نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۲): ۹۹-۱۰۶.

تأثیر ال-کارنیتین بر شاخص‌های اسپرمی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سمیت ناشی از بوسولفان در مدل حیوانی موش صحرایی

رضا زنگویی[۱]، حمیدرضا اشراقی[۱]، صادق شیریان[۲،۳*]، علی کدیور[۴]، بهنام بختیاری مقدم[۲]، احسان عالی[۵]

۱. گروه علوم پایه دامپزشکی، واحدعلوم وتحقیقات دانشگاه آزاداسلامی، تهران- ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. مرکز تحقیقات مولوکولار پاتولوژی شیراز، آزمایشگاه دکتر دانشبد، شیراز- ایران.
۴. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۵. گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین- ایران.

دریافت: ۱۴ اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۹ **پذیرش:** ۲۶ بهمن‌ماه ۱۳۹۹

چکیده

بوسولفان به عنوان یک داروی شیمی درمانی، به صورت گسترده برای درمان سرطانهایی مانند لنفوم، لوسمی و در موارد پیوند استخوان استفاده می‌شود، بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی ال-کارنیتین بر شاخص‌های اسپرم و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) و غلظت مالون دی الدئیددر بافت بیضه در مدل حیوانی رت بود. ۲۴سرموش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند: گروه بوسولفان، گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان، گروه شم و گروه کنترل. گروه بوسولفان و ال-کارنیتین+بوسولفان ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بوسولفان داخل صفاقی در زمان شروع و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ۱۴ روز بعد از تزریق اول دریافت کردند. گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم/روزانه دریافت کردند.گروه شم دی متیل سولفواکسید (DMSO) ۰/۲ میلی‌لیتر به ازای هر رت به عنوان حلال بوسولفان و گروه کنترل ۰/۲ میلی‌لیتر نرمال سالین داخل صفاقی روزانه دریافت کردند. شاخص‌های اسپرمی مانند میانگین تعداد اسپرم در دم اپیدیدیم، اسپرم زنده و اسپرم های متحرک در هر گروه شمارش و مقایسه شد. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و میزان مالون دی الدئید و میزان پروتئین تام و نسبت هر آنزیم به پروتئین تام در بیضه رت‌ها اندازه‌گیری و مقایسه شد. نتایج حاصل از شاخص‌های اسپرم نشان داد بیشترین میانگین تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرم زنده در گروه کنترل و سپس گروه‌های شم، ال-کارنیتین+ بوسولفان و بوسولفان بود. میانگین هر سه شاخص اسپرم به طور معنی‌داری در گروه بوسولفان نسبت به همه گروه‌ها تفاوت داشت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان مالون دی‌الدیئد و کمترین فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در گروه بوسولفان، سپس ال-کارنیتین+ بوسولفان ، شم و گروه کنترل بود. درحالی که بیشترین فعالیت آنزیمی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و کمترین میزان مالون دی آلدئید مربوط به گروه کنترل و سپس شم بود، بنابراین ال-کارنیتین نقایص ایجاد شده در شاخص‌های اسپرمی ناشی از القای استرس اکسیداتیو با بوسولفان را بهبود می بخشد.

واژه‌های کلیدی: بوسولفان، کاتالاز، مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، شاخص‌های اسپرمی، ال-کارنیتین.

مقدمه

ناباروری و کاهش باروری یک از عواض مهم شیمی درمانی در مردان و یکی از مسائل مهم علم پزشکی است. اسپرماتوژنز روندی است که در اثر تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمایی رخ می دهد. این روند پیچیده ممکن است در اثر شیمی درمانی تحت تاثیر قرار گیرد (۱۷). پیشرفتهای علم سرطان شناسی در زمینه‌ی تشخیص و درمان سرطان باعث افزایش چشم‌گیر احتمال زنده ماندن افراد جوان مبتلا به سرطان های بدخیم شده است. ۵ درصد سرطان‌ها در افراد زیر ۳۵ سال دیده می-

