarak bilinmesidir.¹⁸ Testiküler dokuda hem spontan hem de hasarlanmaya bağlı germ hücresi ölümünde esas mekanizma apoptotik hücre ölümüdür.^{19,20}

Çalışmamızda, amifostinin geç dönemde (10 hafta sonra) radyasyona bağlı germ hücresi apoptozu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. TUNEL tekniğiyle, radyasyon uygulanmayan kontrol



Resim 1. İki Gy radyasyon ve amifostin uygulanan gruba ait bir sıçanın seminifer tübülü enine kesidi. **A)** Hemotoksilen-eosin, x20; **B)** TUNEL, DAB x40. (Nükleer boyanmanın yoğun koyu kahverengi ve homojen olduğu hücrelerdir) **C)** Spontan apoptozun gözlemlendiği kontrol grubuna ait bir sıçanın seminifer tübülü enine kesidi TUNEL, DABx40.

grubuna ait sıçanlardaki ortalama Aİ değeri, 2 Gy radyasyon uygulanan çalışma gruplarına göre oldukça düşük bulunmuş (%1.8) ve bu oran spontan apoptozis oranı olarak yorumlanmıştır. İki Gy radyasyon uygulanan sıçanların seminifer tübüllerinden elde edilen Aİ oranları kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Radyasyona bağlı apoptoz sıçan seminifer epitel siklusunun belirli bir evresine özgül olmaksızın spermatogonia, mayotik olarak bölünen spermatozoid ve spermatozoid'lerin tümünde gözlenmiş olup, herhangi bir evreye özgül apoptoz yoğunluğu saptanmamıştır. Amifostin alan ve almayan gruplar karşılaştırıldığında amifostinin apoptoz yoğunluğunu seminifer epitelin özgül bir evresine çekmediği, diğer gruptan anlamlı bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır.

Testiküler germ hücrelerinde apoptotik yanıtın radyasyon ya da kemoterapötik ilaçlar ile indüksiyonunda saatler sonra maksimum seviyede izlendiğini gösteren çalışmalar olmasına rağmen geç dönemde incelendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda iyonizan radyasyonu takiben en

az bir seminifer epitel siklusu geçtiği halde (on hafta sonra) radyasyon hasarına bağlı apoptotik ölümler gözlemlenmemiş germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptotik yanıtın yalnız akut dönemde gerçekleşmediğini ortaya koymaktadır. Gözlemlenen bu geç apoptoz bazı germinal kök hücrelerinin radyasyon hasarından sonra hemen ölmeyip, bunun yerine hücre siklusuna devam ettiğini, potansiyel apoptozun aktivasyonundan önce DNA hasarının tamir edilmeye çalışıldığını ve biriken kromozomal anormallikler nedeniyle bir dizi farklı apoptoz mekanizmaları sonucunda hücrelerin ölümüyle sonuçlandığını ifade edebilir.

Dewey ve arkadaşları²¹ tarafından kromozomal aberasyonlar sonucunda klasik mitozaya bağlı apoptoz (MCA: Yalnız kromozomal aberasyonlara sahip bir hücrede bölünmeden sonra meydana gelen apoptozis) tanımlanmıştır. Geç apoptozda tetiği çeken mekanizmanın kromozomal aberasyonlar olduğu (MCA) ifade edilmiştir. Radford'un²² açıklama-ya çalıştığına benzer şekilde çalışmamızda da oldukça radyoduyarlı olan germ hücrelerinde iyonizan radyasyondan 10 hafta sonra gözlenen apoptotik

