

## اثر محافظتی اپی نفرین در تغییرات فرآیند اسپرمتوزنز در اثر تشعشعات گاما در موش صحرایی بالغ

جعفر آی<sup>\*۱</sup>، اسدا... ظریفکار<sup>۲</sup>، سعید خاتم‌ساز<sup>۳</sup>، حسین شهریاری<sup>۴</sup>

### خلاصه

**سابقه و هدف:** با توجه به اینکه انسان در معرض تشعشعات گاما ناشی از رادیوتراپی و پرتوهای X تشخیصی قرار می‌گیرد، بررسی اثرات تشعشعات گاما بر بافت‌های مختلف انسان ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق بررسی اثرات تشعشعات گاما بر فرآیند اسپرمتوزنز در موش صحرایی بالغ و نقش اپی نفرین به عنوان محافظت‌کننده است.

**مواد و روش‌ها:** در این بررسی تجربی دستگاه مولد اشعه‌ی گاما با شدت ۲۵ گری به کار گرفته شد و تعداد ۱۲۰ راس موش صحرایی نژاد Wistar به عنوان مدل آزمایشگاهی در ۴ گروه مساوی انتخاب گردیدند. ۱- گروه تیمار با اپی نفرین، ۲- گروه تیمار با سرم نمکی (کنترل)، ۳- گروه تیمار با اپی نفرین و تشعشعات گاما، ۴- گروه تیمار با سرم نمکی و تشعشعات گاما با شدت ۲۵ گری. تزریق اپی نفرین به مقدار sub lethal dose (1ml/kg) به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی شکم صورت پذیرفته است. تعداد ۶۰ راس موش صحرایی برای به دست آوردن Lethal dose (LD50) مورد آزمایش قرار گرفت و LD50 اپی نفرین به میزان ۲ ml/kg تعیین شد. در پایان پس از تشریح و بیرون آوردن بیضه‌ی حیوانات و عملیات مربوط به آماده‌سازی اسلاید و مطالعه‌ی آنها، تعداد سلول‌های اسپرمتوگونی، تعداد سلول‌های اسپرمتوسیت اولیه، تعداد سلول‌های اسپرمتاید، تعداد اسپرمتوزوئیدها و تعداد سلول‌های بینابینی و سلول‌های سرتولی مورد بررسی و شمارش قرار گرفت.

**نتایج:** یافته‌ها نشان داد که در گروه تیمار با اشعه‌ی گاما با شدت ۲۵ گری لوله‌های اسپرم‌ساز از هم فاصله گرفتند و همچنین تعداد سلول‌های اسپرمتوگونی و سلول‌های اسپرمتاید و اسپرم به صورت معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) کاهش یافت. تعداد سلول‌های اسپرمتوسیت اولیه و میزان ترشحات در لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تیمار با گاما در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** در پایان، گروه تیمار با اپی نفرین و تشعشعات گاما این عوارض را نشان نداد و عملکرد اپی نفرین به عنوان یک محافظت‌کننده به خوبی مشخص شد. به نظر می‌رسد اپی نفرین با کاهش جریان خون و ایجاد هیپوکسی، سلول‌ها و بافت‌ها را از اثرات زیان‌بار رادیکال‌های آزاد که تحت تاثیر تشعشعات گاما حاصل می‌شوند، حفظ می‌کند.

**واژگان کلیدی:** اسپرمتوزنز، تشعشعات گاما، اپی نفرین، موش صحرایی

- ۱- دانشیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی فسا
- ۲- دانشیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
- ۳- استادیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کازرون
- ۴- مربی گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کازرون

\* نویسنده مسؤل: جعفر آی

آدرس: فسا، دانشکده علوم پزشکی فسا، بخش آناتومی

پست الکترونیک: jafar\_ay2000@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۷ ۱۱۸ ۴۷۶۳

دورنویس: ۰۷۳۱ ۲۲۲ ۷۰۹۱

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۵

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۶/۲/۸

### مقدمه

غیرمستقیم هستند. این پرتوها در حین عبور از ماده‌ی جاذب، انرژی جنبشی خود را از دست داده و تولید ذرات باردار می‌کنند [۲]. تشعشعات گاما به علت تولید رادیکال‌های آزاد می‌توانند یک اتصال شیمیایی را بشکنند و زنجیره‌ای از وقایع را که تغییرات

انسان هر روز در معرض برخورد با میدان‌ها و تشعشعات الکترومغناطیس و گاهی تشعشعات گاما قرار می‌گیرد [۱]. تشعشع- های الکترومغناطیس از جمله اشعه‌ی گاما پرتوهای یونیزان

### مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی انجام شد و حیوانات مورد آزمایش ۱۲۰ راس، موش‌های صحرایی نژاد Wistar با وزن ۲۲۰-۲۰۰ بودند که از مرکز پرورش حیوانات دانشکده پزشکی شیراز تهیه گردیدند. در شروع انجام آزمایشات سن متوسط موش‌ها ۲/۵-۲ ماه بود. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $25 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. آب آشامیدنی حیوانات از آب لوله‌کشی و تغذیه آنها از خوراک آماده‌ی مخصوص موش‌های صحرایی بود. در بررسی حاضر موش صحرایی به ۴ گروه مساوی به صورت تصادفی به شرح زیر تقسیم شدند:

- گروه اول، گروه تیمار با اپی‌نفرین (Epi): در این گروه حیوانات مقدار  $1 \text{ mL/kg}$  اپی‌نفرین (تهیه شده از شرکت داروپخش) به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی شکم دریافت می‌کردند.

- گروه دوم، گروه تیمار با سرم نمکی (Control): گروه فوق مقدار  $1 \text{ mL/kg}$  سرم نمکی به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی شکم دریافت می‌نمودند.

- گروه سوم، گروه تیمار با اپی‌نفرین و اشعه گاما: (Epi + $\gamma$ ): در این گروه ابتدا به میزان  $1 \text{ mL/kg}$  اپی‌نفرین به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی شکم تزریق می‌شد و سپس بلافاصله موش‌ها تحت تاثیر تشعشعات گاما با شدت ۲۵ گری قرار می‌گرفتند.

- گروه چهارم، گروه تیمار با سرم نمکی و اشعه‌ی گاما (S + $\gamma$ ): در این گروه ابتدا به میزان  $1 \text{ mL/kg}$  سرم نمکی به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی شکم تزریق شده و بلافاصله موش‌ها تحت تاثیر تشعشعات گاما با شدت ۲۵ گری قرار می‌گرفتند. در ضمن تعداد ۶۰ راس موش صحرایی نیز برای به دست آوردن LD 50 اپی‌نفرین مورد استفاده قرار گرفت و بعد از به دست آوردن LD 50 آزمایشات مورد نظر با دوز Sub lethal انجام گرفت، LD 50 به دست آمده  $2 \text{ mL/kg}$  بود و Sub Lethal dose مورد استفاده  $1 \text{ mL/kg}$  در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که LD 50 اپی‌نفرین دوزی بود که در آن دوز، تعداد نصف حیوانات مورد آزمایش تلف شدند. در این تحقیق از دستگاه تولید اشعه‌ی گاما مدل فونیکس، ساخت شرکت سروترونیک موجود در بخش رادیوتراپی بیمارستان نمازی شیراز استفاده شد. چشمه‌ی اشعه‌ی گاما موجود در این دستگاه ایزوتوپ کبالت ۶۰ می‌باشد و حیوانات در گروه‌های تیمار با اشعه به پشت خوابانیده می‌شدند و ناحیه‌ی اینگوینال آنها در معرض اشعه قرار می‌گرفت. پس از گذشت ۵۰ روز از شروع آزمایش حیوانات به وسیله‌ی کلروفورم