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shirian85@gmail.com

شوند. امروزه، ۸۵ درصد تومورها در کودکان و مردان جوان درمان می‌شوند (۱۱و ۱۲). عوامل متعددی با تأثیر بر اسپرماتوژنز، باعث کاهش کیفیت و میزان تولید اسپرم می‌گردند. یکی از داروهای رایج شیمی درمانی استفاده شده برای موارد سرطان بوسولفان است (۶). بوسولفان یک داروی شیمی درمانی موثر است که به طور گسترده برای درمان سرطان و در موارد پیوند مغز استخوان استفاده می‌شود (۶). بوسولفان از طریق اتصال به یکی از رشته‌های مولکول DNA ازهمانند سازی رشته DNA و در نتیجه از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند که به توقف تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال منجر می‌شود (۱۵)؛ اگرچه از سویی بوسولفان دارای اثرات مفیدی بر طول عمر بیماران است یکی از اثرات جانبی تجویز دراز مدت داروی‌های شیمی درمانی مانند بوسولفان در درمان سرطان، به‌ویژه لنفوم و لوسمی و همچنین در پیوند اعضا القای ناباروری از طریق القای استرس اکسیداتیو است(۲۲). مطالعات نشان داده‌است که برخی درمان های خوراکی یا تزریقی مانند، آرژینین، ملاتونین، سلنیوم، آتورواستاتین، روی، ویتامین B12 و نیز آنتی اکسیدان‌های زیادی مثل ویتامین C، ویتامین E، کوآنزیم Q10 و گلوتاتیون سبب بهبود شاخص‌های اسپرم (مانند حرکت اسپرم و تعداد اسپرم) و در نتیجه افزایش باروری می‌شوند (۳، ۵، ۱۸ و ۲۰)؛ اگرچه، نتایج برخی مطالعات در باره تاثیر این مکمل های خوراکی بر آپوپتوز و باروری متناقض است. ال-کارنیتین ترکیبی است که از اسید آمینه لیزین و متیونین سنتز می‌گردد و دارای نقش بسیار مهمی در تولید انرژی و متابولیسم چربی‌هاست. ال-کارنیتین در انتقال اسیدهای چرب از سیتوزول به داخل میتوکندری به منظور تولید انرژی ایفای نقش می‌کند. اثرات محافظتی و آنتی اکسیدانی ال-کارنیتین در مطالعات زیادی اثبات شده است(۷و ۱۳). در مطالعات مختلف ارتباط بین ال کارنینین و ناباروری نیز نشان داده شده است(۱و ۱۴)، بنابراین با توجه به نقش آنتی اکسیدانی ال-کارنیتین در دستگاه‌های مختلف از جمله دستگاه تولیدمثلی نر، در این مطالعه نقش محافظتیال-کارنیتین به عنوان یک آنتی اکسیدان روی شاخص‌های اسپرم واختلال فعالیت های آنزیمی آنتی اکسیدانناشی از بوسولفان در رت نر طراحی شد.

