

Improvement in sperm parameters after using gonadotropin-releasing hormone analogue in busulfan treated prepubertal mice

Baazm M^{1*}, Darabi MR¹, Babaei S¹, Talebi R¹

1- Department of anatomy, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 17 Aug 2013, Accepted: 20 Nov 2013

Abstract

Background: Gonadal suppression is one of the side effects of chemotherapy that leads to infertility. The present study examined the feasibility of using a gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-A) in prevention of side effects caused by busulfan in prepubertal mice.

Material and Methods: In this case-control study, leuprolide (3.8 mg/kg) was injected to prepubertal male mice 2 weeks prior and after to busulfan (40mg/kg) administration. The animals received one or two doses of leuprolide after busulfan administration with 4 week intervals. Six weeks after the last injection, the sperm parameters including sperm count and motility were analyzed based on World Health Organization criteria.

Results: At the time of sacrifice, testicular weight was increased in animals receiving leuprolide. In mice who received leuprolide pretreatment, the percentage of progressive and immotile sperms was significantly increased and decreased respectively ($p \leq 0.05$). But the percentage of non progressive sperm did not change. The sperm motility in mice that received leuprolide after busulfan also did not change. The sperm count also increased in pretreatment animals but it was not significant ($p \geq 0.05$).

Conclusion: The present study demonstrated that leuprolide pretreatment results in improvement in sperm motility in prepubertal male mice.

Keywords: Busulfan, Chemotherapy, Leuprolide, Sperm Motility

*Corresponding author:

Address: Department of Anatomy, Medical Faculty, Arak University of Medical Sciences, Sardasht, Arak
Email: Dr.baazm@arakmu.ac.ir

بهبود پارامترهای اسپرم بعد از استفاده از هورمون آزاد کننده گنادوتروپین در موش‌های نابالغ دریافت کننده بوسولفان

مریم باعزم^{1*}، محمدرضا دارابی²، سعید بابایی¹، رضا طالبی³

1. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

2. دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

3. مربی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 92/5/26 تاریخ پذیرش: 92/8/29

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوارض شیمی درمانی مختل کردن عملکرد گنادها و متعاقب آن ناباروری می‌باشد. مطالعه حاضر تاثیر استفاده از یک هورمون آزاد کننده گنادوتروپین را در جلوگیری از عواض ایجاد شده توسط بوسولفان در موش‌های نابالغ را مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد و شاهد لپرولید (3/8 میلی‌گرم به ازای هر یک کیلوگرم وزن) قبل یا بعد از دریافت بوسولفان (40 میلی‌گرم به ازای هر یک کیلوگرم وزن) به موش‌های نر نابالغ تزریق شد. حیوانات یک یا دو دوز لپرولید را بعد از دریافت بوسولفان دریافت کردند، بین هر تزریق 4 هفته فاصله وجود داشت. 6 هفته بعد از آخرین تزریق پارامترهای اسپرم شامل تعداد اسپرم‌ها و تحرک آنها بر اساس شاخص‌های سازمان بهداشت جهانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در زمان بررسی، وزن بیضه‌ها در حیوانات دریافت کننده لپرولید افزایش یافت. در موش‌هایی که قبل از دریافت بوسولفان، لپرولید دریافت کرده بودند درصد اسپرم‌ها با حرکت پیش‌رونده رو به جلو و اسپرم‌های ثابت به ترتیب افزایش و کاهش داشت ($p \leq 0/05$) اما بر حرکت غیر پیش‌رونده آنها تاثیری نداشت. در تحرک اسپرم در حیواناتی که بعد از دریافت بوسولفان، لپرولید دریافت کرده بودند تغییری مشاهده نشد. تعداد اسپرم‌ها در موش‌هایی که قبل از دریافت بوسولفان لپرولید دریافت کرده بودند هم افزایش یافت ولی این افزایش تعداد به صورت معنی‌دار نبود ($p \geq 0/05$).

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد استفاده از لپرولید قبل از شروع درمان باعث بهبود حرکت اسپرم‌ها در موش‌های نابالغ می‌گردد.

