

اثر مهاری بوسرلین بر آپوتوز 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 آپوتوز 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 به صورت زیر جلدی فسفات بافر سالین دریافت کرد. گروه دوم، روزانه ۰/۴ میکروگرم بوسرلین به مدت ۲۱ روز به صورت زیر جلدی دریافت کرد. گروه سوم، یک دوز ۳۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بوسولفان به صورت داخل صفاقی دریافت کرد و گروه چهارم یک دوز ۳۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بوسولفان و روزانه ۰/۴ میکروگرم بوسرلین به مدت ۲۱ روز بعد دریافت نمود. ۳۵ روز پس از شروع درمان همه حیوانات کشته شده و بیضه آن‌ها تشریح شد. ارزیابی‌های اسپرم‌زایی، از طریق مشخص نمودن جدول جانسون و آپوتوز 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 ۴ به صورت معنی‌دار بالاتر از گروه ۳ بود ($0/71 \pm 0/69$) در مقابل $0/56 \pm 0/46$). تعداد سلول‌های آپوتوتیک در گروه تحت درمان با بوسولفان به صورت معنی‌دار بالاتر از کنترل ($23/28 \pm 7/10$) در مقابل $1/02 \pm 3/54$) بود ($p < 0/001$); در حالی که بوسرلین به صورت معنی‌دار آپوتوز سلول‌های زایا را در بیضه تحت درمان با بوسولفان ($2/91 \pm 10/50$) در مقایسه با گروه سوم ($23/28 \pm 7/10$) کاهش داد ($p < 0/001$).

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

کلید واژه‌ها: بیضه، اسپرم‌زایی، آپوتوز، بوسرلین

✍️ آدرس مکاتبه: ایران، رشت، کیلومتر ۱۰ جاده تهران، مجتمع دانشگاهی گیلان، دانشکده پزشکی،

E-mail: parsahistolab@yahoo.com

گروه آناتومی، صندوق پستی ۳۴۷۷

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 شیمی‌درمانی 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 و ۲]. 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 شیمی‌درمانی موثر واقع نشد [۴]. در سال ۱۹۹۷ میستریش (Meistrich) و همکارانش نشان دادند که درمان با آنالوگ GnRH می‌تواند باعث بهبودی اسپرم‌زایی در رت‌های تحت درمان با اشعه شود [۵]. 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 [۶]. پروکاربازین [۷]. اشعه درمانی [۸-۱۰]. ایندینوپریدین [۱۱]. گرمای مزمن [۱۲] دی برومو کلرو پروپان [۱۳]، سیکلوفسفاماید [۱۴] و بوسولفان [۱۵] می‌تواند باعث حفظ یا برقراری اسپرم‌زایی در لوله‌های سمینیفروس شود.

این که آنالوگ‌های GnRH 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 آپوتوز سلول‌های زایا باشد [۱۶]. آپوتوز 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 آپوتوز برای برقراری اسپرماتوژنز طبیعی در بزرگسالان بسیار مهم است [۱۷]. بیضه‌ها نسبت به سموم محیطی که منجر به آسیب سلولی می‌شوند حساس هستند. آپوتوز 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 میلوزنیک 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 آپوتوز است [۱۹ و ۲۱]. بوسرلین (Buserelin)، یکی از داروهای آنالوگ GnRH است

صفتی دریافت کردند. گروه چهارم، موش‌های تحت درمان ترکیبی که مانند گروه دوم، پس از تزریق ۳۰ mg/kg بوسولفان، به مدت ۲۱ روز روزانه ۰/۲ میلی لیتر PBS حاوی ۰/۴ میکروگرم بوسرلین به صورت 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 بفری فرمالدئید ۱۰ درصد، برای مدت ۴۸ 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 سمینفروس 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 ۴ 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 سمینفروس در هر حیوان در مراحل مختلف اسپرماتوژنز استفاده شد. به هر لوله بر اساس جدول، نمرات صفر تا ده، تعلق گرفت، همچنین درصد لوله‌هایی که دارای بلوغ بالا بودند (نمرات ۸-۱۰) نیز در هر گروه محاسبه و سپس نتایج بین گروه‌ها با هم مقایسه شدند [۲۴].