مواد و روش کار

در این پژوهش ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ جنسی از نژاد Wistar با وزن تقریبی۲۵۰-۲۲۰ گرم و سن تقریبی ۳-۲ ماه از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد خریداری شد. در ابتدا موش‌ها به منظور سازگاری با محیط به مدت ۲ هفته، ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی بودند و آب و غذای کافی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. هرگروه شامل ۶ سرموش، تقسیم شدند. گروه‌ها شامل گروه کنترل (دریافت کننده نرمال سالین)، گروه دریافت کننده بوسولفان، گروه شم یا گروه دریافت حلال بوسولفان (DMSO)، گروه دریافت کننده بوسولفان+ ال-کارنیتین. رت‌های دریافت کننده بوسولفان بعد از انطباق با محیط، داروی بوسولفان شرکت سیگما (B2635-25g) ساخت کشور آمریکا را در دو نوبت با فاصله دو هفته با دوز ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم داخل صفاقی دریافت کردند (۲۱). گروه شم فقط حلال بوسولفان یا DMSO و گروه کنترل نرمال سالین به میزان ۰/۲ میلی لیتر داخل صفاقی دریافت کردند. در گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان، تزریق دارو به صورت ۱۰۰ میلی‌گرم داخل صفاقی روزانه به مدت ۵ هفته صورت می‌گرفت؛ پس از گذشت ۵ هفته، حیوانات بی‌هوش و سپس اوتانازی شدند. به منظور ارزیابی شاخص‌های مربوط به اسپرم مانند درصد اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های غیر متحرک و تعداد کل اسپرم، دم اپیدیدیم جدا شد و در یک پتری دیش تکه تکه و در ۱ میلی لیتر محلول HTF مدت ۱۰ دقیقه در شرایط ۳۷℃ و رطوبت ۵ درصد انکوبه شد و پس از تکان دادن میکروتیوب با سمپلر ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته و روی لام مخصوص CASA قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ درصد اسپرم‌های متحرک اندازه‌گیری شد، سپس سوسپانسیون اسپرم با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و پلت حاوی اسپرم جدا شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی هر فالکون به وسیله پیپت پاستور یا سمپلر دور ریخته شد و پلت‌های حاوی اسپرم در هر لوله، با استفاده از پیپت پاستور یا سمپلر جمع و به یک لوله منتقل گردید. نمونه‌های بافت بیضه جدا و تا انجام آزمایش‌های آنتی اکسیدان در فریزر ۷۰- نگه‌داری شدند .

به منظور تعیین میزان اسپرم ۲۰ میکرولیتر از رنگ Eosin Y- Nigrosonبه حجم مساوی سوسپانسیون اسپرم اضافه شد و پس از انکوباسیون در دمای اتاق، در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. رنگ ائوزین فقط اسپرم های مرده را رنگ و به صورت صورتی تیره نمایان می‌کند درحالی که اسپرم های زنده سفید باقی می‌مانند.

تعیین غلظت اسپرم‌ها به روش zangoie و همکاران در سال ۲۰۱۹ با لام نئوبار انجام شد. به منظور شمارش تعداد اسپرم‌های موجود در نمونه‌های تغلیظ شده، ۱ میکرولیتر از پلت حاوی اسپرم که در مرحله قبل تهیه شده بود با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر (به نسبت ۱:۹۹) به خوبی مخلوط و رقیق و مخلوط رقیق شده با سمپلر، زیر لام نئوبار تزریق شد. لام حاوی اسپرم به مدت چهار دقیقه در یک محیط مرطوب قرار گرفت تا اسپرم‌ها ثابت شوند، سپس لام نئوبار را در زیر میکروسکوپ نوری قرار داده و تعداد اسپرم‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰ شمارش شد.

برای اندازه گیری پروتئین تام از محلول آماده Bradford محصول شرکت سیگما استفاده شد. ابتدا ۱/۵ میکرولیتر از هر نمونه به ۲۰۰ میکرولیتر معرف برادفورد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. برای تهیه بلانک، ۱/۵ میکرو لیتر از محلول PBS به ۲۰۰ میکرو لیتر معرف برادفورد اضافه گردید و همراه با نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب نوری در طول‌موج ۵۹۵ nm خوانده شد.

برای سنجش نهایی از معادله استاندارد تهیه شده با پروتئین BSA (Bovine serum albumin) استفاده شد. به منظور تهیه معادله استاندارد از پروتئین BSA با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و جذب نوری هر غلظت با استفاده از محلول آماده برادفورد در طول‌موج۵۹۵ nm خوانده شد، سپس با استفاده از اعداد به‌دست‌آمده معادله استاندارد تهیه شد. با استفاده از جذب نوری نمونه‌ها و معادله تهیه‌شده، غلظت پروتئین کل نمونه‌ها محاسبه گردید. معادله استاندارد به شرح زیر است:

$$C_{\mu g/ml} = \frac{OD - 0.001}{0.454}$$

C: غلظت پروتئین کل

OD: جذب نوری نمونه

به منظور اندازه گیری سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز از کیت شرکت کیا زیست پیشرو همدان طبق دستور شرکت سازنده استفاده شد.

