Original Article

Buserelin Inhibits Apoptosis in Male Germ Cells Induced by Busulfan in Mouse Testis

Mohammad Ghasemi F., Ph.D.*, Bahadori M.H., Ph.D., Faghani M, Ph.D., Nasiri E, Ph.D., Soleimani Rad J ,Ph.D

** P.O.Box:3477, Anatomy Department, Faculty of Medicine, Gilan university Complexes, Tehran-Rasht Road, Rasht, Iran*

Archive of SID

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the effect of buserelin on apoptosis of male germ cells induced by busulfan in adult male mice

Materials and Methods: Male adult NMRI mice were divided into four group of eight each. Group 1 (control) administered PBS for 21 days subcutaneously, group 2 given 0.4µg buserelin for 21 days subcutaneously, group 3 given single dose of 30 mg/kg busulfan intraperitoneally and group 4 given both busulfan and buserelin for 21 days. The animals were sacrificed and their testes were dissected 35 days after the treatment. Evaluations were made by determining Johnson's score and apoptosis were assayed by terminal- deoxynucleotidyl- transferase-mediated dutp nick end labeling (TUNEL). Statistical analyses were performed using ANOVA test.

Results: Recovery status and Johnson's score in group 4were significantly higher than those of busulfan treated group 7.71±0.69 VS 4.46±0.56 ($p< 0.001$). Apoptotic cells number cells were significantly more numerous in busulfan treated group than those of control 23.28 ± 7.10 VS 3.54 ± 1.02 ($p<0.001$). While buserelin substantially reduced germ cell apoptosis in fourth group 10.50±2.91 in comparison with third group 23.28 ±7.10, ($p<0.001$).

Conclusion: Administration of buserelin after testicular damage by busulfan enhances the regeneration of spermatogenesis in mouse through inhibition of apoptosis in germ cells.

Key words: Testis, Spermatogenesis, Apoptosis, Buserelin

www.SID.ir

مقاله تحقیقی

اثر مهاری بوسرلین بر آپوپتوز سلول‌های زایای نر القا شده با بوسولفان در بیضه موش

فهیمه محمد قاسمی .Ph.D *، محمد هادی بهادری.Ph.D** ، معصومه فغانی.Ph.D*، ابراهیم نصیری .Ph.D **
جعفر سلیمانی راد .Ph.D ***

* مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
** آزمایشگاه جنین شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
*** مرکز تحقیقات کاربردی- دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: خردادماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی اثر بوسرلین بر مهار آپوپتوز سلول‌های زایای تحت درمان با بوسولفان در موش نر بالغ

مواد و روش‌ها : موش‌های نر بالغ NMRI به چهار گروه هشت تایی تقسیم شدند. گروه کنترل به مدت ۲۱ روز به‌صورت زیر جلدی فسفات بافر سالین دریافت کرد. گروه دوم ، روزانه ۰/٤ میکروگرم بوسرلین به مدت ۲۱روز به‌صورت زیر جلدی دریافت کرد. گروه سوم ، یک دوز۳۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بوسولفان به‌صورت داخل صفاقی دریافت کرد و گروه چهارم یک دوز۳۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بوسولفان و روزانه ۰/٤ میکروگرم بوسرلین به‌مدت ۲۱ روز بعد دریافت نمود. ۳۵ روز پس از شروع درمان همه حیوانات کشته شده و بیضه آن‌ها تشریح شد. ارزیابی‌های اسپرم زایی، از طریق مشخص نمودن جدول جانسون و آپوپتوز از طریق روش تانل (TUNEL: TdT in situ dUTP nick end labeling) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با آزمون ANOVA انجام شد.

یافته‌ها: وضعیت بهبودی اسپرم‌زایی و جدول جانسون در گروه ٤ به‌صورت معنی‌دار بالاتر از گروه ۳ بود (۰/٦۹ ± ۷/۷۱ در مقابل ۰/٥٦ ± ٤/٤٦). تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه تحت درمان با بوسولفان به‌صورت معنی‌دار بالاتراز کنترل (۷/۱۰ ±۲۳/۲۸ در مقابل ۱/۰۲ ± ۳/٥٤) بود (p< ۰/۰۰۱)؛ در حالی‌که بوسرلین به‌صورت معنی‌دار آپوپتوز سلول‌های زایا را در بیضه تحت درمان با بوسولفان (۲/۹۱ ±۱۰/٥۰)در مقایسه با گروه سوم (۷/۱ ±۲۳/۲۸) کاهش داد (p< ۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: تجویز بوسرلین پس از آسیب بیضه با بوسولفان در موش، باعث ترمیم اسپرم‌زایی ، از طریق کاهش میزان آپوپتوز سلول‌های زایا می‌شود.