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

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 و ۲۳]. براساس مطالعات محققان حاضر در ارتباط با تأثیر بوسرلین یا مکانیسم اثر آن بر آپوپتوز سلول‌های زایا به دنبال 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 ۴ گروه (هر گروه ۸ سر موش) تقسیم شدند: گروه اول، موش‌های کنترل، به مدت ۲۱ روز روزانه ۰/۲ میلی لیتر PBS به صورت زیر پوستی دریافت کردند. گروه دوم، موش‌های تحت درمان با هورمون که به مدت ۲۱ روز، روزانه ۰/۲ میلی لیتر PBS حاوی ۰/۴ میکروگرم بوسرلین (Sigma, USA) به صورت زیر پوستی دریافت نمودند. گروه سوم، موش‌های تحت شیمی درمانی، فقط یک تک دوز ۳۰ mg/kg بوسولفان (Sigma, USA) به صورت داخل

مجارى لوله‌ها منظم بود و مجراى داخلى لوله‌ها كاملاً باز و مشخص بود. در بافت بينابى، سلول‌هاى ليدىگ با هسته‌هاى گرد يوكروماتين خود، اغلب به صورت گروهى به چشم مى‌خوردند (شكل a-۱). $99/62 \pm 0/74$ درصد لوله‌ها از بلوغ كامل برخوردار بودند، ضمن اين كه تعداد معدودى از سلول‌هاى زيا يعنى $3/54 \pm 1/02$ درصد سلول‌هاى زيا، آپوتوتيك بودند (جدول ۱).

جدول ۱: اثر بوسولفان و بوسرلين بر سلول‌هاى آپوتوتيك و كيفيت اسپرم‌زاى در لوله‌هاى سمينيفروس موش بالغ

گروه‌هاى آزمائش	بلوغ اسپرماتوزنز	لوله‌هاى بالغ (درصد)	سلول‌هاى آپوتوتيك (درصد)
گروه اول	$9/23 \pm 0/72$	$99/62 \pm 0/74$	$3/54 \pm 1/02$
گروه دوم	$9/15 \pm 0/42$	$98/75 \pm 2/05$	$4/12 \pm 1/08$
گروه سوم	$4/46 \pm 0/56^*$	$1/62 \pm 1/41^*$	$23/28 \pm 7/10^*$
گروه چهارم	$7/71 \pm 0/69^*$	$78/25 \pm 6/88^*$	$10/50 \pm 2/91^*$

تمامى داده‌ها در مقايسه با گروه كنترل است. $*p < 0.001$

در گروه دوم كه فقط هورمون بوسرلين دريافت كرده بودند، ساختمان لوله‌هاى سمينيفروس طبيعى ديده شد (شكل b-۱). ضمن اين كه $98/75 \pm 2/05$ درصد لوله‌ها نيز از بلوغ برخوردار بودند چرا كه مانند گروه كنترل تمام رده سلول‌هاى زيا و سرتولى در تمام لوله‌ها ديده شد (جدول ۱). تجويز بوسرلين تاثيرى بر بروز آپوتوز سلول‌هاى زيا نداشت.

در گروه سوم كه تحت شيمى‌درمانى بودند، در لوله‌هاى سمينيفروس تعداد زيادى از سلول‌هاى زيا از بين رفته بودند، با اين حال هنوز تعدادى اسپرماتوگونى در برخى لوله‌ها ديده مى‌شد و اسپرماتوگونى‌ها به‌طور كامل از بين نرفته بودند. ضخامت اپى‌تليوم ژرمينال و قطر لوله سمينيفروس در مقايسه با كنترل كوتاهتر يا كوچكتر به‌نظر مى‌رسيد (شكل c-۱). در ضخامت اپى‌تليوم ژرمينال واكوئل‌هاى بزرگ ديده