IU SOD = inhibition rate 50%

با محاسبه پروتئین تام نمونه ها نرمال سازی مقادیر SOD انجام شد و به صورت *IU/mg* گزارش شد.

میکرومل کاتالاز هر نمونه نیز طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت کاتالاز } \mu mol/min/mL = \times \frac{0/24}{0/02} \times \frac{\mu M \text{ نمونه}}{20}$$

ضریب رقت نمونه با محاسبه پروتئین تام نمونه ها نرمال سازی مقادیر کاتالاز انجام شد و به صورت µmol/min/mg گزارش شد.

برای اندازه‌گیری مالون دی آلدئید با آزمون TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) مقدار ۹۰۰ میکرولیتر از ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کار شامل محلول اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال حاوی ۰/۳۷۵ گرم از تیوباربیوتوریک و ۱۵ گرم اسید تری کلرو استیک ساخته شده برای هر نمونه، داخل میکروتیوب ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های بافت آماده شده به آن اضافه گردید. برای تهیه بلانک، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده، افزوده شد و سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌ها از بن ماری خارج و در دمای اتاق سرد شدند، سپس نمونه‌ها با سرعت ۲۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی برداشته شد و جذب نوری هر نمونه درون دستگاه اسپکتروفتومتر مدل JENWAY 6305 در مقابل بلانک در طول موج ۵۳۵ nm خوانده شد. در نهایت با فرمول زیر غلظت مالون دی آلدئید محاسبه گردید:

$$C_{\mu M/L} = \frac{OD * 100}{1/56}$$

C: غلظت مالون دی‌آلدئید

OD: جذب نوری نمونه

µM/L: میکرو مولار بر لیتر

در نهایت و به منظور آنالیز آماری و مقایسه میانگین

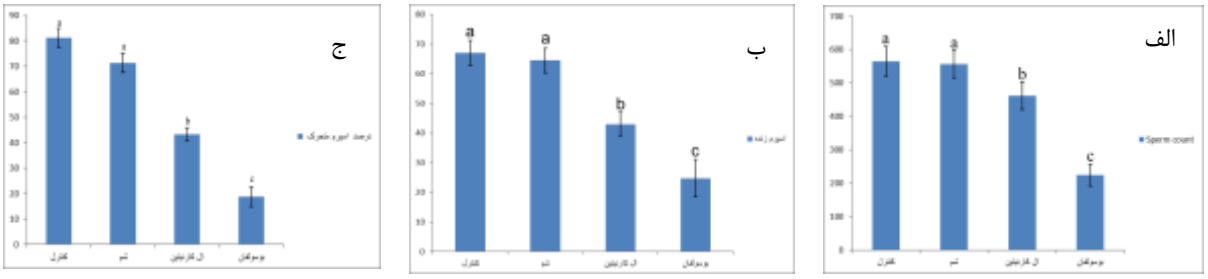
داده‌ها از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ استفاده شد. مقایسه متغییرها بین گروه های با آنالیز آماری واریانس یک طرفه انجام شد به منظور بررسی معنی‌داری در سطح p کمتر از ۰/۰۵ از انالیز آماری توکی استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از میانگین اسپرم کل در گروه های مختلف نشان داد که بیشترین میانگین تعداد اسپرم مربوط به گروه کنترل و کمترین میانگین تعداد اسپرم مربوط به گروه بوسولفان بود. میانگین تعداد اسپرم در گروه ال-کارنیتین + بوسولفان نسبت به گروه بوسولفان به تنهایی (P<۰/۰۰۱) و در گروه کنترل (P=۰/۰۰۶) و شم (P=۰/۰۳) نسبت به گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱- الف).