واژگان کلیدی: بوسولفان، لپرولید، شیمی درمانی، پارامترهای اسپرم

*نویسنده مسئول: اراک، سردشت، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

مقدمه

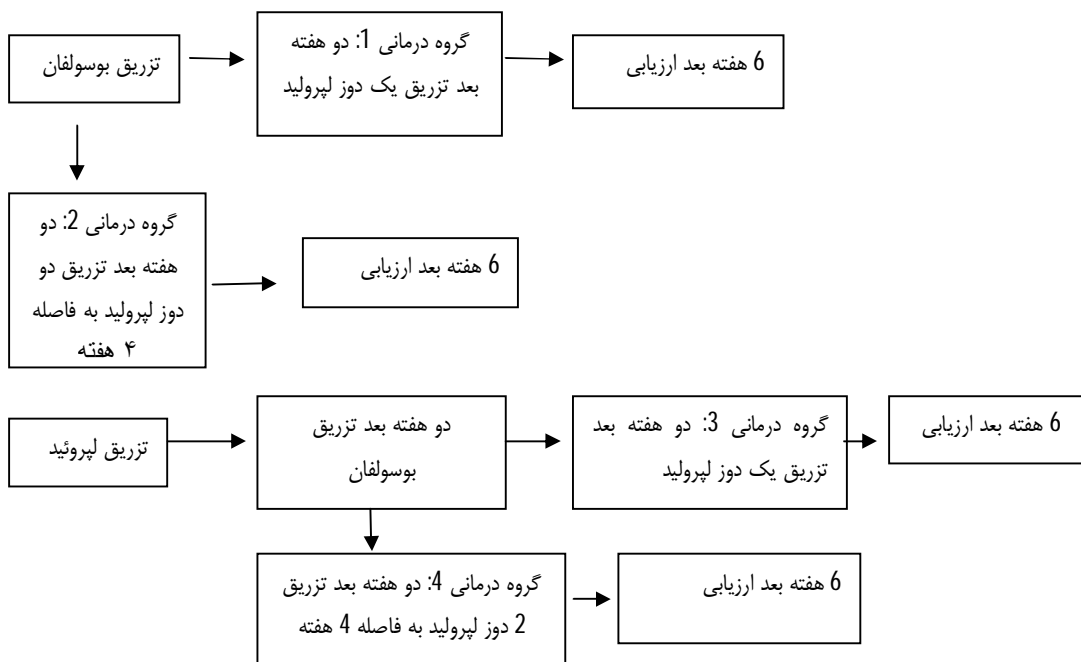
گنادوتروپین (Gonadotropin realizing hormone)

GnRh در تحریک تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و برگرداندن اسپرماتوژنز موثر می‌باشد (8). استفاده از هورمون‌های آزاد کننده گنادوتروپین قبل از شروع درمان‌های سرطان به عنوان یکی از راه‌های جلوگیری از عوارض ناشی از این درمان‌ها پیشنهاد شده است (3). تاکنون از آنالوگ‌های مختلف هورمون آزاد کننده گنادوتروپین برای برگرداندن باروری در بالغین استفاده شده ولی در نابالغین مطالعه‌ای صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر یکی از آنالوگ‌های هورمون آزاد کننده گنادوتروپین، به نام لپرولید بر تعداد و تحرک اسپرم‌ها در موش‌های نابالغ مدل آزواسپرمی با بوسولفان می‌باشد. شاید بتوان از نتایج این مطالعه در برگرداندن باروری به افرادی که دچار سرطان در دوران کودکی و متعاقب آن ناباروری می‌شوند استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد و شاهد از موش‌های نر دو هفته نژاد (National Medical Research NMRI Institute) استفاده شد. موش‌ها در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی اراک و در شرایط 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس ضوابط دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام گردید. تعداد 36 سر موش نر 2 هفته به صورت تصادفی در 9 گروه به ترتیبی که در شکل 1 نشان داده شده قرار گرفتند (4 گروه درمانی، 4 گروه کنترل، 1 گروه نرمال). گروه‌های 1 و 2 دو هفته بعد از دریافت بوسولفان به ترتیب یک و دو دوز از داروی لپرولید دریافت کردند. گروه‌های 3 و 4 دو هفته قبل از تزریق بوسولفان داروی لپرولید را دریافت کردند و بعد از دریافت بوسولفان به ترتیب یک و دو دوز از داروی لپرولید را دریافت کردند. برای هر گروه یک گروه کنترل در نظر گرفته شد. گروه کنترل گروهی است که فقط بوسولفان دریافت کرده است. یک گروه نرمال هم که هیچ‌گونه دارویی دریافت نکرده هم در نظر گرفته شد.