انجام و بافت در اتانول با درجات نزولى قرار گرفت. پس از انكوبه بافت با پراكسيداز، با كمك پروتئيناز k، پروتئين‌هاى اضافى هسته برداشته شد. سپس نمونه با محلول تانل براى مدت ۳۰ دقيقه در انكوباتور، انكوبه شد. پس از شستشو و خشك نمودن، اسلايدها با دى آمينو بنزيدين انكوبه شدند. در نهايت از همتوكسيلين براى رنگ‌آميرى زمينه استفاده شد و نمونه‌ها با ميكروسكوپ نورى ارزياى شدند. سلول‌هاى كه هسته آن‌ها به رنگ قهوه‌اى مشاهده شد، سلول‌هاى آپوتوتيك، و سلول‌هاى كه هسته آن‌ها به رنگ بنفش مشاهده شد، غير آپوتوتيك در نظر گرفته شدند. تعداد سلول‌هاى آپوتوتيك در حداقل ۲۰ لوله سمينيفروس در مراحل ۷ و ۸ اسپرم‌زاى، در هر حيوان شمارش و سپس بر تعداد كل سلول‌هاى زياى آپوتوتيك و غير آپوتوتيك هر لوله تقسيم و در نهايت در عدد صد، ضرب و به صورت در صد بيان شد.

تحليل آمارى

نتايج به‌دست آمده در نمونه‌هاى مورد مطالعه با يكديگر و با كنترل مقايسه شدند. بلوغ اسپرم‌زاى و درصد سلول‌هاى آپوتوتيك با استفاده از برنامه آمارى SPSS و آزمون آمارى ANOVA تجزيه و تحليل شدند و $p < 0.05$ معنى‌دار در نظر گرفته شد.

يافته‌ها

كيفيت اسپرماتوزنز

در بررسى بافت‌شناسى گروه كنترل، اسپرم‌زاى فعال در لوله‌هاى سمينيفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌هاى بالغ يا در حال بلوغ مشاهده شد. در داخل لوله‌ها رده‌هاى مختلف سلول‌هاى اسپرماتوژنيك در مراحل مختلف تقسيم به همراه سلول‌هاى سرتولى ديده شد. در اين لوله‌ها اپى‌تليوم ژرمينال از ضخامت قابل توجهى برخوردار بود و سرحد

سمینیفروس طبیعی و ضخامت اپی تلیوم ژرمینال توجه نمایید. در تصویر c به از بین رفتن تعداد زیادی از سلول‌های زایا و حضور واکوئل در اپی تلیوم ژرمینال توجه کنید، با این حال هنوز برخی سلول‌ها باقی مانده‌اند. در تصویر d، در عمده لوله‌ها اسپرماتوزن فعال دیده می‌شود.