نتایج حاصل از میانگین درصد اسپرم‌های زنده در گروه های مختلف نشان داد که بیشترین میانگین درصد اسپرم زنده مربوط به گروه کنترل و کمترین میانگین درصداسپرم زنده مربوط به گروه بوسولفان بود. میانگین درصد اسپرم زنده در گروه ال-کارنیتین+بوسولفان نسبت به گروه بوسولفان افزایش (P=۰/۰۰۲) و نسبت به گروه کنترل (P=۰/۰۰۱) و شم (P=۰/۰۲۱) کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱، ب).

نتایج حاصل از میانگین درصد اسپرم های متحرک در گروه های مختلف نشان داد که بیشترین میانگین درصد اسپرم متحرک مربوط به گروه کنترل و کمترین میانگین درصد اسپرم متحرک مربوط به گروه بوسولفان بود. میانگین درصد اسپرم متحرک در گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان نسبت به گروه بوسولفان افزایش (P<۰/۰۰۱) و نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۱) و شم کاهش (P<۰/۰۰۱) معنی داری را نشان داد (شکل ۱، ج).



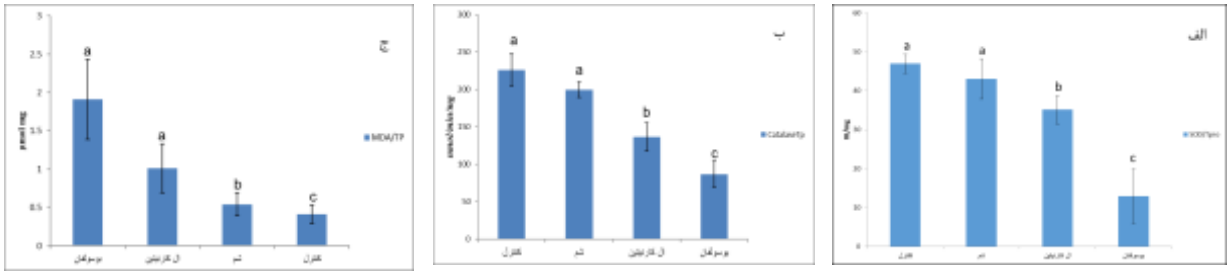
شکل ۱- میانگین درصد اسپرم کل (الف)، اسپرم زنده (ب) و اسپرم متحرک (ج) در گروه های مختلف.
[a,b,c] حروف انگلیسی بالای هر ستون متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در گروه‌هاست (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از میانگین فعالیت آنزیم SOD/ پروتئین تام، در بافت بیضه نشان داد که بیشترین میانگین فعالیت این آنزیم در گروه کنترل و سپس شم، ال-کارنیتین+ بوسولفان و بوسولفان است.

آنالیز آماری توکی اختلاف معنی‌داری در گروه بوسوفان با همه گروه‌های از جمله از جمله گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)، گروه شم (P<۰/۰۰۱) و گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان در فعالیت آنزیم SOD/پروتیئن تام، نشان داد. گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD/ پروتئین تام نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۱) و شم (P=۰/۰۱) را نشان داد.

نتایج حاصل از فعالیت آنزیم کاتالاز/پروتئین تام بیشترین فعالیت در گروه شم و گروه کنترل و سپس گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان بود. آنالیز آماری توکی اختلاف معنی‌دار گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)، گروه شم (P<۰/۰۰۱)، گروه ال-کارنیتین+ بوسولفان (P=۰/۰۰۳) با گروه بوسولفان از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز/پروتئین تام نشان داد.