کلید واژه‌ها: بیضه، اسپرم‌زایی، آپوپتوز، بوسرلین

آدرس مکاتبه: ایران، رشت، کیلومتر ۱۰ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی گیلان، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، صندوق پستی ۳٤۷۷ E-mail:parsahistolab@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

داروهای شیمی‌درمانی که برای مداوای سرطان‌ها به‌کار می‌روند بر سلول‌های با قدرت تقسیم بالا اثر بیشتری می‌گذارند و با توجه به این که سلول‌های زایا در بیضه نیز از قدرت تقسیم بالایی برخوردارند، بنابراین مصرف این داروها می‌تواند باعث کاهش شدید تعداد اسپرم در انسان یا حیوانات آزمایشگاهی شود. بنابراین استفاده از شیمی درمانی به‌ویژه در بیماران جوان که در سن باروری هستند، مسئله مهمی است چرا که می‌تواند با عارضه ناباروری یا کاهش باروری همراه باشد. به‌همین دلیل هرگونه تلاش برای حفظ باروری یا برگشت باروری در این بیماران بسیار مهم تلقی می‌شود [۱ و۲]. در سال ۱۹۸۱، گلد (Glode) و همکارانش پیشنهاد نمودند که مهار تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی و در نتیجه مهار تمایز اسپرماتوگونی‌ها طی شیمی‌درمانی، ممکن است باعث محافظت سلول‌های زایا و در نتیجه حفظ قدرت باروری بیماران شود. او پیشنهاد کرد هر عاملی که بتواند باعث کاهش ترشح FSH (Follicle stimulating hormone) و LH (Luteinizing hormone) شود و بتواند محور هیپوفیزی-هیپوتالاموس -گنادی را مهار کند احتمالاً می‌تواند باعث مهار تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی طی شیمی‌درمانی شود Glod و همکارانش ثابت نمودند که درمان با آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادو تروپین GnRH: Gonadotropin releasing (hormone) قبل و طی مصرف سیکلوفسفاماید، باعث حفظ پدیده اسپرم‌زایی در موش می‌شود [۳]. هر چند که برخلاف مطالعه Glode در یک مطالعه مشابه که روی موش تحت درمان با سیکلوفسفاماید انجام شد، استفاده از آنالوگ GnRH برای حفظ اسپرم‌زایی طی شیمی درمانی موثر واقع نشد [٤]. در سال ۱۹۹۷ میستریچ ، (Meistrich) و همکارانش نشان دادند که درمان با آنالوگ GnRH می‌تواند باعث بهبودی اسپرم‌زایی در رت‌های تحت درمان با اشعه شود [٥]. بعدها مطالعات متعددی در این زمینه انجام گرفت و نشان داده شد که مصرف برخی داروهای GnRH پس از تخریب شدید سلول‌های زایا به‌دنبال عوامل گنادو توکسیک مختلف مانند هگزاندیون [٦]. پروکاربازین [۷]. اشعه درمانی [۱۰– ۸]. ایندنوپریدین [۱۱]. گرمای مزمن [۱۲] دی برومو کلرو پروپان [۱۳]، سیکلوفسفاماید [١٤] و بوسولفان [۱۵] می‌تواند باعث حفظ یا بر قراری اسپرم‌زایی در لوله‌های سمینیفروس شود.

این که آنالوگ‌هایGnRH با چه عاملی باعث بهبودی یا حفظ اسپرم‌زایی به‌دنبال شیمی‌درمانی یا حین انجام آن می‌شوند، به‌طور دقیق مشخص نیست، شاید یکی از آن مکانیسم‌ها کاهش دادن میزان آپوپتوز سلول‌های زایا باشد [١٦]. آپوپتوز که نوعی مرگ سلولی برنامه ریزی شده است، می‌تواند در تمام سلول‌های بدن و از جمله سلول‌های زایای بیضه و در مراحل مختلف زندگی رخ دهد [۱۷].کنترل پدیده آپوپتوز برای برقراری اسپرماتوژنز طبیعی در بزرگسالان بسیار مهم است [۱۷]. بیضه‌ها نسبت به سموم محیطی که منجر به آسیب سلولی می‌شوند حساس هستند. آپوپتوز سلول‌های زایا ممکن است طی استرس‌های غیر فیزیولوژیک مانند دیابت، ایسکمی، هیپرترمی، اشعه‌درمانی و برخی داروها افزایش یابد [۱۸]. بوسولفان یکی از داروهای آلکیله کننده DNA بوده و برای درمان لوسمی میلوژنیک مزمن و سرطان تخمدان استفاده می‌شود [۱۹]. مصرف بوسولفان پس از یک یا دو تزریق داخل صفاقی منجر به از بین رفتن تعداد زیادی سلول‌های اسپرماتوگونی می‌شود. بنابراین در حیوانات آزمایشگاهی برای پیوند سلول‌های زایا، در بیضه گیرنده استفاده می‌شود [۲۰]. با استفاده از مطالعات متنوع ایمونوهیستوشیمی ، فلوسایتومتری و میکروسکوپ الکترونی نشان داده شده است که یکی از مکانیسم‌های اثر بوسولفان بر از بین بردن سلول‌های زایا و اسپرماتوگونی‌ها، القای آپوپتوز است [۱۹ و۲۱].