yanıtın kromozomal aberasyonlar ile tetiklenebileceğini akla getirmektedir. Bu görüş için henüz daha ileri araştırmalar yapılmadığından oldukça radyosensitif olan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptozis mekanizmalarının açığa kavuşmasını sağlamak için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Jahnukainen ve arkadaşlarının çalışmasında antrasiklinlerin toksik etkilerine karşı amifostinin koruyucu etkinliği apoptoza giden hücrelerin değerlendirilmesiyle kültürde spermatojenik hücreler kullanılarak araştırılmış,²³ seminifer epitelin özgül evrelerinde, doksorubisin ya da idarubisinin neden olduğu germ hücresi toksisitesine karşı bizim çalışmamızda olduğu gibi amifostinin koruyucu etkisinin bulunmadığı saptanmıştır. Amifostinin tek fraksiyon yüksek doz radyoterapiye karşı testis dokusu üzerindeki protektif etkisi Milas ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir.¹⁷ Ancak araştırmacılar takip eden çalışmalarında²⁴ düşük radyasyon dozları uyguladıklarında amifostinin koruyucu etkisinin azaldığını görmüşler, 2 Gy ve altındaki dozlarla fraksiyone radyoterapi ile birlikte uygulandığında ise amifostinin germ hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da amifostinin 2 Gy'de koruyucu etkisinin olmadığı izlenmiştir.

Çalışmamızda sıçan testisi germ hücrelerinde radyasyonun oluşturduğu apoptotik ölümlere karşı amifostinin koruyucu bir etkinlik göstermediği saptanmıştır. Ancak bunun daha ileri çalışmalarla doğrulanması gereklidir. Eğer radyoterapi sırasında germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptozu önleme yeteneğine sahip hücre koruyucu bir ajan kullanılabilirse radyasyona bağlı azospermi ve infertilite önlenabilir ve definitif radyoterapi alan genç erkek hastalarda yaşam kalitesi üzerinde olumlu bir etki sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992; 25: 241-50.
- Bartke A. Editorial: Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon? *Endocrinology* 1995 Jan; 136(1): 3-4.
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, Nieschlag E. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 25-33.
- Mori C, Nakamura N, Dix DJ, et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 1997; 208: 125-36.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: Gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-50.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis-An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: Biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 1993; 14: 133-51.
- Whyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142: 66-77.
- Hasegawa M, Wilson G, Russel LD, Meistrich ML. Radiation-induced cell death in the mouse testis: Relationship to apoptosis. *Radiat Res* 1998; 149(3): 316.
- Nakagawa S, Nakamura N, Fujioka M, Mori C. Spermatogenic cell apoptosis induced by mitomycin C in the mouse testis. *Toxicol. Appl Pharmacol* 1997; 147(2): 204-13.
- Sjoblom T, West A, Lahdetie J. Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin and diepoxybutane. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31 (2): 133-48.
- Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. *Archiv of Andrology* 2001; 46: 43-9.
- Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, et al. Enhancement of a spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by GnRH antagonist administration. *Endocrinology* 2000; 141: 37-49.
- Sinha Hikim AP, Rajavashisth TB, Sinha Hikim I, et al. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol. Reprod* 1997; 57: 1193-201.
- Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 1956; 99: 391-413.
- Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for renewal of spermatogonia. *Am J Anat* 1962; 111: 111-29.
- Milas L, Hunter N, Reid BO, Thames HD Jr. Protective effects of S-2(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid against radiation damage of normal tissues and a fibrosarcoma in a mice. *Cancer Res* 1982; 42: 1888-97.
- Rubin P, Constine LS, Williams JP. Late effects of cancer treatment: Radiation and drug toxicity. In: Perez CA, Brady LW, editors. *Principles and Practice of Radiation Oncology*. 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.155-9.
- Sinha Hikim AP, Rajavashisth TB, Sinha Hikim I, et al. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 1997; 57: 1193-201.
- Hasegawa M, Wilson G, Russell LD, Meistrich ML Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res* 1997; 147: 457-67.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33(4): 781-96.
- Radford IR, Murphy TK. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 65: 229-39.
- Jahnukainen K, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Soder O. Stage specific inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis and induction of apoptosis by anticyclines in cultured rat spermatogenic cells. *Biol Reprod* 2000; 63(2): 487-7.
- Meistrich M, Finch M, Hunter N, Milas L. Protection of spermatogonial survival and testicular function by WR-2721 against high and low doses of radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10(11): 2099-107.