اسپرماتوژنز فرآیند پویایی است که می‌تواند منجر به تولید اسپرم در تمام طول عمر یک فرد بالغ شود. اساس این فرآیند، سلولی به نام سلول بنیادی اسپرماتوگونی است که با تکثیر و تمایز خود باعث ادامه اسپرماتوژنز می‌گردد (1). امروزه از داروهای شیمی درمانی به صورت گسترده در درمان بیماران مبتلا به سرطان استفاده می‌شود. این داروها دارای عوارض جانبی متعددی از جمله اختلالات رشد، مشکلات عصبی و اختلالات باروری مانند الیگواسپرمی یا آزواسپرمی می‌باشند (2). با توجه به پیشرفت‌های وسیعی که در درمان سرطان صورت گرفته، بسیاری از مبتلایان عمر طولانی‌تری داشته و بهبود می‌یابند، از این رو یکی از مشکلات این افراد عوارض جانبی حاصل از داروهای شیمی درمانی می‌باشد (3). در اثر تماس با اشعه یا داروهای شیمی درمانی، به دلیل حساس تر بودن سلول‌های اسپرماتوگونی‌های در حال تمایز، این سلول‌ها به سرعت از بین می‌روند و در نتیجه تعداد اسپرم‌ها کاهش یافته و آزواسپرمی موقت ایجاد می‌شود (4). در سرطان‌هایی مانند لوسمی لنفوبلاستی حاد، تومورهای سلول‌های زایا و لنفوم هوچکین که میزان بهبودی در آنها بالا می‌باشد، بهبود یافتگان دچار درجاتی از ناباروری یا عقیمی کامل می‌شوند (3). توانایی بیضه در برگرداندن اسپرماتوژنز به حضور سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و توانایی آنها در بازسازی سلول‌های در حال تمایز بستگی دارد. البته این احتمال وجود دارد که بعد از قرار گرفتن در معرض اشعه یا داروهای شیمی درمانی، این سلول‌ها توانایی تکثیر و تمایز خود را از دست بدهند (5). در بالغین یکی از روش‌های برگرداندن باروری منجمد کردن اسپرم‌ها، قبل از شروع درمان سرطان است. از آن‌جا که قبل از بلوغ در بیضه اسپرم یا اسپرماتیدی وجود ندارد، انجماد اسپرم برای این افراد موثر نخواهد بود (6-7). لذا در افراد نابالغ از سایر روش‌ها برای برگرداندن باروری باید استفاده شود. مطالعات نشان داده که استفاده از موادی که تستسترون داخل بیضه را کاهش می‌دهند همانند آنالوگ‌های هورمون آزاد کننده



شکل 1. دیاگرام تزریق دارو به گروه‌های درمانی مختلف

10 میکرولیتر از اسپرم‌های به دست آمده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 400 مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با کمک لام نئوبار پارامترهای تعداد و تحرک توسط دو نفر که از نمونه‌ها اطلاعی نداشتند (blind) مورد ارزیابی واقع شد. به این منظور در چندین میدان میکروسکوپ به صورت تصادفی اسپرم‌ها ارزیابی و از اعداد حاصل میانگین گرفته شد. میزان حرکت هم بر اساس قرارداد سازمان بهداشت جهانی، در سه گروه طبقه بندی شدند: اسپرم پیشرونده دارای حرکت سریع و رو به جلو می‌باشد. اسپرم با حرکت غیر پیشرونده دارای سایر الگوهای حرکتی می‌باشند. اسپرم‌های بی تحرک فاقد ثابت می‌باشد (10).