بوسرلین (Buserelin)، یکی از داروهای آنالوگ GnRH است

Archive of SID

www.SID.ir

و مانند سایر آنالوگ‌های GnRH می‌تواند به مرور باعث مهار ترشح گنادو تروپین‌ها شود. به عبارت دیگر تزریق آنالوگ‌های GnRH، نه تنها باعث کاهش گیرنده‌های GnRH هیپوفیز می‌شود بلکه ساختار مولکولی گنادو تروپین‌ها را نیز تغییر می‌دهد [۲۲]. بوسرلین برای درمان سرطان پروستات، پستان و لیو میومای رحمی و کریپتور کیدیسم و همچنین روش‌های کمک باروری کاربرد دارد [۲۲ و۲۳].براساس مطالعات محققان حاضر در ارتباط با تأثیر بوسرلین یا مکانیسم آثر آن بر آپوپتوز سلول‌های زایا به‌دنبال شیمی درمانی گزارشی در دسترس نیست. هدف از این تحقیق بررسی اثر بوسرلین بر مهار آپوپتوز سلول‌های زایای تحت درمان با بوسولفان در موش نر بالغ است.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در مطالعه حاضر از ۳۲ موش نر بالغ ۸ تا ۱۰ هفته نژاد NMRI استفاده شد. حیوانات از موسسه رازی (کرج- ایران) خریداری و برای تطابق با محیط ۲ هفته در قفس‌های خود با دسترسی آزاد به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد نگهداری شدند.

گروه‌های آزمایش

پس از آن حیوانات به ٤ گروه (هر گروه ۸ سر موش) تقسیم شدند.: گروه اول، موش‌های کنترل، به‌مدت ۲۱ روز روزانه ۰/۲ میلی‌لیتر PBS به‌صورت زیر پوستی دریافت کردند. گروه دوم، موش‌های تحت درمان با هورمون که به‌مدت ۲۱ روز،روزانه ۰/۲ میلی لیتر PBS حاوی ۰/٤ میکروگرم بوسرلین (Sigma, USA) به‌صورت زیر پوستی دریافت نمودند. گروه سوم، موش‌های تحت شیمی‌درمانی ،فقط یک تک دوز ۳۰mg/kg بوسولفان (Sigma, USA) به‌صورت داخل صفاتی دریافت کردند. گروه چهارم، موش‌های تحت درمان ترکیبی که مانند گروه دوم، پس از تزریق ۳۰ mg/kg بوسولفان، به‌مدت ۲۱ روز روزانه ۰/ ۲ میلی لیتر PBS حاوی ۰/٤ میکروگرم بوسرلین به‌صورت زیر پوستی دریافت کردند. دو هفته پس از قطع درمان، همه حیوانات تشریح شدند و بیضه آن‌ها از حفره پریتونئال خارج شد. بیضه راست هر حیوان در محلول بافری فرمالدئید ۱۰ درصد ، برای مدت ٤۸ ساعت در دمای اتاق غوطه ور شده و سپس برای مطالعه با میکروسکوپ نوری پاساژ داده شد. برای به حداکثر رساندن تعداد برش‌های مناسب لوله‌های سمینیفروس در مقطع عرضی، بیضه‌ها در جهت طولی در پارافین قالب‌گیری شدند و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, Germany) مقاطعی با ضخامت سه میکرون تهیه شد. از هر بیضه ٤ اسلاید انتخاب و به طریق ایمونوهیستوشیمی TUNEL رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus) بررسی شد.

ارزیابی کیفیت اسپرماتوژنز

برای مطالعه کیفیت یا بلوغ اسپرم‌زایی در داخل لوله‌ها از روش جانسون استفاده شد. بدین منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله سمینیفروس در هر حیوان در مراحل مختلف اسپرماتوژنز استفاده شد. به هر لوله بر اساس جدول، نمرات صفر تا ده، تعلق گرفت، همچین درصد لوله‌هایی که دارای بلوغ بالا بودند (نمرات ۱۰-۸) نیز در هر گروه محاسبه و سپس نتایج بین گروه‌ها با هم مقایسه شدند [۲٤].

