مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۴، شماره ۵
آذر-دی ۱۴۰۰، صفحه ۴۱۹۵-۴۱۸۶

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 64, No.5 P: 4186-4195
Nov-Jan 2021

مقاله اصلی

تأثیر رزوراترول و ال کارنیتین بر بیان ژن پروتامین و پارامترهای اسپرم در یک مدل موش آزواسپرمی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۸- تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۰/۲۷

حنانه حافظی [۱]
اکبر وحدتی [۱*]
محسن فروزانفر [۱]
مهرداد شریعتی [۲]

[۱] گروه زیست شناسی،واحد شیراز،دانشگاه آزاد اسلامی،شیراز،ایران
[۲] گروه زیست شناسی،واحد کازرون،دانشگاه آزاد اسلامی،کازرون،ایران

Email: drakbarvahdati11@yahoo.com

خلاصه

مقدمه: بررسی‌ها نشان می دهد عامل ضد سرطان بوسولفان به طرق مختلف از جمله با آسیب رساندن به پارامترهای اسپرم بر سیستم تولید مثل مردان تأثیر منفی می گذارد. تحقیقات نشان می دهد ال-کارنیتین و رزوراترول می توانند عوارض جانبی بوسولفان را کاهش دهند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات این عوامل بر پارامترهای اسپرم بیضه و بیان ژن پروتامین در مدل موش آزواسپرمی انجام شد.

روش کار: در مجموع ۷۸ موش نر Sprague Dawley در این مطالعه وارد شدند و به شش گروه سیزده موش تقسیم شدند: گروه شاهد، ال کارنیتین به علاوه رزوراترول (L-ca + RES)، بوسولفان (BUS)، بوسولفان به علاوه ال کارنیتین ((BUS + L-ca)، بوسولفان به علاوه رزوراترول (+ BUS (RES) و بوسولفان به علاوه ال کارنتین به علاوه (BUS + L-ca + RES). پس از ۴۸ روز، پارامترهای اسپرم و بیان پروتامین بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بهبود قابل توجهی در معیارهای اسپرم از جمله افزایش تحرک اسپرم، زنده ماندن، شمارش و میزان بیان پروتامین و همچنین کاهش مورفولوژی غیر طبیعی و درصد اسپرم نابالغ پس از درمان با L-ca و RES در مقایسه با درمان BUS وجود دارد.

نتیجه گیری: درمان با L-ca، RES و ترکیب آنها پس از تجویز BUS ممکن است برای کاهش عوارض جانبی BUS در باروری مردان با بهبود کیفیت اسپرم مفید باشد. علاوه بر این، داده‌های ما نشان داد که ترکیب L-ca + BUS + RES در تنظیم اثرات سیتوتوکسیک بوسولفان موثرتر است. از این رو، ما می توانیم L-ca و RES را به عنوان عوامل مفیدی برای کاهش اثرات سو BUS در نظر بگیریم.

کلمات کلیدی: رزوراترول، ال کارنیتین، ژن پروتامین، تحرک، موش صحرایی.