در پایان جهت بررسی بین گروهی از روش آنالیز واریانس یک طرفه آنووا و جهت بررسی بین دو گروه از تی تست استفاده شد و سطح معنی داری نیز کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

با توجه به این که بوسولفان باعث سرکوب مغز استخوان و توقف رشد می‌شود مقدار دوز بوسولفان در گروه‌های 1 و 2 که سن کمتری داشتند 20 میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن موش و در گروه‌های 3 و 4، 40 میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن موش به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. میزان لپرولید هم 3/8 میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن موش به صورت داخل جلدی تزریق شد. بر اساس مطالعات قبلی فاصله تزریق‌های لپرولید 4 هفته محاسبه گردید (8، 9).

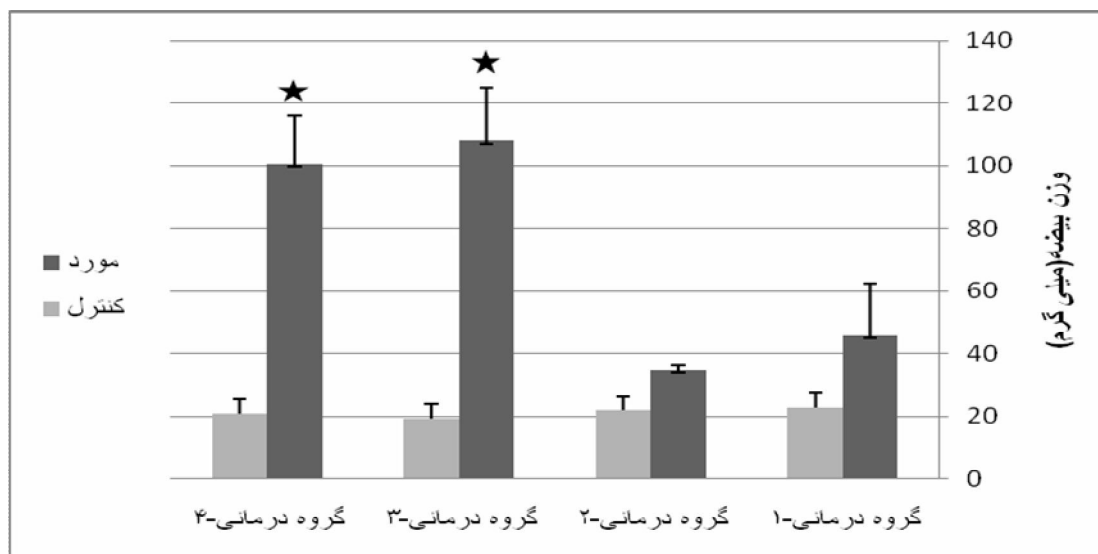
شمارش و بررسی تحرک اسپرم

در هنگام بررسی هر گروه، موش‌ها توسط جا به جایی مهره‌های گردنی (Cervical dislocation) کشته شدند. بعد از باز کردن حفره شکم، دم اپیدیدیم در هر دو طرف جدا شد و در سرم فیزیولوژی قرار گرفت. بیضه حیوانات هم بعد از جدا کردن و قرار دادن روی کاغذ صافی جهت خشک شدن مایعات اطراف توسط ترازو وزن گردید. با استفاده از سوزن سوراخ‌هایی در اپیدیدیم ایجاد شد و درون انکوباتور قرار گرفت تا اسپرم‌ها خارج شوند.

یافته‌ها

در این مطالعه وزن بیضه‌ها بعد از خارج کردن از بدن حیوان اندازه‌گیری و با گروه کنترل خود با آنالیز آماری تی تست مقایسه شد. مطالعه حاضر نشان داد حیواناتی که بوسولفان دریافت کرده بودند این دارو منجر به کاهش وزن بیضه‌ها گردیده بود اما بعد از استفاده از لپرولید وزن بیضه دوباره به حالت اول برگشت. در گروه‌های درمانی 1 و 2 که

لپرولید را بعد از تزریق بوسولفان دریافت کردند میزان وزن بیضه افزایش یافت اما این افزایش وزن در این گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت ($p \geq 0/05$). در گروه‌های درمانی سوم و چهارم میزان افزایش وزن بیضه قابل توجه بود و با گروه کنترل تفاوت معنی داری داشت ($p \leq 0/05$) (شکل 2).