ارزیابی سلول‌های آپوپتوتیک

بدین منظور از روش TUNEL و با کمک کیت تشخیصی (Roche)استفاده شد.کلیه مواد و محلول‌ها از کمپانی (Roche) تهیه شد. ابتدا برش‌های با ضخامت ۳ میکرون تهیه شد و پس از آن مرحله پارافین‌زدایی با کمک گزیلول در دو مرحله

Archive of SID
www.SID.ir

انجام و بافت در اتانول با درجات نزولی قرار گرفت. پس از انکوبه بافت با پراکسیداز، با کمک پروتئیناز k، پروتئین‌های اضافی هسته برداشته شد. سپس نمونه با محلول تانل برای مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور، انکوبه شد. پس از شستشو و خشک نمودن، اسلایدها با دی آمینو بنزیدین انکوبه شدند. در نهایت از هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی زمینه استفاده شد و نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند. سلولهایی که هسته آن‌ها به رنگ قهوه‌ای مشاهده شد، سلول‌های آپوپتوتیک، و سلول‌هایی که هسته آن‌ها به رنگ بنفش مشاهده شد، غیر آپوپتوتیک در نظر گرفته شدند. تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در حداقل ۲۰ لوله سمینیفروس در مراحل ۷ و ۸ اسپرم‌زایی، در هر حیوان شمارش و سپس بر تعداد کل سلول‌های زایای آپوپتوتیک و غیر آپوپتوتیک هرلوله تقسیم و در نهایت درعدد صد، ضرب و به‌صورت در صد بیان شد.

تحلیل آماری

نتایج به‌دست آمده در نمونه‌های مورد مطالعه با یکدیگر و با کنترل مقایسه شدند. بلوغ اسپرم‌زایی و درصد سلول‌های آپوپتوتیک با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون آماری ANOVA تجزیه و تحلیل شدند و $p<0.05$ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

کیفیت اسپرماتوژنز

در بررسی بافت‌شناسی گروه کنترل، اسپرم‌زایی فعال در لوله‌های سمینیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در داخل لوله‌ها رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف تقسیم به همراه سلول‌های سرتولی دیده شد. در این لوله‌ها اپی‌تلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود و سرحد مجاری لوله‌ها منظم بود و مجرای داخلی لوله‌ها کاملاً باز و مشخص بود. در بافت بینابینی، سلول‌های لیدیگ با هسته‌های گرد یوکروماتین خود، اغلب به‌صورت گروهی به چشم می‌خوردند (شکل a- ۱). ۰/۷٤±٦۲/ ۹۹ درصد لوله‌ها از بلوغ کامل برخوردار بودند، ضمن این که تعداد معدودی از سلول‌های زایا یعنی ۱/۰۲±۳/٥٤ درصد سلول‌های زایا، آپوپتوتیک بودند (جدول ۱).

جدول ۱ :اثر بوسولفان و بوسرلین بر سلول‌های اپوپتوتیک و کیفیت اسپرم‌زایی در لوله‌های سمینیفروس موش بالغ

گروه‌های آزمایش	بلوغ اسپرماتوزنز	لوله‌های بالغ (درصد)	سلول‌های آپوپتوتیک (درصد)
گروه اول	۹/۲۳±۰/۷۲	۹۹/٦۲±۰/۷٤	۳/٥٤±۱/۰۲
گروه دوم	۹/۱٥±۰/٤۲	۹۸/۷٥±۲/۰٥	٤/۱۲±۱/۰۸
گروه سوم	٤/٤٦±۰/٥٦*	۱/٦۲±۱/٤۱*	۲۳/۲۸±۷/ ۱۰*
گروه چهارم	۷/۷۱±۰/٦۹*	۷۸/۲٥±٦/ ۸۸*	۱۰/٥۰±۲/ ۹۱*

تمامی داده ها در مقایسه با گروه کنترل است. *:p< ۰0.001

در گروه دوم که فقط هورمون بوسرلین دریافت کرده بودند، ساختمان لوله‌های سمینیفروس طبیعی دیده شد (شکل b- ۱). ضمن این که ۲/۰٥ ±۹۸/۷٥ درصد لوله‌ها نیز از بلوغ برخوردار بودند چرا که مانند گروه کنترل تمام رده سلول‌های زایا و سرتولی در تمام لوله ها دیده شد (جدول ۱). تجویز بوسرلین تأثیری بر بروز آپوپتوز سلول‌های زایا نداشت.