زیستی از جمله جهش و آسیب در غشاها را شروع نماید [۳]. اکسیژن می‌تواند با رادیکال‌های آزاد ترکیب شده و در نتیجه یک پراکسید آلی و غیرقابل برگشت به وجود می‌آید که باعث تثبیت آسیب‌ها می‌شود، بدون حضور اکسیژن این واکنش روی نمی‌دهد و بسیاری از مولکول‌های یونیزه شده هدف، می‌توانند خودشان را ترمیم و قابلیت عمل طبیعی خود را نیز بازیابند [۴]. در بررسی نوروبلاست‌های تابش دیده، یک دوره‌ی بحرانی بین مراحل نهایی و ماقبل نهایی پروفاز مشاهده می‌شود. اگر یاخته‌ای پس از پروفاز تحت تابش قرار بگیرد، تقسیم میتوزی ادامه می‌یابد ولی اگر قبل از این مرحله صورت بگیرد تقسیم میتوزی متوقف شده یا یاخته به وهله‌ی اوایل پروفاز یا ایترفاز برمی‌گردد [۵]. در بیشتر یاخته‌هایی که در زمان تابش‌دهی در حال تقسیم هستند، ممکن است تقسیم یاخته در مرحله  $G_2$  متوقف شود. ساخت DNA نیز ممکن است به طور ناقص یا کامل در یاخته‌ها در مرحله‌ی S متوقف گردد. از آنجایی که فرآیند اسپرماتوزونز فرآیندی است که تقسیم میتوز به وفور در آن دیده می‌شود، تابش گاما می‌تواند تاثیرات بسزایی در آن داشته باشد [۵]. مطالعات اخیر نیز نشان می‌دهد که تشعشعات می‌تواند بر میزان هورمون‌های جنسی و تعداد اسپرم‌ها اثر داشته باشد [۶] و همچنین می‌تواند باعث کاهش تعداد سلول‌های جنسی در موش‌ها شوند [۷]. داروهایی که ادعا می‌شوند واکنش سلول‌ها به پرتوها را تعدیل می‌کنند، محافظت‌کننده نامیده می‌شوند. این داروها بر حساسیت سلول‌ها نسبت به اشعه، اثر نمی‌گذارند، بلکه از کل حیوان محافظت به عمل می‌آورند [۸]. از دهه‌ی ۱۹۷۰ به بعد تحقیقات زیادی برای یافتن مواد و محافظت‌کننده‌هایی که بتواند از بافت‌های طبیعی محافظت بنماید بدون اینکه اثر مشابهی بر سلول‌های تومور داشته باشد آغاز گردید و از آن زمان تا امروز مواد شیمیایی مختلفی معرفی شدند که یکی از آنها اپی‌نفرین است [۹] که مکانیسم عمل آن کاهش قطر رگ‌های خونی و کاهش اکسیژن در اعضای حساس می‌باشد [۸]. از طرفی برخی محققین اظهار داشته‌اند که اثرات محافظتی اپی‌نفرین به وسیله‌ی کاهش اکسیژن و کاهش قطر رگ‌های خونی نمی‌باشد [۱۰]. لذا با توجه به این مطالب و مضرات احتمالی اشعه‌ی گاما در رادیوتراپی بر آن شدیم تا تاثیر تشعشعات گاما با شدت ۲۵ گری را بر بافت بیضه‌ی که بافتی پرخون است به عنوان میزان شدتی که بر فرآیند اسپرماتوزونز مورد بررسی قرار نگرفته است مورد بررسی قرار داده و نقش اپی‌نفرین را به عنوان یک محافظت‌کننده مورد مطالعه قرار دهیم.

بیهوش شده و سپس حیوان را به پشت بر روی تشتک تشریح خوابانده و دست‌ها و پاها را بر روی آن سنجاق کرده، سپس بیضه و اپیدیدیم را از اسکروتوم خارج کرده و بیضه را در محلول تثبیت‌کننده بوئن قرار دادیم و پس از انجام عملیات آماده‌سازی بافت (فیکس کردن، بلوک کردن، برش، رنگ‌آمیزی با همتوکسیلین و اتوزین)، مقاطع بافتی به صورت مقاطع پشت سر هم (Serial section) به فاصله‌ی ۴۰ میکرومتر و به ضخامت ۵ میکرومتر جهت مطالعات بافت‌شناسی تهیه شده و اپی‌دیدیم را در ۱ سی‌سی محلول فرمالین ۱۰ درصد کوبیده و با استفاده از روش شمارش گلبول سفید تعداد اسپرم‌ها را شمارش کردیم. سپس با استفاده از میکروسکوپ Olympus/3H-2 و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ سلول‌های موجود در لوله‌های سمینی‌فر را مورد مطالعه و شمارش قراردادیم و به منظور تهیه فتومیکروگراف‌ها از میکروسکوپ ذکرشده و فیلم فوجی ASA100 استفاده نمودیم. لازم به ذکر این که چون لوله‌های سمینی‌فر بسته به مرحله‌ای که در آن قرار دارند ممکن است دارای جمعیت سلولی متفاوتی باشند، لذا سعی شده است تمامی مقاطع از لوله‌های سمینی‌فر 7 stage انتخاب گردند. در این مرحله اپی‌تلیوم لوله‌ای سمینی‌فر حاوی اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، اسپرم و سلول‌های سرتولی می‌باشد [۱۱]. همچنین جهت آنالیز آماری داده‌های به دست آمده در تحقیق، از روش ANOVA یک‌طرفه با ( $p < 0.05$ ) استفاده شد.