شکل 2. بررسی تفاوت وزن بیضه در گروه‌های درمانی مختلف. در گروه‌های درمانی 3 و 4 وزن بیضه به میزان قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. $p \leq 0/05$ *

بی‌حرکت بودند ($80 \pm 14/1$ درصد) و بقیه اسپرم‌ها دارای حرکت درجا بودند ($20 \pm 14/1$ درصد). استفاده از لپرولید بعد از تزریق بوسولفان تغییر معنی داری در تحرک اسپرم‌ها ایجاد نکرد ولی لپرولید تراپی قبل از تزریق بوسولفان باعث بهبود تحرک اسپرم‌ها گردید ($p \leq 0/05$). تزریق لپرولید باعث افزایش میزان حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها در گروه‌های درمانی 3 (32 ± 2 درصد) و 4 ($54/6 \pm 6/4$ درصد) در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار شد ($p \leq 0/05$). تعداد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده در گروه درمانی 4 در مقایسه با گروه درمانی 3 به صورت معنی داری بیشتر بود ($p \leq 0/05$). تزریق لپرولید بر حرکت درجا و غیر پیش‌رونده اسپرم‌ها تاثیری نداشت اما باعث کاهش معنی‌دار

در مورد هر گروه شمارش اسپرم صورت گرفت و بعد از انجام آنالیز آماری مشخص شد بوسولفان باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌شود اما استفاده از لپرولید این کاهش را تا حدی جبران می‌کند اما بر اساس مطالعه ما این افزایش به صورت معنی دار نمی‌باشد ($p \geq 0/05$).

در تمام گروه‌ها میزان حرکت اسپرم‌ها (جدول 1) مورد ارزیابی قرار گرفت و حرکت اسپرم‌های تمام گروه‌ها با هم و با گروه‌های کنترل و نرمال با استفاده از تست آماری آنووا مقایسه شد. نتایج نشان داد بوسولفان منجر به کاهش حرکت اسپرم‌ها می‌شود. در گروه کنترل که حیوانات فقط بوسولفان دریافت کرده بودند میزان اسپرم‌های متحرک با حرکت پیش‌رونده بسیار کم بود و بیشتر اسپرم‌ها به صورت

تعداد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه‌های درمانی 3 و 4 (45/6±2/1 درصد) و 4 (26±13/5 درصد) در مقایسه با گروه کنترل شد. گروه‌های درمانی 3 و 4 در این زمینه تفاوت معنی داری با هم نداشتند.

جدول 1. بررسی میزان تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های درمانی مختلف

گروه‌ها پارامترها	نرمال	کنترل	گروه درمانی 1	گروه درمانی 2	گروه درمانی 3	گروه درمانی 4
حرکت پیشرونده (درصد)	37/5±17/7*	0±0	21±1/4	20±1/4	32±2*	54/7±6/4**
حرکت غیر پیشرونده (درصد)	37/5±10/6	20±14/1	16±1/4	19±1/4	22/3±4	19/3±8/1
ثابت (درصد)	25±7*	80±14/1	63±2/8	61±2/8	45/7±2/1*	26±13/5*

* تفاوت معنی دار با گروه کنترل (p≤0/05)

** تفاوت معنی دار با گروه درمانی 3 (p≤0/05)

بحث

این دارو بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی بیشتر از سایر سلول‌ها تاثیر دارد (13). استفاده از داروهای آلکیلینگ در 90-100 درصد مردان منجر به آزواسپرمی و در 25-5 درصد زنان موجب اختلال در عملکرد تخمدان می‌شود (14). مطالعه کلیش و همکارانش نشان داد که 68 درصد افرادی که از داروهای آلکیلینگ جهت شیمی درمانی استفاده نمودند 1 تا 20 سال بعد از قطع دارو به صورت آزواسپرمی باقی ماندند (15).