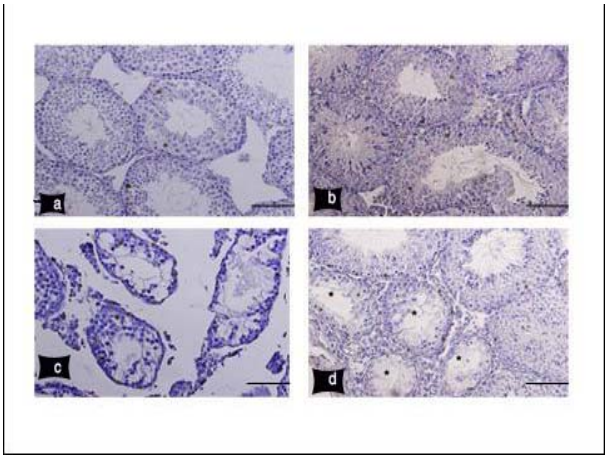
در گروه سوم که تحت شیمی‌درمانی بودند، در لوله‌های سمینیفروس تعداد زیادی از سلول‌های زایا از بین رفته بودند، با این حال هنوز تعدادی اسپرماتوگونی در برخی لوله ها دیده می‌شد و اسپرماتوگونی‌ها به‌طور کامل از بین نرفته بودند. ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال و قطر لوله سمینیفروس در مقایسه با کنترل کوتاهتر یا کوچکتر به‌نظر می‌رسید (شکل c- ۱). در ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال واکوئل‌های بزرگ دیده

Archive of SID

www.SID.ir

شد (شکل c- ۱). بلوغ اسپرم‌زایی نیز به شدت کاهش یافته بود (۱/۴۱± ۱/۶۲ درصد) (جدول ۱). تجویز یک دوز بوسولفان به میزان mg/kg ۳۰، میزان سلول‌های آپوپتوتیک را ۷/۱۰±۲۳/۲۸ درصد افزایش داد.

در گروه آخر که تحت درمان ترکیبی قرار گرفته بود، ۶/۸۸± ۷۸/۲۵ درصد لوله‌ها دارای بلوغ اسپرماتوژنز بودند. اسپرم‌زایی فعال در اغلب لوله‌ها دیده می‌شد و در اغلب لوله ها انواع متنوع سلول‌های زایا دیده می‌شد و برخلاف گروه دوم واکوئل در داخل اپی‌تلیوم ژرمینال به چشم نمی‌خورد و همچنین مجاری لوله‌ها نیز مشخص و روشن مشاهده دیده می شد. هرچند در تعدادی از لوله ها (۰/۳۴± ۲/۷۵ در صد) هنوز اسپرم‌زایی فعال نشده بود و از بلوغ پایینی برخوردار بودند (شکل d- ۱). تجویز بوسرلین بلوغ اسپرم‌زایی را به‌صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه تحت شیمی‌درمانی افزایش داد. (جدول ۱).ضمن این که میزان آپوپتوز را در مقایسه با گروه سوم کاهش داد.



شکل ۱. مقطع لوله‌های سمینیفروس موش گروه‌های کنترل ستاره‌ها معرف تعدادی از لوله‌هایی هستند که اسپرماتوژنز طبیعی در آن‌ها برقرار نشده است. بار: ۵۰ میکرو متر. رنگ آمیزی: تانل و هماتوکسیلین

(a) در شکل ۱، تحت درمان با هورمون بوسرلین (b)، بوسولفان (c) و درمان ترکیبی با بوسرلین و بوسولفان (d). سلول‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای و غیر آپوپتوتیک به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند. در تصاویر a و b به لوله‌های سمینیفروس طبیعی و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال توجه نمایید. در تصویر c به از بین رفتن تعداد زیادی از سلول‌های زایا و حضور واکوئل در اپی‌تلیوم ژرمینال توجه کنید، با این‌حال هنوز برخی سلول‌ها باقی مانده‌اند. در تصویر d، در عمده لوله‌ها اسپرماتوژنز فعال دیده می‌شود.