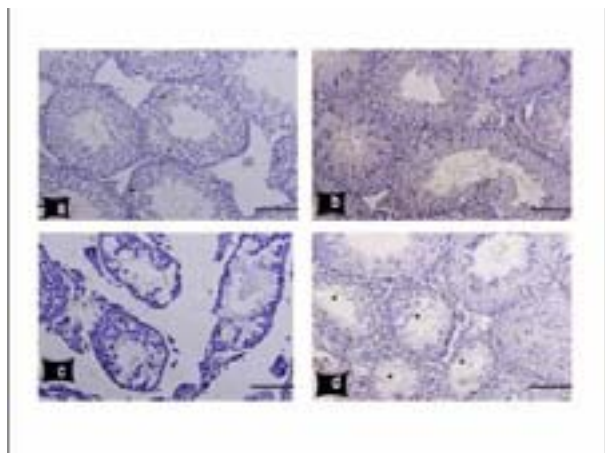
بحث

هدف از این تحقیق بررسی اثر بوسرلین بر مهار آپوتوز سلول‌های زایای تحت درمان با بوسولفان در موش نر بالغ بود. بر طبق نتایج مطالعه، تجویز یک دوز بوسولفان در دوز ۳۰ mg/kg در موش باعث تخریب اسپرم‌زایی در لوله‌ها می‌شود که این اثر ناشی از خاصیت آکلیله‌کنندگی بوسولفان است که دارای آثار مخرب روی سلول‌های در حال تکثیر است [۲۵ و ۲۶]. هرچند عده‌ای دیگر نیز بر این عقیده‌اند که مصرف بوسولفان می‌تواند باعث توقف تقسیم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی یا مرگ آنها شود [۲۷ و 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 لوله‌ها است [۲۶]. در مطالعه حاضر بلوغ اسپرم‌زایی به دنبال درمان با بوسولفان کاهش یافت که می‌تواند ناشی از تخریب سلول‌های زایا در لوله‌ها باشد. تجویز یک دوز ۳۰ mg/kg، باعث القای آپوتوز در سلول‌های زایای بیضه شد. به طور مشابهی درمان با دو کسوروبیسین، سیس پلاتین، سیکلوفسفاماید، نیز باعث القای آپوتوز 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 به دنبال مصرف یا دریافت عوامل مختلف گنادو توکسیک شباهت دارد [۱۵-۶]. مطالعه حاضر نشان داد

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 ۳۰ mg/kg، میزان سلول‌های آپوتوتیک را ۲۳/۲۸ ± ۷/۱۰ درصد افزایش داد.

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



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

(a) در شکل ۱، تحت درمان با هورمون بوسرلین (b)، بوسولفان (c) و درمان ترکیبی با بوسرلین و بوسولفان (d). سلول‌های آپوتوتیک به رنگ قهوه‌ای و غیر آپوتوتیک به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند. در تصاویر a و b به لوله‌های

دارای اثر ضد تکثیری بر سلول‌های توموری هستند [۳۵]. همچنین نشان داده شده که لوپرلاید استات از جمله آنالوگ‌های GnRH، باعث کاهش رشد و تکثیر سلول‌های آندومتر می‌شود [۳۴].

در مطالعه حاضر تجویز بوسرلین به تنهایی نتوانست منجر به القای آپوتوز سلول‌های زایا شود. به طور مشابهی لوپرلاید استات نیز نمی‌تواند باعث القای آپوتوز سلول‌های زایای مردانه شود [۱۶]. همچنین هیپوفیزکتومی که با قطع گنادو تروپین‌ها همراه است در رت‌های بالغ و هامستر، نمی‌تواند باعث القای آپوتوز سلول‌های زایای مردانه شود [۳۶ و ۳۷]. هرچند که در رت‌های نابالغ با آپوتوز 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 گنادو توکسیک 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 و ۲۸]. بنابراین در مطالعه حاضر همه 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.

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

این که آنالوگ‌های GnRH، با چه مکانیسمی می‌توانند آپوتوز سلول‌های زایا را به‌دنبال عوامل گنادو توکسیک کاهش دهند، به‌طور دقیق 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 باندا شونده به آندروژن عمل نموده است [۶]. 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 LH و FSH را مهار نموده و باعث کاهش ترشح تستوسترون شوند [۳۲-۳۳]. 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 آپوتوز شود، اثر بر کاهش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی است [۳۴]. ضمن این که نشان داده شده است که پپتیدهای شبه GnRH

مکانیسم‌هایی می‌توانند باعث کاهش آپوپتوز سلول‌های زایا پس از مصرف آنالوگ GnRH به دنبال شیمی‌درمانی شود، مطالعات بیشتری لازم است.

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

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 cyclophosphamide-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 in normalized 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 irradiated LBNF1 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: stimulation of 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 an anti-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 spermatogonia from apoptosis induced by doxorubicin using the luteinizing hormone-releasing hormone analog Leuprorelin. *Int J Urol*

- 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 اع. مطالعه فراساختاری اشکال آپوتوتیک سلولهای اسپرماتوژنیک به دنبال تیمار با بوسولفان در موش بالغ. باروری و ناباروری زمستان ۱۳۸۶. شماره ۴: 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, Jabbari 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 stimulate and 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.

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.

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*

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 0.4 μ g 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 4 were significantly higher than those of busulfan treated group 7.71 \pm 0.69 VS 4.46 \pm 0.56 ($p < 0.001$). Apoptotic cells number cells were significantly more numerous in busulfan treated group than those of control 23.28 \pm 7.10 VS 3.54 \pm 1.02 ($p < 0.001$). While buserelin substantially reduced germ cell apoptosis in fourth group 10.50 \pm 2.91 in comparison with third group 23.28 \pm 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