نتایج حاصل از میانگین فعالیت آنزیم MDA/ پروتئین تام در بافت بیضه نشان داد که کمترین میانگین فعالیت مربوط به گروه کنترل و بیشترین میانگین فعالیت آنزیم MDA/ پروتئین تام مربوط به گروه بوسولفان است(شکل ۲-ج). در گروه درمانی با ال-کارنیتین+ بوسولفان به طور معنی‌داری نسبت به گروه بوسولفان کاهش (P<۰/۰۰۱) و نسبت به گروه شم (P<۰/۰۰۱) و کنترل افزایش (P<۰/۰۰۱) فعالیت آنزیم MDA / پروتئین تام را نشان داد.



شکل ۲- میانگین فعالیت آنزیم SOD، کاتالاز و MDA به پروتئین تام در بافت بیضه در گروه‌های مختلف.
[a,b,c]حروف انگلیسی بالای هر ستون متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در گروه هاست (P<۰/۰۵).

بحث

هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی اکسیدانی داروی ال-کارنیتین بر تغییرات اسپرماتوگرام و استرس اکسیداتیو در بافت بیضه ناشی از تزریق داخل صفاقی بوسولفان در مدل حیوانی رت نر طی یک دوره ۵ هفته بود؛ با توجه به آن که دوره اسپرماتوژنز در رت بین ۴ تا ۶ هفته گزارش شده است (۱۷)، دوره ۵ هفته برای مطالعه انتخاب شد. تزریق بوسولفان با دو دوز به فاصله دو هفته انجام شد (۲۱). مطابق مطالعات قبلی با توجه به نتایج اسپرماتوگرام بوسولفان در اسپرماتوژنز ایجاد اختلال کرد و با توجه به نتایج فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مشخص شد که این دارو سبب القای استرس اکسیداتیو و احیانا ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال می‌کند و از این طریق سبب کاهش شاخص‌های اسپرم و ناباروری می‌شود. در این مطالعه نتایج حاصل از درمان با ال-کارنیتین نشان داد که تزریق روزانه و به صورت صفاقی می‌تواند سبب کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز شود و همچنین میزان مالون دی آلدئید را کاهش دهد و در نهایت بهبود شاخص‌های اسپرم نسبت به گروه بوسولفان شود؛ اگرچه این دارو نسبت به گروه کنترل و شم که فقط حلال بوسولفان را دریافت کرده بودند فعالیت آنزیمی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز کمتر و میزان مالون دی الدئید بیشتری داشتند که همین امر نشان می‌دهد که اثرات استرس اکسیداتیو بر سیستم تولید مثلی تا حدی قابل برگشت است. علت کاهش کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه بوسولفان به علت مصرف این آنزیم‌ها در اثر تولید بیش از اندازه رادیکال آزاد است و علت افزایش میزان مالون دی الدئید در این گروه به این علت است که مالون دی‌الدئید حاصل تخریب و اکسیداسیون فسفولیپیدها و چربی های غیر اشباع در اثر گونه‌ای اکسیژن فعال است(۸). یکی از اثرات جانبی بوسولفان که در شیمی درمانی و پیوند مغز استخوان تجویز می‌شود، ناباروی ناشی از تخلیه و حذف سلول‌های زایا به دلیل آپوپتوز شدید در سلول های اسپرماتوگونی به علت آسیب‌های به DNA است (۹). این آسیب‌ها در نهایت هم سبب کاهش عملکرد اسپرم و هم کاهش اسپرماتوژنز می‌شود (۱۹) که در این مطالعه با توجه به نتایج اسپرماتوگرام کاهش هر دو عملکرد و اسپرماتوژنز اثبات شد. اثرات آنتی آپوپتوز و ضد التهابی ال-کارنیتین در شرایط پاتوفیزیولوژی مختلف، اثبات شده است (۱۰)، همچنین اگراوال و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که ال-کارنیتین سبب بهبود کیفیت مایع سیمن می شود (۲). با توجه به آن که حرکت اسپرم به غلظت ال-کارنیتین در لومن یا مجرای اپیدیدیم وابسته است. وجود این آنتی اکسیدان می‌تواند سبب بهبود حرکت اسپرم شود (۲)، ال-کارنیتین همچنین سبب افزایش بقا و کیفیت کروماتین و افزایش جذب گلوکز در اسپرم می‌شود (۴) که این عملکردهای ال-کارنیتین علاوه بر اثرا آنتی آپوپتوتیک و آنتی اکسیدانی سبب بهبود شاخص‌های اسپرم می شود.