### نتایج

نتایج به دست آمده از این تحقیق در دو بخش جداگانه مطالعات بافت‌شناختی و مطالعات آماری طبقه‌بندی شده است. مطالعات آماری انجام شده بر روی رده‌های مختلف سلولی در اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های کنترل و آزمایش در جدول شماره ۱ آورده شده است. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف آزمایشی و کنترل نشان داد که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه گاما و سرم نمکی  $30/11 \pm 0/21$  و در گروه کنترل  $43/91 \pm 0/19$  بود که کاهش معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در سایر گروه‌ها و گروه اپی‌نفرین و گاما  $43/71 \pm 0/41$  نسبت به گروه کنترل تغییر

جدول ۱- میانگین تعداد سلول‌های تشکیل‌دهنده‌ی اپی‌تلیوم سمینی‌فر در گروه کنترل و گروه‌های مختلف آزمایشی

Sertoli cells	Interstitial cells	Spermatozoid	Spermatid	Spermatocyte I	Spermatogonia	N	گروه
$32/78 \pm 1/7$	$13/11 \pm 0/12$	$253 \pm 1/4$	$277 \pm 13/51$	$82/2 \pm 0/11$	$43/91 \pm 0/19$	30	Control
$3/24 \pm 31/24^*$	$12/94 \pm 0/3^*$	$202 \pm 1/6^*$	$211 \pm 14/75^*$	$97/4 \pm 0/14^*$	$30/11 \pm 0/21^*$	30	S+γ
$32/11 \pm 4/28$	$13/7 \pm 0/13$	$245 \pm 1/2$	$263 \pm 11/21$	$83/9 \pm 0/16$	$43/71 \pm 0/41$	30	EPI + γ
$30/15 \pm 0/22$	$13/8 \pm 0/15$	$251 \pm 1/7$	$261 \pm 21/5$	$84/7 \pm 0/13$	$43/72 \pm 0/1$	30	EPI

ارقام ارایه شده در جدول میانگین تعداد سلول‌ها در ۱۲۰ لوله اسپرم‌ساز  $\pm$  SD می‌باشد. \* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن ( $p < 0.05$ ) با گروه کنترل است.

## بحث

تبدیل سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه به رده‌ی بعدی جلوگیری می‌کند [۱۶]. این امر در پایان باعث می‌شود که تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه افزایش یابد. همچنین نتایج حاصل از این بررسی در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل نشان‌دهنده‌ی کاهش تعداد اسپرم‌ها در گروه تحت تاثیر اشعه‌ی گاما و سرم نمکی بوده، بنابراین در این مورد نیز می‌توان گفت توقف سیر تکاملی اپی‌تلیوم زایای تحت تاثیر تشعشعات گاما و در پایان منجر به کاهش تعداد اسپرم‌های بالغ در لوله‌های سمینی‌فر می‌گردد. تزریق اپی‌نفرین به حیوانات تحت تاثیر اشعه‌ی گاما از پیدایش اثرات فوق بر اساس مکانیسم ایجاد ایسکمی و پایین آمدن مقدار اکسیژن و در نتیجه کم شدن مقدار رادیکال آزاد جلوگیری نموده و در این مورد نیز اثر مهارى اپی‌نفرین را نشان می‌دهد [۸]. در خصوص سلول‌های لایدیک و سرتولی اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد بین گروه کنترل و تجربی مشاهده نشد، این مساله از این نظر که نشان داده شده، پرتوها در سلول‌هایی که قابلیت تقسیم ندارند بدون تاثیر می‌باشد دارای اهمیت می‌باشد [۱۶، ۱۷]. با وجود این تجمع ترشحات زیاد در لومن لوله‌های سمینی‌فر بیانگر افزایش فعالیت سلول‌های سرتولی می‌باشد، چون سلول‌های سرتولی مسوول ترشحات لوله‌های سمینی‌فر می‌باشد و به همین دلیل نیز در گروه تحت تاثیر اشعه‌ی گاما، لوله‌ها مملو از ترشحات موکوس بودند [۱۳].

## نتیجه‌گیری

تشعشعات گاما باعث ایجاد آسیب در اپی‌تلیوم زایای بافت بیضه می‌شود و اپی‌نفرین می‌تواند از اثرات زیان‌بار تشعشعات گاما در روند اسپرماتوژنز جلوگیری نماید.