بحث

هدف از این تحقیق بررسی اثر بوسرلین بر مهار آپوپتوز سلول‌های زایای تحت درمان با بوسولفان در موش نر بالغ بود. بر طبق نتایج مطالعه، تجویز یک دوز بوسولفان در دوز ۳۰mg/kg در موش باعث تخریب اسپرم‌زایی در لوله ها می‌شود که این اثر ناشی از خاصیت آلکیله کنندگی بوسولفان است که دارای آثار مخرب روی سلول‌های در حال تکثیر است [۲۵و ۲۶]. هرچند عده‌ای دیگر نیز بر این عقیده‌اند که مصرف بوسولفان می‌تواند باعث توقف تقسیم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یا مرگ آنها شود [۲۷و ۲۸]. در این مطالعه هرچند که تعداد زیادی از اسپرماتوگونی‌ها از بین رفتند ولی تعدادی نیز باقی ماندند که احتمالاً به دلیل تکثیر مجدد سلولها و پر شدن لوله ها است [۲۶]. در مطالعه حاضر بلوغ اسپرم‌زایی به‌دنبال درمان با بوسولفان کاهش یافت که می‌تواند ناشی از تخریب سلول‌های زایا در لوله‌ها باشد.تجویز یک دوز mg/kg ۳۰، باعث القای آپوپتوز در سلول‌های زایای بیضه شد. به‌طور مشابهی درمان با دو کسوروبیسین، سیس پلاتین، سیکلوفسفاماید، نیز باعث القای آپوپتوز سلول‌های زایای بیضه می‌شود [۹، ۲۹ و ۳۰].

مطالعه حاضر همچنین مشخص کرد که بوسرلین باعث حفظ اسپرم‌زایی در لوله‌های سمینیفروس در موش تحت شیمی‌درمانی می‌شود. یافته‌های این پژوهش با سایر گزارش‌های مبنی بر اثر حمایتی GnRH بر سلول‌های زایای لوله سمینیفروس به‌دنبال مصرف یا دریافت عوامل مختلف گنادو توکسیک شباهت دارد [۱۵-۶]. مطالعه حاضر نشان داد

Archive of SID
www.SID.ir

که بوسرلین میزان آپوپتوز سلول‌های زایا را در موش‌های تحت شیمی‌درمانی کاهش می‌دهد. به‌طور مشابهی، لوپرلاید میزان آپوپتوز سلول‌های زایا را در رت‌ها به‌دنبال درمان با دوکسوروبیسین کاهش می‌دهد [۹].

این که آنالوگ‌های GnRH، با چه مکانیسمی می‌توانند آپوپتوز سلول‌های زایا را به‌دنبال عوامل گنادوتوکسیک کاهش دهند، به‌طوردقیق مشخص نیست. شاید این هورمون‌ها، این نقش را از طریق تأثیر بر سلول‌های سوماتیک موجود در بیضه ایفا می‌کنند. چرا که در اغلب گونه‌ها مانند انسان و رت‌ها، سلول‌های لیدیگ دارای رسپتور آنالوگ‌های GnRH هستند [۳۱].

هر چند که در موش‌ها این رسپتورها روی سلول‌های زایا وجود دارند [۳۲]؛ اما احتمالاً بوسرلین توانسته است به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تغییر ترشح فاکتورهای رشد در محیط لوله‌های سمینیفروس باعث بهبودی روند اسپرم‌زایی شده یا این که روی فاکتورهای رشد ترشح شده از سلول‌های سرتولی مانند فاکتورهای میتوتیک و پروتیین باند شونده به آندروژن عمل نموده است [٦]. اسپرم‌زایی یک روند بسیار پیچیده و وابسته به همکاری سلول‌های سوماتیک و زایا با یکدیگر است.

شاید مکانیسم دیگر، کاهش یافتن تستوسترون داخل بیضه‌ای به‌دنبال تجویز بوسرلین به‌عنوان یک آنالوگ GnRH باشد [۳۳]؛ چرا که آنالوگ‌های GnRH می‌توانند ترشح FSH و LH را مهار نموده و باعث کاهش ترشح تستوسترون شوند [۳۳-۳۲]. ضمن این که نشان داده شده است که تستوسترون داخل بیضه‌ای ارتباط منفی با بهبودی اسپرم‌زایی پس از عوامل سیتوتوکسیک دارد [۳۳].

شاید عامل دیگر که بوسرلین توانسته باعث کاهش آپوپتوز شود، اثر بر کاهش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی است[۳٤]، ضمن این که نشان داده شده است که پپتیدهای شبه GnRH دارای اثر ضد تکثیری بر سلول‌های تومروی هستند [۳۵]. همچنین نشان داده شده که لوپرلاید استات از جمله آنالوگ‌های GnRH، باعث کاهش رشد و تکثیر سلول‌های آندومتر می‌شود [۳٤].