نقش محافظتی ال-کارنیتین به عنوان یک آنتی اکسیدان در بهبود شاخص‌های باروری مردان از جمله کیفیت اسپرم، افزایش تحرک اسپرم، افزایش تعداد اسپرم زنده در پژوهش‌های متعدد به اثبات رسیده است(۱). پژوهش‌های اخیر نشان داده است که مکمل‌های ال-کارنیتین می‌توانند اثرات اکسیداتیو ناشی از مسمومیت با مس را از ببرند و سبب افزایش فعالیت آنزیم های اکسیداتیو شوند (۱۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاهش شاخص‌های اسپرمی ناشی از القای گونه‌های اکسیژن واکنشی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در اثر تزریق بوسولفان می‌تواند با تزریق هم‌زمان و به مدت ۵ هفته با ال-کارنیتین بهبود یابد.

منابع

1- Ahmed SD, Jagdesh KK, Ahsan S. Role of L-carnitine in male infertility. J Pak Med Assoc. 2011; 61(8):732-736.

2- Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, Durairajanayagam D, Sabanegh E. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. Reprod Biol Endocrinol. 2014; 7; 12: 33.

3- Alahmar AT. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Clin Exp Reprod Med. 2018;45(2):57-66.

4- Aliabadi E, SoleimaniMehranjani M, Borzoei Z, Talaei-Khozani T, Mirkhani H, Tabesh. H. Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular spermmotility chromatin quality. Iranian J Rep Med. 2012;10(2): 77-82.

5- Balercia G, Mancini A, Paggi F, Tiano L, Pontecorvi A, Boscaro M, Lenzi A, Littarru GP.. Coenzyme Q10 and male infertility. J Endocrinol Invest. 32009;2 (7): 626-632.

6- Begna K, Abdelatif A, Schwager S, Pardanani A, Tefferi A. Busulfan for the treatment of myeloproliferative neoplasms: the Mayo Clinic experience. Blood Cancer J. 2016; 6(5): e427.

7- Bor-Jen Lee J-SL, Yi-Chin Lin, Ping-Ting Lin. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial. Nutrition J 2014;13:79.

8- Cherian DA, Peter T, Narayanan A, Madhavan SS, Achammada S, Vynat GP.Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in PeriodontitisPatients.J Pharm Bioallied Sci. 2019;11(Suppl 2):S297-S300

9- Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, Kim T, Seo HG, Kim JH. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. FEBS Lett. 2004;575(1-3):41-51.

10- Dehghani F, Hassanpour A, Poost-Pasand A, Noorafshan A, Karbalay-Doust S. Protective effects of L-carnitine and homogenized testis tissue on the testis and sperm parameters of busulfan-induced infertile male rats. Iranian J Rep Med. 2013;11(9):693

11- Espino J, Ortiz Á, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, et al. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor–and extracellular signal–regulated kinase-mediated pathways. Fert Steril. 2011; 95(7): 2290-2296.

12- Esteves, SC. and et al. 2015. Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. International Urology and nephrology. 47(9): 1471-1477.

13- Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. Life Sci 2006;78 803 – 11

14- Gürbüz B YS, Fiçicioğlu C, Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. J Obstet Gynaecol; 2003; 23(6): 653-656.

15- Iwamoto T, Hiraku Y, Oikawa S, Mizutani H, Kojima M, Kawanishi S. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. Cancer Sci. 2004; 95(5): 454-458.