مقدمه

بوسولفان یک آلکیل سولفونات است که به عنوان یک عامل ضد نئوپلاستی دو عملکرده عمل می کند (۱) که با چسبیدن به یکی از رشته‌های DNA سلول سرطانی باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می شود (۲). از این رو، درمان با بوسولفان ممکن است اثرات نامطلوبی بر اندام‌های مختلف مانند اندام‌های دستگاه تولید مثل داشته باشد (۳، ۴). بوسولفان با الکیلاسیون DNA منجر به پیوندهای عرضی DNA-DNA و پروتئین DNA در اسپرم می شود (5e،1) بنابراین، در بیماران جوان پس از استفاده از این دارو ممکن است الیگوسپرمیا، آزواسپرمی و حتی آتروفی بیضه رخ دهد (۳، ۶). بوسولفان باعث ایجاد ROS درون سلولی (گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر) می شود که باعث استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی می شود (۷). استرس اکسیداتیو در اواخر اسپرماتوژنز بسته بندی پروتامین را مختل می کند (۸ و ۹). بنابراین، بسته بندی غیر طبیعی کروماتین ممکن است منجر به آسیب DNA شود (۱۰). رونویسی ژن پروتامین در طی اسپرموژنز گسترش می یابد و بلوغ اسپرماتوزوئید بیضه از اواخر مراحل اسپرم زایی از جمله تکمیل پروتامیناسیون اتفاق می افتد (۱۱). به همین دلایل، استرس اکسیداتیو با واسطه بوسولفان ممکن است روند اسپرماتوژنز را مختل کند.بررسی‌ها نشان می دهد که عوامل آنتی اکسیدانی مانند ال کارنیتین و رزوراترولباعث بهبود پروتامیناسیون می شوند (۸، ۱۲). ال کارنیتین یک آمین کواترنر است که بسیار قطبی و محلول در آب است و فرآیندهای اکسیداتیو را تسهیل می کند و تولید انرژی سلولی را افزایش می دهد و به عنوان یک فاکتور ضروری برای انتقال اسیدهای چرب با زنجیره طولانی در ماتریس میتوکندری عمل می کند (۱۳، ۱۴). ال کارنیتین چندین نقش مهم مانند شروع حرکت اسپرم، رشد بلوغ اسپرم، افزایش لقاح اسپرم، تنظیم عملکرد سلول‌های سرتولی، محافظت از اسپرم‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو، کاهش آپوپتوز سلول‌های اسپرماتوژنیک و جلوگیری از تجمع اسپرم‌ها را دارد (۱۵). بررسی‌ها نشان می دهد که تجویز خوراکی ال کارنیتین کیفیت کروماتین اسپرم را بهبود می بخشد(۱۶). رزوراترول (۳،۴،۵-ترانس-ترهیدروکسیستیلبن) یک پلی فنول است که به عنوان یک آنتی اکسیدان موثر عمل می کند. تحقیقات نشان می دهد که تجویز رزوراترول باعث بهبود کیفیت اسپرم در موش‌ها می شود (۱۷). دانشمندان معتقدند که رسوراترول (RES) از اصلی ترین عناصر فعال فیتالکسین‌های استیلبن است که به دلیل نقش پاک کننده آن در برابر ROS، تأثیر مطلوبی بر سلامتی دارد (۱۸). مصرف ترانس-رسوراترول ازآسیب DNA با واسطه ROS و پراکسیداسیون لیپید در غشای سلول جلوگیری می کند (۱۹). بر این اساس، فرض بر این است که این عوامل می توانند تأثیر مفیدی بر پارامترهای اسپرم پس از درمان با بوسولفان داشته باشند. با توجه به کمبود اطلاعات در مورد ترکیب L-ca / RES در اسپرماتوژنز و بیان ژن پروتامین پس از درمان با بوسولفان، این مطالعه به منظور بررسی اثرات ال کارنیتین ورزوراترول بر پارامترهای اسپرم بیضه و بیان ژن پروتامین در مدل موش آزواسپرمی انجام شد.

روش کار

این مطالعه روی مجموع ۷۸ موش صحرایی نر Sprague Dawley با وزن اولیه بین ۲۰۰ و ۲۵۰ گرم و سن بین دو تا سه ماه انجام شد. موش‌ها در قفس‌های پلی کربنات با سقف مشبک فولادی نگهداری شدند و کف آن با خاک اره و تراشه‌های چوب پوشانده شده بود. شرایط محیطی قفس‌ها تحت یک چرخه ۱۲ ساعته تاریکی / روشنایی، دمای ۲± ۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۰-۴۰٪ کنترل می شد. موش‌ها با یک رژیم غذایی استاندارد تغذیه می شدند و آب در دسترس داشتند. کف چوبی هر هفته ضد عفونی می شد و روزانه تعویض می شد.

در مجموع ۷۸ موش به طور تصادفی در شش گروه (۱۳ موش در هر گروه) قرار داده شدند:

گروه کنترل مثبت یک دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم در کیلوگرم) دریافت کردند.

آب و رژیم غذایی استاندارد دراختیارگروه کنترل قرار داده شد.

به موشهای گروه ۱، یک دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم در کیلوگرم) + رزوراترول (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز) به مدت ۴۸ روز داده شد (۲۰).

موشهای گروه ۲ با یک دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم در کیلوگرم) +ال کارنیتین (۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز) به مدت ۴۸ روز تحت درمان قرار گرفتند (۲۱).

موشهای گروه ۳ یک بار دوز بوسولفان (۱۰ میلی گرم در کیلوگرم) + رزوراترول (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز در روز) + ال کارنیتین (۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز در روز) به مدت ۴۸ روز دریافت کردند (۲۰، ۲۱).

موشهای گروه ۴ رسوراترول (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز) + ال کارنیتین (۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز) به مدت ۴۸ روز دریافت کردند (۲۰، ۲۱).

بوسولفان به صورت داخل صفاقی در یک دوز تجویز می شد، در حالی که هر روز رزوراترول و ال کارنیتین به صورت خوراکی با گاواژ سوزن تجویز می شدند. وزن موش‌ها در شروع و پایان دوره درمان ثبت شد. در پایان آزمایش حیوانات توسط اتر بیهوش شدند.

بررسی اسپرم: یک سانتیمتر از قطعه پروگزیمال واز لوله خروجی منی فقط در انتهای قسمت اپیدیدیم جدا شد و به شیشه ساعت حاوی ۵ میلی لیتر محیط F10 هام منتقل شد. همانطور که قبلاً توضیح داده شد، سوسپانسیون اسپرماتوزوئید تهیه شد (۲۲).