بررسی بافت‌شناختی بافت بیضه، پیدایش بی‌نظمی در اپی‌تلیوم زایای بافت بیضه در موش‌های صحرایی تحت تاثیر تشعشعات گاما و همچنین فواصل زیاد بین لوله‌ها را نشان داد. این امر پیدایش تخریب سلول‌ها و حالت ادم در بیضه را مطرح می‌سازد که یکی از نشانه‌های آسیب بافتی به شمار می‌رود [۱۲، ۱۳]. نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی سلول‌های اسپرماتوگونی نشان‌دهنده‌ی کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تحت تاثیر تشعشعات گاما می‌باشد. با توجه به این که تحقیقات قبلی نشان داده است که سلول‌های قابل تقسیم نسبت به پرتوها حساس‌ترند [۵] و با عنایت به این که مکانیسم ذکر شده برای میدان‌ها و پرتوها، مشابه ذکر گردیده [۲]، بنابراین می‌توان گفت که اثر مخرب تشعشعات گاما با ایجاد توقف رشد و انهدام سلول‌های اسپرماتوگونی موجبات کاهش تعداد سلول‌ها را فراهم آورده است [۱۴]. از طرف دیگر تزریق اپی‌نفرین هم‌زمان با قرارگیری حیوان در معرض تشعشعات گاما مانع از پیدایش اثرات سوء تشعشعات گاما شده و از کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی جلوگیری می‌نماید. در این مورد می‌توان گفت که اپی‌نفرین با ایجاد تنگی عروق باعث کاهش جریان خون شده و ایسکمی ایجاد می‌کند [۱۵]. در نتیجه میزان اکسیژن موجود در بافت‌ها را کاهش می‌دهد و کاهش اکسیژن از تشکیل رادیکال آزاد جلوگیری کرده و بدین ترتیب باعث کاهش اثرات مضر تشعشعات گاما بر سلول‌های اسپرماتوگونی می‌گردد [۸]. همچنین قرارگیری حیوان در معرض تشعشعات گاما با شدت ۲۵ گری باعث افزایش تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه می‌گردد. در مورد توجیه این پدیده می‌توان گفت که تشعشعات گاما با اثرگذاری بر روی DNA سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه باعث توقف سیر تکاملی سلول‌ها شده و از

## References:

- [1] Alexander D. Charlesby A. Energy transfer in macromolecules exposed to ionizing Radiation. *Nature* 1954; 173: 578-579.
- [2] Portess DI. Bauer G. Hill MA. O'Neill P. Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis. *Cancer Res* 2007; 67: 1246-1253.
- [3] Benkhaled L. Barrios L. Mestres M. Caballin MR. Ribas M. Barquinero JF. Analysis of gamma-rays induced chromosome aberrations: a fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 869-875.
- [4] Puck TT. Marcus PI. Action of X-Rays on mammalian Cells. *J Exp Med* 1956; 103: 653-666.
- [5] Subbotina TI. Tereshkina OV. Khadartsev AA. Yashin AA. Effect of low-intensity extremely high frequency radiation on reproductive function in wistar rats. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142: 189-190.
- [6] Ozguner M. Koyu A. Cesur G. Ural M. Ozguner F. Gokcimen A. et al. Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J* 2005; 26: 405-410.

- [7] Lee JS. Ahn SS. Jung KC. Kim YW. Lee SK. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian J Androl* 2004; 6: 29-34.
- [8] Pospisil M. Hofer M. Vacek A. Netikova J. Pipalova I. Viklicka S. Noradrenaline reduces cardiovascular effects of the combined dipyridamole and AMP administration but preserves radioprotective effects of these drugs on hematopoiesis in mice. *Physiol Res* 1993; 42: 333-340.
- [۹] مزدرائی حسین، رادیوبیولوژی برای رادیولوژیست ها. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۶۹.
- [10] van der Meer C. van Bekkum DW. The Mechanism of Radiation Protection by Histamine and Other Biological Amines. *International Journal of Radiation Biology* 1970; 1: 5-23.
- [11] Johnson MH. Everitt BJ. Essential Reproduction, Blackwell: Scientific Publication: 1996.
- [12] Ozguner M. Koyu A. Cesur G. Ural M. Ozguner F. Gokcimen A. Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J* 2005; 26: 405-410.
- [13] Porter KL. Shetty G. Meistrich ML. Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinology* 2006; 147: 1297-1305.
- [14] Kashiwabara S. Kashimoto N. Sanoh S. Uesaka T. Katoh O. Watanabe H. Damage of the mouse testis by tritiated water and 137Cs-gamma-rays. *Hiroshima J Med Sci* 2003; 52: 53-58.
- [15] Kaczmarczyk-Sedlak I. Cegiela U. Nowinska B. Pytlik M. Effects of catecholamines on blood pressure in the femoral bone marrow cavity in ovariectomized rats. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 908-919.
- [16] Casaret G. Cellular Basis and Aetiology of late somatic Effects of ionizing Radiation. New York: Academic: 1963.
- [17] Sawada H. Esaki M. Electron microscopic observation of 137Cs-irradiated rat testis: production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *J Electron Microscop (Tokyo)* 2003; 52: 391-397.