16- Khushboo M, Murthy MK, Devi MS, Sanjeev S, Gurusubramanian G. Testicular toxicity and sperm quality following copper exposure in Wistar albino rats: ameliorative potentials of L-carnitine. Environ Sci Pollut Res Int. 2018; 25(2):1837-1862

17- Marchetti F, Aardema M, Beevers C,Yauk CL, Young R, Williams A. Simulation of mouse and rat spermatogenesis to informgenotoxicity testing using OECDtestguideline488. Mutat Res. 2018; 832-833:19-28

18- Rezaei, N., Mardanshahi, T., Shafaroudi, M.M., Abedian, S., Mohammadi, H., and Zare Z. Effects of l-Carnitine on the Follicle-StimulatingHormone, LuteinizingHormone, Testosterone, and TesticularTissueOxidativeStressLevels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Evid Based Integr Med. 2018; 23: 2515690X18796053

19- Saalu LC. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation. Pak J Biol Sci. 2010; 13(9):413-422.

20- Salehinezhad F, Eshraghi H, Kadivar, A., Shirian, S, A Asgari, Aali, E, Davoodian N. Amelioration Effects of Vitamin E, Melatonin, L-carnitine, and Atorvastatin, on Destructive Effects of Busulfan in the Testes of Male Rats

: A Gene Expression Evaluation. Kafkas Univ Vet Facult Dergisi. 2019; 25: 709-716.

21- Sönmez M,Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. Reprod Toxicol. 2007; 23(2): 226-231.

22- Wang DZ, Zhou XH, Yuan YL, Zheng XM. Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. Asian J Androl. 2010; 12(2):263-70

23- Zangoie R, EshraghiH, Shirian S, Kadivar A, Nazari H, Aali E. Melatonin synergistically enhances protective effect of atorvastatin against busulfan-induced spermatogenesis injuries in a rat model. Comparat Clinic Pathol; 2020; 29:161–166.

Vol.15/No.2
Fall-Winter 2022

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2022; 15(2): 99-106.

Effects of L-carnitien on spermatic parameters and antioxidant enzyme activity in toxicity induced by busulfan in a rat Model

Reza Zangoie [1]; Hamidreza Eshraghi[1]; Sadegh Shirian[2,3]; Ali Kadivar[4]; Behnam Bakhtiarimoghaddam[2]; Ehsan Aali[5]

1. Department of Veterinary Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran.
2. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Shiraz Molecular Pathology Research Center, Dr Daneshbod Lab, Shiraz- Iran.
4. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
5. Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin- Iran.

Summary

Received: 4 May 2020 ***Accepted:*** 15 February 2021

Busulfan, a chemotherapy agent, is widely administrated for treatment of lymphoma and leukemia as well as bone transplantation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the anti-oxidant effects of L-carnitine on sperm parameters and anti-oxidant enzymes activity (SOD and catalase), and MDA concentration in the busulflan- impaired testis tissue of rat animal model. A total of 24 Wistar rats, 220-250g, were randomly divided into 4 equal groups including the busulfan, busulfan+L-carnintine, Sham, and control groups. Busulfan was diluted in DMSO and intra-peritoneally (IP) administrated in two doses 25 and 10 mg/kg with 14-day interval in the busulfan and busulfan+L-carnitine groups. Administration of L-carnitine was daily started 1day after busulfan injection for 28day. The sham and control groups daily received DMSO, and PBS, respectively. After 28 days, the animals were euthanized and the semen was collected from the epididymis and the testicular tissues were removed to assess sperm parameters and biochemical analysis including SOD, catalase and MDA. The highest sperm parameters were belonged to control followed by sham, busulfan+L-carnitine and busulfan groups. The highest level of MDA and the lowest SOD and catalase activity was belonged to busulfan followed by busulfan+L-carnitine, sham and control groups. In conclusion, administration of L-carnitine can attenuate busulfan-induced stress oxidative injuries of sperm parameters in rats.

Keywords: Busulfan, Catalase, L-carnitine, MDA, SOD, Sperm parameters.

***Corresponding Author**: shirian85@gmail.com