تحرک اسپرماتوزوئید: 40میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم در لام از قبل گرم شده (۳۷ درجه سانتیگراد) قرار داده شد و ۱۰ میدان میکروسکوپی بررسی شد. زمینه‌های انتخاب شده به طور تصادفی از نمونه موش مورد بررسی قرار گرفت. طبقه بندی تحرک اسپرم شامل:

۱- پیشرونده سریع (حرکت سریع اسپرماتوزوئیدها به روش خطی)،
۲- پیشرونده کند (حرکت آهسته اسپرم به روش خطی)،
۳- غیر پیشرونده (حرکت دایره ای اسپرم ها)،
۴- بی حرکت (اسپرماتوزوئیدهایی که حرکات دایره ای یا خطی نشان نمی دهند) (۲۲).

تعداد اسپرم

اسپرم‌های کامل (با سر و دم) در چهار مربع یک هموسیتومتر Neubauer(عمق ۰,۱ میلی متر محصول LABART، آلمان) در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش شدند. برای محاسبه تعداد کل سلولهای اسپرم در هر میلی لیتر از مایع منی، میانگین در 10^6ضرب شد.

برآورد درصد اسپرم غیرطبیعی: از نظر مورفولوژی سلولهای اسپرم غیر طبیعی از طریق رنگ آمیزی ائوزین Y برآورد شد. سوسپانسیون روی لام قرار داده شد، در هوا خشک شد، با ۱٪ ائوزین Y به مدت ۵-۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و سپس خشک شد. برای تعیین درصد اسپرم غیرطبیعی، ۲۰۰-۳۰۰ اسپرم در هر نمونه از موش‌ها شمرده شد. اسپرم‌های دارای سر غیرطبیعی یا ۲ سر، بدن تحلیل رفته، ۲ دم و یا سر طبیعی با دم شکسته یا خم شده از ویژگی‌های اسپرم غیر طبیعی در نظر گرفته شدند.

زنده ماندن اسپرم: برای بررسی زنده ماندن اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروسین استفاده شد. ائوزین (محصول مرک، دارمشتات، آلمان) و نیگروسین (محصول مرک، دارمشتات، آلمان) به آب مقطر اضافه شده و سپس مخلوط دو حجم ائوزین ۱٪ با یک حجم سوسپانسیون اسپرم تهیه شد. بعد از ۳۰ ثانیه، حجم مساوی نیگروسین به این مخلوط اضافه شد. لکه‌های نازک از این مخلوط تهیه شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری (مدل نیکون200-E ، ژاپن) با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌های بی رنگ و قرمز به ترتیب زنده و غیر زنده بودند

.

آنالیز PCR در زمان واقعی

RNA از نمونه‌های اپیدیدیم موش با استفاده از کیت EZ-10 Spin Column Animal Total RNA Mini-prepsو بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Bio Basic, Markham, ON, Canada) استخراج شد. برای این منظور، ۷۵ میلی گرم بافت اپیدیدیم از انبار منجمد خارج شده و برای استخراج RNA استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با اندازه گیری چگالی نوری ۲۸۰/۲۶۰ با استفاده از اسپکتروفتومتر Nanodrop ™ (Nanodrop; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) تعیین شد، در حالی که یکپارچگی نمونه با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱,۰٪

تأیید DNA مکمل (cDNA) از ۱۰۰۰ نانوگرم سنتز شد. کل RNA در کل حجم ۱۰ میکرولیتر با oligo-dT و هگزامر تصادفی و با استفاده از PrimeScript™ RT Enzyme Mix I بر طبق دستورالعمل سازنده (PrimeScript™ RT reagent kit, TaKaRa, Japan) آماده شد.

PCR در زمان واقعی برای ارزیابی بیان پروتئین mRNA با استفاده از Applied Biosystems® StepOne ™ و SYBR™ Premix Ex Taq ™ II (Tli RNaseH Plus) تاکارا ؛ اوتسو شیگا، ژاپن) انجام شد. آغازگرهای اختصاصی پروتامین توسط نرم افزار Allele ID v.7.8 و بتا -۲ میکروگلوبولین ((M2β به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). β2M به عنوان ژن مرجع برای تنظیم و کنترل خطا در بیان mRNA در بین نمونه‌ها استفاده شد. PCR زمان واقعی برای ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و به دنبال آن ۴۵ دوره ۱۵ ثانیه ای در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. ویژگی تقویت با منحنی ذوب تایید شد. سطح mRNA پروتامین در مقایسه با گروه کنترل با $^{\Delta\Delta}Ct$ -2مقایسه شد و به عنوان تغییر فولد در تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داده شد.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	(5′→3′) های آغازگرتوالی	اندازه (bp)
Prm1	جلو: 5’-ATGGCCAGATACCGATGCTGC-3’ معکوس: 5’-CTCCTCCGTCTGCGACATCTTC-3’	80
B2m	جلو: 5’-CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3’ معکوس: 5’-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3’	244