یکی از راه‌هایی که به نظر می‌رسد تا حدودی می‌تواند به بازگرداندن باروری به این افراد کمک کند هورمون درمانی است. در زنان هم استفاده از داروهای آزاد کننده گنادوتروپین به همراه داروهای شیمی درمانی منجر به بهبود وضعیت باروری می‌شود (16، 17). در مطالعه حاضر از لپروئید که یک آنتا گونیست آزاد کننده گنادوتروپین می‌باشد استفاده گردید. با استفاده از این دارو وزن بیضه‌ها افزایش یافت. میستریچ و همکارانش نشان دادند که استفاده از زولادکس که آن هم یک آنتا گونیست آزاد کننده گنادوتروپین می‌باشد باعث افزایش وزن بیضه‌ها می‌شود (8). مطالعه حاضر نشان داد شروع هورمون درمانی قبل از انجام شیمی درمانی حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها را افزایش می‌دهد و از طرف دیگر باعث کاهش اسپرم‌های ثابت می‌شود. اما

مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آنالوگ‌های هورمون آزاد کننده گنادوتروپین می‌تواند در برگرداندن باروری به افراد نابالغ که تحت شیمی درمانی قرار می‌گیرند موثر باشد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند یکی از عوارض درمان‌های سرطان (شیمی درمانی و رادیوتراپی) ایجاد اختلال در باروری می‌باشد. یکی از این اختلالات از بین رفتن سلول‌های پیش ساز اسپرم در بیضه است. این درمان‌ها متعاقباً منجر به اختلال در تشکیل اسپرم بعد از بلوغ می‌شود. داروهای مختلفی جهت شیمی درمانی استفاده می‌شود که دارای عوارض سمی بر سلول‌های اسپرماتوگونی هستند. به طور کلی سلول‌های اسپرماتوگونی به دلیل تقسیم سریع، نسبت به اکثر این داروها حساس می‌باشند (11). یکی از داروهای آنتی بلاستی که در درمان سرطان کاربرد دارد بوسولفان است. این دارو متعلق به خانواده آلکیلینگ (Alkylating) بوده و به سرعت سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را از بین می‌برد. استفاده از این دارو به دلیل از بین بردن سلول‌های زایا در مغز استخوان می‌تواند منجر به مرگ شود (12). میستریچ و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که بعد از استفاده از بوسولفان تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در حال تمایز کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد

درمان باعث افزایش بهبود حرکت اسپرم‌ها در موش‌های نابالغ می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره 805 و کد اخلاقی 5-133-91-مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک تشکر می‌گردد.

منابع

1. 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(1):236-44.
2. Lewis RW, Dowling KJ, Schally AV. D-Tryptophan-6 analog of luteinizing hormone-releasing hormone as a protective agent against testicular damage caused by cyclophosphamide in baboons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(9):2975-9.
3. Pogach L, Lee Y, Gould S, Giglio W, Huang H. Partial prevention of procarbazine induced germinal cell aplasia in rats by sequential GnRH antagonist and testosterone administration. *Cancer research*. 1988;48(15):4354-60.
4. Meistrich M. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *European urology*. 1992;23(1):136-41.
5. Shuttlesworth GA, De Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, et al. Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology*. 2000;141(1):37-49.
6. Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, et al. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model:

استفاده از لپروئید بعد از شروع شیمی درمانی تاثیر معنی داری بر حرکت اسپرم‌ها نداشت. هم‌چنین این مطالعه نشان داد استفاده از دو دوز لپروئید بعد از شروع شیمی درمانی اثر بهتری در مقایسه با یک دوز دارد. گلود و همکارانش اولین بار نشان دادند که استفاده از آگونیست آزاد کننده گنادوتروپین قبل از شروع درمان با سیکلوفسفامید باعث حفاظت بیضه‌های موش‌های بالغ می‌شود (18). لویس و همکارانش همین مطالعه را در مورد بابون‌ها انجام دادند و نشان دادند که این روش باعث حفاظت بیضه بابون‌های بالغ می‌شود (2). مطالعه کویینترو و همکارانش نشان داد که استفاده از داروهای آزاد کننده گنادوتروپین در زنان مبتلا به سرطان هم باعث بهبود قابل توجه در عملکرد تخمدان‌ها می‌شود (19). شالی و همکاران هم نشان دادند که علاوه بر آگونیست آزاد کننده گنادوتروپین، آنتا گونیست آن هم باعث حفاظت بیضه رت‌های بالغ در برابر رادیوتراپی می‌شود (20). به نظر می‌رسد استفاده از این داروها ابتدا باعث افزایش موقت سطح هورمون‌های محرک فولیکولی، جسم زرد و تستسترون و متعاقب آن به دلیل مکانیسم فیدبک باعث کاهش آنها می‌شود (1). این وقفه موقت در محور هیپوفیزی- گنادی باعث کاهش عوارض سمیت تجویز سیستماتیک داروهای شیمی درمانی بر گنادها شده و بهبود عملکرد بیضه‌ها می‌شود (18). علاوه بر این مشخص شده که لپروئید در بلوغ، تکثیر و زنده ماندن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به صورت مستقیم نقش دارد. هم‌چنین مشخص شده که لپروئید بر روی گیرنده‌های آزاد کننده گنادوتروپین سلول‌های لیدینگ اثر کرده و با تحریک این سلول‌ها برای ترشح فاکتورهای پاراکرین محیط سلول‌های زایا را تغییر داده و منجر به بهبود اسپرماتوژنز و متعاقب آن هایپرتروفی بیضه و افزایش سطح لوله‌های سمی نفروس هم امکان پذیر می‌شود (1).

نتیجه گیری

استفاده از آگونیست آزاد کننده گنادوتروپین قبل از انجام درمان‌های مربوط به سرطان و تداوم آن در طی

- Fertility preservation after chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Hematological oncology*. 2010;28(4):168-79.
15. Kliesch S, Behre HM, Juergens H, Nieschlag E. Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Medical and pediatric oncology*. 1996;26(1):20-7.
 16. Bedaiwy MA, Abou-Setta AM, Desai N, Hurd W, Starks D, El-Nashar SA, et al. Gonadotropin-releasing hormone analog cotreatment for preservation of ovarian function during gonadotoxic chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2011;95(3):906-14. e4.
 17. Clowse ME, Behera MA, Anders CK, Copland S, Coffman CJ, Leppert PC, et al. Ovarian preservation by GnRH agonists during chemotherapy: a meta-analysis. *Journal of Women's Health*. 2009;18(3):311-9.
 18. Glode LM, Robinson J, Gould S. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *The Lancet*. 1981;317(8230):1132-4.
 19. Quintero RB, Helmer A, Huang JQ, Westphal LM. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. *Fertility and sterility*. 2010;93(3):865-8.
 20. Schally AV, Paz-Bouza JI, Schlosser JV, Karashima T, Debeljuk L, Gandle B, et al. Protective effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone against x-radiation-induced testicular damage in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(3):851-5.
 - potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer research*. 2006;66(23):11166-71.
 7. Geens M, Goossens E, De Block G, Ning L, Van Saen D, Tournaye H. Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application. *Human reproduction update*. 2008;14(2):121-30.
 8. Meistrich ML, Kangasniemi M. Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia. *Journal of andrology*. 1997;18(1):80-7.
 9. Okada H, Doken Y, Ogawa Y, Toguchi H. Sustained suppression of the pituitary-gonadal axis by leuprorelin three-month depot microspheres in rats and dogs. *Pharmaceutical research*. 1994;11(8):1199-203.
 10. Vahidi A, Khalili M, Amini-rad O. Effects of Different Doses of Adenosine on Sperm Motility in Infertile Men. *ZUMS Journal*. 2011;19(76):48-57.[Persian]
 11. Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S. Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future: Opinion. *Human Reproduction*. 2000;15(10):2154-9.
 12. Vecino P, Uranga J, Arechaga J. Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma*. 2001;217(4):191-8.
 13. Meistrich M. Stage-specific sensitivity of spermatogonia to different chemotherapeutic drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy* 1984;38(3):137-8.
 14. Van der Kaaij MA, van Echten-Arends J, Simons AH, Kluin-Nelemans HC.