در مطالعه حاضر تجویز بوسرلین به تنهایی نتوانست منجر به القای آپوپتوز سلول‌های زایا شود. به طور مشابهی لوپرلاید استات نیز نمی‌تواند باعث القای آپوپتوز سلول‌های زایای مردانه شود [١٦] . همچنین هیپوفیزکتومی که با قطع گنادو تروپین‌ها همراه است در رت‌های بالغ و هامستر، نمی‌تواند باعث القای آپوپتوز سلول‌های زایای مردانه شود [٣٦ و٣٧]،هرچند که در رت‌های نابالغ با آپوپتوز همراه است. به عبارت دیگر این مطالعات نشان می‌دهند که وابستگی بیضه به گنادو تروپین‌ها یک فاکتور وابسته به سن است و در سنین مختلف آثار گنادو تروپین‌ها بر سلول‌های زایای بیضه می‌تواند متفاوت باشد [۳۸]. مطالعه حاضر روی موش صورت گرفت و به‌طور موفقیت آمیزی بوسرلین اسپرم‌زایی را در موش حفظ نمود. در واقع شاید بتوان گفت که بیشتر تلاش‌ها با استفاده از GnRH ها برای بهبود اسپرم‌زایی در موش‌ها ناموفق گزارش شده اند [۳۱]. میزان موفقیت درمانی اسپرماتوژنز با استفاده از GnRH ها، به‌دنبال عوامل گنادو توکسیک در رت‌ها در مقایسه با موش‌ها بالاتر است. شاید این اختلاف‌ها ناشی از تفاوت رفتاری اسپرماتوگونی‌ها باشد. به نظر می‌رسد که رت‌ها در مقایسه با موش‌ها نسبت به آسیب‌های گنادوتوکسیک حساس‌ترند [۳۱]. به‌طور کلی باید بیش از ۵۰ درصد لوله‌های سمینیفروس حاوی اسپرم‌زایی کامل با بلوغ بالا باشند تا یک موش بتواند بارور در نظر گرفته شود[۲۷ و۲۸]. بنابراین در مطالعه حاضرهمه حیوانات به جز گروه سوم که با بوسولفان تیمار شده‌اند، می‌توانند بارور باشند هرچند که کیفیت یا بلوغ اسپرم‌زایی در گروه آخر کاهش یافته است.

Archive of SID

www.SID.ir

به‌طور خلاصه نتایج به‌دست آمده نشان داد که مصرف بوسرلین طی شیمی‌درمانی با بوسولفان می‌تواند باعث حفظ اسپرم‌زایی در موش شود و این عمل می‌تواند از طریق کاهش آپوپتوز سلول‌های زایا صورت گیرد. در ارتباط با این که چه مکانیسم‌هایی می‌توانند باعث کاهش آپوپتوز سلول‌های زایا پس از مصرف آنالوگGnRH به‌دنبال شیمی‌درمانی شود، مطالعات بیشتری لازم است.

References

1. **Nudell DM, Monoski MM, Hipshultz LI**. Common medications and drugs:how they affect male fertility.Urol Clin. N. Am 2002; 29:965-73.

2. **Howell SJ, Radford JA, Ryder W.DJ, Shalet SM**. Testicular function after cytotoxic chemotherapy:
Evidence of leydig cell Insufficiency. J Clin Oncol 1999; 17(5): 1493-8.

3. **Glode LM, Robinson J, Gould SF.** Protection from cyclophosphamide induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. Lancet 1981; 23:1132-4.

4. **da Cunha M F, Meistrich M L, Nader S**. Absence of testicular protection by a gonadotropin releasing hormone analog against cyclophospamide-induced testicular cytotoxicity in the mouse. Cancer Res 1987; 47: 1093-7.

5- **Meistrich ML, Wilson G, Zhang Y, Kordoglu B, Terry NH.** Protection from procarbazine- induced testicular damage by hormonal pretreatment does not involve arrest of spermatogonial proliferation. Cancer 1997; 1091-1097.

6. **Blanchard KT, Lee J, Boekelheide K.** Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2, 5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting innormalized stem cell factor expression. Endocrinology 1998; 139: 236–44.

7. **Meistrich ML.** Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. Acta Paediatr Scand 1999; 88:19–22.

8. **Meistrich ML, Wilson G, Shuttlesworth G,Huhtaniemi I, Reissmann T.** GnRH agonists and antagonists stimulate recovery of fertility in irradiatedLBNF1 rats. J Androl 2001; 22:809–17.

9. **Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I.** Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulationof spermatogonial differentiation after irradiation. J Androl 2000; 21:464–9.

10. **Shetty G,Wilson G, Hardy MP, Niu E, Huhtaniemi I, Meistrich ML.** Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. Endocrinology 2002; 143: 3385–96.

11. **Hild SA, Meistrich ML, Blye RP, Reel JR.** Lupron depot prevention of antispermatogenic/antifertility activity of the indenopyridine, CDB-4022, in the rat. Biol Reprod 2001; 65: 165–72.