نتایج

تحرک اسپرم: ارزیابی تحرک اسپرم در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنا داری در درصد حرکت پیشرونده در نمونه‌های تحت درمان با BUS نشان داد (p <۰/۰۵) (جدول ۲). درمان با BUS + Lca، BUS + RES و BUS + RES + Lca به طور معناداری درصد حرکت پیشرونده را در مقایسه با گروه تحت درمان با BUS افزایش داد (p <۰/۰۵) (جدول ۲)، اما تفاوت معناداری بین این گروه‌ها با گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۲). بررسی حرکت آهسته در همه گروهها نتیجه معناداری نشان نداد. درمان با BUS باعث افزایش درصد حرکت غیر پیشرونده (p <۰/۰۵) (جدول ۲) در مقایسه با گروه شاهد شد. از طرف دیگر، تجویز BUS + Lca، BUS + RES و BUS + RES + Lca درصد حرکات غیر پیشرونده را تغییر نداد. علاوه بر این، در این گروه‌ها تفاوت معنا داری نسبت به شاهد مشاهده نشد. افزایش معناداری در درصد اسپرم‌های بی حرکت در نمونه‌های تحت درمان با BUS در مقایسه با نمونه‌های شاهد مشاهده شد (p <۰/۰۵) (جدول ۲). تجویز BUS + RES و BUS + RES + Lca درصد اسپرم‌های بی حرکت را تا سطح کنترل کاهش داد، با این حال تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل نشان ندادند، اما BUS + Lca افزایش معنا داری در درصد اسپرم بی حرکت نسبت به گروه شاهد داشت (p <۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲. ارزیابی تحرک اسپرم در گروههای آزمایش

گروه	پارامترهای اسپرم (میانگین وSEM)			
	حرکت پیشرونده%	حرکت کندهای %	غیر اسپرم‌های پیشرونده %	بی اسپرم حرکت %
کنترل	49.95±2.54ac	5.64±1.31a	22.88±2.03a	21.53±1.45ac
Lca+Res	52.84±5.53a	5.68±0.85a	21.01±3.82a	20.47±2.76a
BUS	6.11±1.78b	6.26±1.32a	41.62±6.57b	46.11±4.56b
BUS+Lca	30.80±3.25c	4.69±0.46a	24.09±2.72ab	40.42±6.71bc
BUS+Res	42.34±4.38ac	4.04±1.44a	24.72±3.56ab	28.90±3.92abc
BUS+Lca+Res	40.63±4.36ac	5.13±0.94a	26.38±2.83ab	27.86±6.18abc

بین ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه دارند تفاوت معنا داری وجود ندارد. با این حال، حروف غیر مشابه تفاوت معنا داری را نشان می دهد($p\leq0.05$)

تعداد اسپرم: به دنبال درمان با BUS، میانگین تعداد اسپرم در مقایسه با گروه شاهد به طور معنا داری کاهش یافت (p <0.001) (شکل A۱). در مقایسه با گروه BUS، تعداد اسپرم به طور معناداری در (BUS + RES) و گروههای (p <0.001 BUS + RES + Lca)

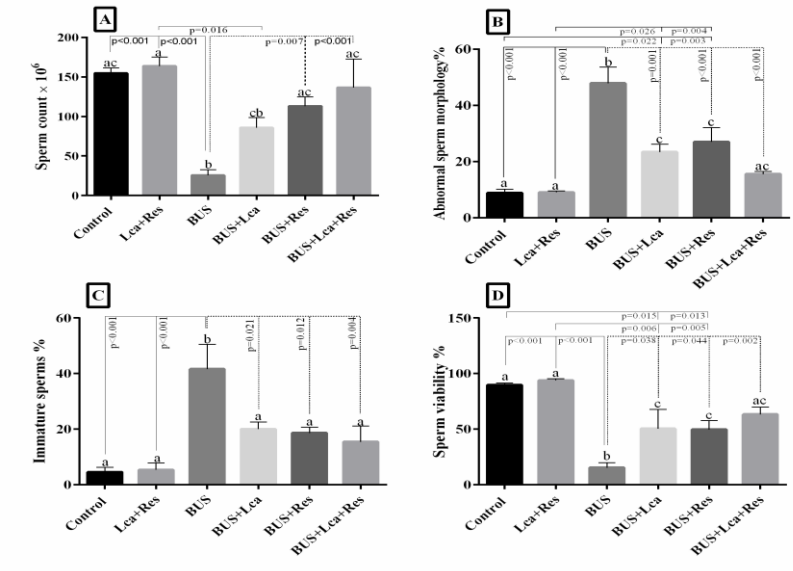
افزایش نشان داد(شکل A۱) (p<0.001)، در حالی که درمان با BUS + Lca اختلاف آماری معنا داری در مقایسه با گروه BUS نشان نداد.

مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی: همانطور که در شکل B۱ نشان داده شده است، افزایش قابل توجهی در درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در تیمارهای BUS، BUS + Lca، BUS + RES در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۰۱> p = 0022/0) (= p 022/0) (p)) جالب اینجاست که استفاده از BUS + Lca، BUS + RES و BUS + RES + Lca می تواند به طور قابل توجهی درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم را در مقایسه با گروه BUS کاهش دهد (۰/۰۰۱ ≥p). علاوه بر این، نتایج نشان داده شده در شکل ۲ نشان می دهد که بر خلاف گروه‌های دیگر، درمان BUS + RES + Lca باعث کاهش درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در سطح طبیعی شد.

همانطور که در شکل B۱ نشان داده شده است، درصد مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی در تیمارهای BUS، BUS + Lca، BUS + RES در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۰۱> p = 0022/0) (= p 022/0) (p)) افزایش معناداری را نشان می دهد. جالب اینجاست که استفاده از BUS + Lca، BUS + RES و BUS + RES + Lca می تواند به طور قابل توجهی درصد مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی را در مقایسه با گروه BUS کاهش دهد (۰/۰۰۱ ≥p). علاوه بر این، نتایج نشان داده شده در شکل ۲ نشان می دهد که بر خلاف گروه‌های دیگر، درمان BUS + RES + Lca باعث کاهش درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در سطح طبیعی شد.

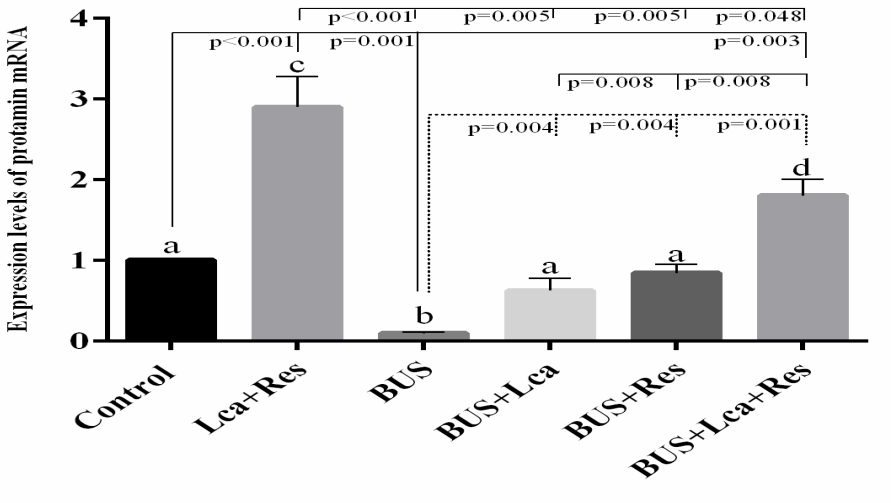
درصد اسپرم نابالغ: داده‌های ما نشان دهنده سطح بالای اسپرم نابالغ در موش‌های تحت درمان با BUS نسبت به موش‌های شاهد (P <0.001) (شکل C۱) است. علاوه براین ،تجویز BUS + Lca، BUS + RES و BUS + RES + Lca منجر به کاهش قابل توجه درصد اسپرم نابالغ در مقایسه باتجویز BUS می شود. (p (p=0.004) (p=0.012) (p=0.021) =(شکل C۱) .

زنده ماندن اسپرم: ماندگاری اسپرم در گروههای تحت درمان با BUSبه طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (P<0.001) (شکل D1). در مقایسه با گروه کنترل، آزمایش BUS + Lca، BUS + RESهمچنین کاهش زنده ماندن در اسپرم را نشان داد (p=0.015) (p=0.013)با این حال، هر دو این روش‌های درمانی، و همچنین درمان BUS + RES + Lca منجر به افزایش زنده ماندن اسپرم در مقایسه با موش‌های تحت درمان با BUS را نشان می دهد (p=0.002) (p=0.038).(p=0.044) (Fig 1D)



شکل ۱. بین ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه داشتند تفاوت معنا داری وجود نداشت. با این حال، حروف غیر مشابه تفاوت معنا داری را نشان می دهد(p≤0.05)

سطح بیان پروتامین: میزان بیان پروتامین در موشهای معمولی که Lca + RES دریافت می کنند و همچنین در موشهای آزواسپرمی که BUS + RES + Lca دریافت می کنند در مقایسه با موشهای طبیعی درمان نشده افزایش می یابد. (p<0.001) (p=0.003)(شکل ۲). علاوه بر این، تجویز BUS + RES + Lca باعث افزایش بیان پروتامین در این گروه در مقایسه با گروه BUS + Lca و BUS + RES شد (p=0.008)(شکل ۲). نتایج نشان داد که کاهش معنا داری در بیان پروتامین در موشهای تحت درمان با بوسولفان نسبت به گروه کنترل وجود دارد (P <0.001) (شکل ۲). در مقایسه با گروه BUS، بیان پروتامین در گروه‌های BUS + Lca، BUS + RES و BUS + RES + Lca به طور معناداری افزایش می یابد (۰,۰۰۴ = p) (0.001 = p) (0.004 = p) (شکل ۲). مقایسه گروه‌های BUS + Lca و BUS + RES با گروه کنترل اختلاف آماری معنا داری را در شاخص بیان ژن پروتامین نشان نداد.