12. **Setchell BP, Ploen L, Ritzen EM.** Reduction of long-term effects of local heating of the testis by treatment of rats with a GnRH agonist and ananti-androgen. Reproduction 2001; 122: 255–63.

13. **Meistrich ML, Wilson G, Porter KL, Huhtaniemi I, Shetty G, Shuttlesworth GA.** Restoration of spermatogenesis in dibromochloropropane (DBCP)-treated rats by hormone suppression. Toxicol Sci 2003; 76(2): 418-26.

14. **Glode LM, Robinson J, Gould SF.** Protection from cyclophosphamide induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. Lancet 1981; 23:1132-4.

15. **Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Yumura Y, Takeda M, Hosaka M.**GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. Int J Urol 2001; 8: 615–22.

16. **Endo F, Manabe F, Takeshima H, Akaza H.** Protecting apermatogonia from apoptosis induced by doxorubicin using the luteinizing hormone-releasing hormone analog Leuprorelin. Int J Urol

Archive of SID

www.SID.ir

2003; 10: 72-9.

17. **Print CG, Loveland KL.** Germ cell suicide : new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bioassay 2000; 22: 423-30.

18**. Ohta H, Aizawa SH, Nishimune Y**. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. Biol Reprod 2003; 68: 2249-54.

19**- 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/fas L and p53 independent manner.FEBS Lett 2004; 575(1-3): 41-51.

20**- Jiang FX, Short RV**. Male germ cell transplantation in Rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. Int J Androl 1995; 18: 326-30.

۲۱- **محمدقاسمی ف، سلیمانی راد ج ، قنبری ا ع**. مطالعه فراساختاری اشکال آپوپتوتیک سلول‌های اسپرماتوژنیک به دنبال تیمار با بوسولفان در موش بالغ. باروری و ناباروری زمستان ۱۳۸٦ .شماره ٤: ۱۹- ۳۲۹.

22**. Trindade CR, Camargos AF, Pereira FE.** The effect of buserelin acetate on the uterus of adult rats: morphological aspects. Clin Exp Obstet Gynecol 2008; 35(3): 198-201.

23**. Brogden RN**, **Buckley MM**, **Ward A** Buserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical profile. Drugs 1990; 39(3): 399-437.

24**. Lewis-Jones DI, Kerrigan DD.** A modified Johnson's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. IRCS Med Sci 1985; 13: 510-7.

25**. Bishop JB, Wassom JS.** Toxicological review of busulfan (Myleran). Mutat Res 1986; 168(1): 15-45.

26**. 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.

27. **Izadyar F, Spierenberg GT, Creemers LB, Den-oden K, de Rooij DG.** Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. Reproduction 2002; 124: 85-94.

28. **Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Jabbary Araee A.** The morphological changes of adult mouse testes after Co-Radiation. Ir Biomed J 2008; 12(1): 35-42.

29. **Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I**. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. Arch Androl 2001; 46(1): 43-9.

30. **Cai L, Hales BF, Robaire B.** Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. Biol Reprod 1997; 56(6): 1490-7.

31**. Meistrich ML, Guanapala SH.** Focus on fertility preservation, Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. Reproduction 2008; 136: 691-701.

32**. Meistrich ML, Wilson G, Huhtaniemi I.** Hormonal treatment after cytotoxictherapy stimulates recovery of spermatogenesis. Cancer Res 1999; 59: 3557–60

33**. Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I, Shuttlesworth GA, Reissmann T, Meistrich ML.** Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulateand testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiatedrats. Endocrinology 2000; 141:1735–45.

34. **Tesone M, Bilotas M, Barañao RI, Meresman G.** The role of GnRH analogues in endometriosis-associated apoptosis and angiogenesis. Gynecol Obstet Invest. 2008; 66:10-18

35**. Cobellis G, Meccariello R, Minucci S, Palmiero C, Pierantoni R, Fasano S.** Cytoplasmic versus nuclear localization of Fos- Related proteins in the Frog- Rana esculenta, testis: in vivo and direct in vitro effect of a gonadotropin- releasing hormone agonist. Biol Reprod 2003; 68: 954-60.

36**. Gosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LEJR, Russel LD**. Structural manifestations of the rat sertoli cells to hypophysectomy: A correlative morphometric and endocrine study. Endocrinology 1992; 131 (1): 485-97.

Archive of SID

www.SID.ir

37. **Gosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LEJR, Russel LD**. Structural response of the hamster sertoli cell to hypophysectomia: a correlative morphometric and endocrine study. Anat Rec 1993; 237(2): 296.

38. **Billing H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW.** Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. Endocrinology 1995; 136(1): 5-12.

Archive of SID

www.SID.ir