شکل ۲ . اثرBUS ، RESو L-ca بر بیان mRNA پروتامین. کمی سازی ژن‌های هدف توسط qRTPCR تعیین شد. بیان نسبی آنها به B2mنرمال شد. هر آزمایش حداقل سه بار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری تفاوت معنا داری را بین شاهد و درمان BUS و همچنین بین BUSو L-ca و درمان RES نشان داد .(p<0.05)

در حساسیت آن در برابر حمله ROS و آسیب اکسیداتیو است (۲۷). رادیکال‌های آزاد در دسترس بودن انرژی میتوکندری را کاهش می دهند، در نتیجه تحرک اسپرم را مختل می کنند (۲۸). علاوه بر این، گزارش شد که افزایش مارکر ck18 بر روی سلولهای سرتولی از طریق درمان بوسولفان منجر به ناهنجاری اسپرم می شود (۲۹). در مطالعه حاضر، برای تعیین عوارض جانبی این دارو بر روی پارامترهای اسپرم، از یک دوز تجویز BUS استفاده کردیم. ما همچنین اثر درمانی L-ca و RES را برای کاهش سمیت سلولی BUS بررسی کردیم. نتایج نشان داد که کاهش تعداد اسپرم، حرکت پیشرونده، و زنده ماندن و همچنین افزایش اسپرم نابالغ و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی پس از درمان BUS وجود دارد. یافته‌های ما با مطالعاتی که اثرات

بحث

بوسولفان یک داروی ضد سرطان با اثر سیتوتوکسیک بر سیستم تولید مثل مردان است(۲۳). اخیرا در مطالعه ای اثر جانبی بوسولفان بر روی بیضه‌ها مانند کاهش حجم بیضه، الیگوزواسپرمی و مرگ سلولهای آپوپتوز در اپیتلیوم جوانه بیضه نشان داده است (۴). بوسولفان عمدتاً سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی را از بین می برد، در حالی که سایر مواد شیمیایی اسپرماتوگونیا تمایز یافته را از بین می برند (۲۶-۲۴). بوسولفان بر روی ژن اسپرم تأثیر می گذارد و از طریق انتشار رادیکال‌های آزاد مانند ROS باعث جهش‌های دائمی کشنده اسپرم می شود (۲۳). فراوانی اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه در اسپرم دلیل مهمی

کنترل نشده بسیار کاهش یافته است. این یافته با یافته‌های علی ابومادیقم و دیگران همخوانی داشت. (۳۷) از سوی دیگر، مشابه چندین مطالعه دیگر، (۱۲، ۲۸، ۴۰) یافته‌های ما نشان داد که درمان با L-Ca و RES می تواند بیان پروتامین را افزایش دهد. جالب اینجاست که بیان این ژن در موشهای دریافت کننده L-ca + RES بیش از همه گروهها، حتی گروههای شاهد بود. از این رو، ما می توانیم به طور کلی L-ca و RES را به عنوان عوامل مفیدی برای کاهش اثرات سو BUS در نظر بگیریم.

نتیجه گیری

تجویز L-ca + BUS ، RES + BUS و ترکیب آنها ممکن است با بهبود پارامترهای اسپرم، اثرمخرب BUSدر باروری مردان را تنظیم کند. علاوه بر این، ترکیب L-ca + BUS + RES در کاهش عوارض جانبی بوسولفان موثرتر بود. بنابراین، این مطالعه نشان می دهد که استفاده از L-ca + RES ممکن است برای محافظت از عملکرد جنسی مردان در برابر اثر سیتوتوکسیک بوسولفان مفید باشد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام کردند که هیچ تضادی در منافع وجود ندارد.

سیتوتوکسیک بوسولفان را روی پارامترهای اسپرم توصیف می کند مطابقت دارد (۳۲-۳۰).با توجه به این عوارض جانبی، چندین مطالعه داروهای مختلف یا مکمل‌های طبیعی را برای تنظیم عوارض جانبی BUS ارزیابی کرده اند (۳، ۲۳، ۳۱، ۳۳). عوامل شیمیایی مانند L-ca و RES که نقش مهمی در لقاح و رشد جنین دارند می توانند پارامترهای اسپرم را بهبود بخشند (۲۸، ۳۳، ۳۴). L-ca یک ماده آنتی اکسیدانی است که با ایجاد تغییر در متابولیسم اسیدهای چرب ممکن است بر روی تحرک اسپرم تأثیر بگذارد. همچنین ممکن است با سطح بالایی از اسیدهای چرب اشباع نشده از غشای پلاسمای اسپرم محافظت کند (۲۸، ۳۵). همچنین، RES به عنوان پاک کننده ROSهای مختلف از جمله رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل عمل می کند و به طور موثر از پراکسیداسیون لیپید غشاهای سلولی و همچنین اکسیداسیون پروتئین جلوگیری می کند (۳۶). از این رو، ما نقش موثری از L-ca و RES در کاهش اثر مخرب BUS مشاهده کردیم. در مطالعه ما، L-ca + BUS، RES + BUS و L-ca + RES + BUS تعداد اسپرم، حرکت پیش رونده و زنده ماندن را بهبود بخشید، در حالی که آنها تعداد اسپرم نابالغ و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی را کاهش دادند. یافته‌های ما با نتایج مطالعات قبلی که نشان داد درمان L-ca و RES دارای اثرات محافظتی در برابر ناباروری ناشی از بوسولفان است، مطابقت دارد (۳۱، ۳۳). ژنتیک اسپرم شاخص مهمی برای بلوغ و صلاحیت این سلول‌ها است. بر اساس گزارش‌های قبلی، بلوغ اسپرم‌های بیضه در اواخر مراحل اسپرم زایی از جمله تکمیل پروتامین حاصل می شود. استرس اکسیداتیو می تواند از طریق تأثیر بر بسته بندی پروتامین، بلوغ اسپرم را مختل کند (۸). درمان BUS می تواند بیان پروتامین را کاهش دهد (۳۷). کمبود پروتامیناسیون با آسیب DNA اسپرم (۳۸) مرتبط است که روی بلوغ اسپرم تأثیر می گذارد (۲۸). در این راستا، نسبت mRNA پروتامین را می توان به عنوان یک نشانگر بیولوژیکی قابل پیش بینی برای پتانسیل لقاح اسپرم در نظر گرفت (۳۹). ما اثر بوسولفان را در بیان mRNA پروتامین ارزیابی کردیم و مشاهده کردیم که بیان آن در موشهای تحت درمان با BUS در مقایسه با موشهای

References

1. 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 science. 2004;95(5):454-8.
2. Houot M, Poinsignon V, Mercier L, Valade C, Desmaris R, Lemare F, et al. Physico-chemical stability of busulfan in injectable solutions in various administration packages. Drugs in R&D. 2013;13(1):87-94.
3. Jung S-W, Kim H-J, Lee B-H, Choi S-H, Kim H-S, Choi Y-K, et al. Effects of Korean Red Ginseng extract on busulfan-induced dysfunction of the male reproductive system. Journal of ginseng research. 2015;39(3):243-9.
4. Ghasemi M, Bahadori M, Faghani M, Nasiri E, Soleimani Rad J. Buserelin inhibits apoptosis in male

germ cells induced by busulfan in mouse testis. J Iran Anat Sci. 2009;7:45-54.
5. Mertins SD, Myers TG, Holbeck SL, Medina-Perez W, Wang E, Kohlhagen G, et al. In vitro evaluation of dimethane sulfonate analogues with potential alkylating activity and selective renal cell carcinoma cytotoxicity. Molecular cancer therapeutics. 2004;3(7):849-60.
6. ABIDEMI AA. Protective effect of Tahitian Noni juice on the reproductive functions of Male Wistar Rats traeted with cyclophosphamide. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics. 2011;10(1):39-0.
7. Li B, He X, Zhuang M, Niu B, Wu C, Mu H, et al. Melatonin ameliorates busulfan-induced spermatogonial stem cell oxidative apoptosis in mouse testes. Antioxidants & redox signaling. 2018;28(5):385-400.
8. Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. Reproductive biomedicine online. 2009;18(6):761-8.
9. De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. Biology of reproduction. 2009;81(3):517-24.
10. Shamsi M, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. Indian Journal of Medical Research. 2008;127(2).
11. Tanaka H, Baba T. Gene expression in spermiogenesis. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2005;62(3):344-54.
12. Nashtaei MS, Nekoonam S, Naji M, Bakhshalizadeh S, Amidi F. Cryoprotective effect of resveratrol on DNA damage and crucial human sperm messenger RNAs, possibly through 5′ AMP-activated protein kinase activation. Cell and tissue banking. 2018;19(1):87-95.
13. Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. Reproductive biomedicine online. 2004;8(4):376-84.
14. Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS. The role of carnitine in the male reproductive system. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004;1033(1):177-88.
15. Abdelrazik H, Agarwal A. L-carnitine and assisted reproduction. Arch Med Sci. 2009;5:43-7.
16. Kanter M, Topcu-Tarladacalisir Y, Parlar S. Antiapoptotic effect of L-carnitine on testicular irradiation in rats. Journal of molecular histology. 2010;41(2-3):121-8.
17. Shin S, Jeon JH, Park D, Jang M-J, Choi JH, Choi B-H, et al. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. Archives of pharmacal research. 2008;31(1):83-7.
18. Frémont L. Biological effects of resveratrol. Life sciences. 2000;66(8):663-73.
19. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. The Journal of nutrition. 2005;135(4):757-60.
20. Turedi S, Yulug E, Alver A, Kutlu O, Kahraman C. Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie. 2015;67(3):229-35.
21. Jabbari M, Talebi-Taher M, Ariafar M. L-Carnitine and its Protective Role in Contrast-Induced Renal Injury in Rats. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2012;12(2):115-21.
22. Karbalay-Doust S, Noorafshan A, Ardekani FM, Mirkhani H, Baker G. The reversibility of sperm quality after discontinuing nandrolone decanoate in adult male rats. Asian journal of andrology. 2007;9(2):235-9.
23. 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 journal of reproductive medicine. 2013;11(9):693.
24. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Morimoto T, Matsui S, Honjo T, Shinohara T. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation. Biology of reproduction. 2003;68(5):1801-7.
25. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, Pour Bairanvand S. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. Iranian biomedical journal. 2007;11(1):15-22.
26. Kawashima A, Osman BA, Takashima M, Kikuchi A, Kohchi S, Satoh E, et al. CABS1 is a novel calcium-binding protein specifically expressed in elongate spermatids of mice. Biology of reproduction. 2009;80(6):1293-304.
27. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. Journal of andrology. 2008;29(5):488-98.
28. Aliabadi E, Mehranjani MS, Borzoei Z, Talaei-Khozani T, Mirkhani H, Tabesh H. Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. Iranian journal of reproductive medicine. 2012;10(2):77.
29. HOSSEINI AN, Khaki A, Akbari G, GHAFFARI NM. The effect of busulfan on body weight, testis weight and MDA enzymes in male rats. 2014.
30. Mirhoseini M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Asl JM. Melatonin and testicular damage in busulfan

treated mice. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2014;16(2).
31. Abd-Elrazek A, Ahmed-Farid O. Protective effect of L-carnitine and L-arginine against busulfan-induced oligospermia in adult rat. Andrologia. 2018;50(1):e12806.
32. Vahdati A, Fathi AR, Nasimi P, Saki G. Busulfan induces apoptotic and cytotoxic effects on testis and epididymal sperm of adult male mouse following low dose treatment. Int J Bio. 2015;5:70-8.
33. Wu C, Zhang Y, Shen Q, Zhou Z, Liu W, Hua J. Resveratrol changes spermatogonial stem cells (SSCs) activity and ameliorates their loss in busulfan-induced infertile mouse. Oncotarget. 2016;7(50):82085.
34. Avdatek F, Birdane Y, Türkmen R, Demirel H. Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. Andrologia. 2018;50(7):e13036.
35. Dokmeci D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. Folia medica. 2005;47(1):26-30.
36. Ourique GM, Pês TS, Saccol EM, Finamor IA, Glanzner WG, Baldisserotto B, et al. Resveratrol prevents oxidative damage and loss of sperm motility induced by long-term treatment with valproic acid in Wistar rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 2016;68(8):435-43.
37. AbuMadighem A, Solomon R, Stepanovsky A, Kapelushnik J, Shi Q, Meese E, et al. Development of spermatogenesis in vitro in three-dimensional culture from spermatogonial cells of busulfan-treated immature mice. International journal of molecular sciences. 2018;19(12):3804.
38. Ni K, Spiess AN, Schuppe HC, Steger K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. Andrology. 2016;4(5):789-99.
39. Rogenhofer N, Dansranjavin T, Schorsch M, Spiess A, Wang H, von Schönfeldt V, et al. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. Human Reproduction. 2013;28(4):969-78.
40. Shi J-Z, Zhang S-S, Zhang Z, Liang Q, Shi Y, Hua J-L, et al. Expressions of sperm-specific genes in carnitine-cultured testis sperm of obstructive azoospermia patients. Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology. 2010;16(6):504-9.

Original Article

Resveratrol and L-carnitine affects protamine gene expression and sperm parameters in an azoospermic rat

Received: 19/10/2020 - Accepted: 17/01/2022

Hanane Hafezi [1]
Akbar Vahdati [1*]
Mohsen Frozanfar [1]
Mehrdad Shariati [2]

[1] Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
[2] Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Email:
drakbarvahdati11@yahoo.com

Abstract

Introduction: The anticancer agent, busulfan, has been reported to adversely affect the male reproductive system such as damaging the sperm parameters. It was shown that L-carnitine and resveratrol can reduce busulfan side effects. This study aimed to evaluate the effects of these agents on the testicular sperm parameters and the expression of the protamine gene in the azoospermic rat model.

Methods: A total of 78 Sprague Dawley male rats were included in this study and divided into six groups of thirteen rats: control, L-carnitine plus resveratrol (L-ca + RES), busulfan (BUS), busulfan plus L-carnitine (BUS + L-ca), busulfan plus resveratrol (BUS + RES), and busulfan plus L-carnitine plus RES (BUS + L-ca + RES). After 48 days, the sperm parameters and protamine expression were investigated.

Results: The results showed significant improvement in the sperm criteria including the increase in sperm motility, viability, count and the expression level of protamine as well as the decrease in abnormal morphology and immature sperm percentage after treatment with L-ca and RES compared to BUS treatment.

Conclusion: In conclusion, treatment with L-ca, RES and their combination after administration of BUS may be useful to reduce the side effects of BUS on male fertility by improving the sperm quality. Moreover, our data indicated that the combination of L-ca + BUS + RES was more effective in regulating the cytotoxic effects of busulfan. Hence, we can consider the L-ca and RES as beneficial agents to attenuate the adverse effects of the BUS.

Keywords: Resveratrol L-carnitine protamine gene motility of the rat