Original Article

Evaluation of L-Carnitine Effect on the Testis Tissue of Mature Male Rat Exposed with Cadmium

Yari A., M.Sc., Bahadoran H., Ph.D.*, Asadi .H., Ph.D., Mofid M., M.Sc., Dashtnavard H., Ph.D., Imani H., Ph.D.

** Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The evaluation of L-Carnitine effect on the testis tissue of mature rats exposed to Cadmium

Materials and Methods: This research was carried out on 30 mature male rats, weighting about 180-240gr. Animals were divided into five groups.

The first group (control group) received nothing. The second group (**distilled water**,0.3ml)، third group (L-Carnitine,500mg/kg Body Weight)، fourth group (Cadmium,1mg-kg B.W) and for the fifth group (L-Carnitine 500mg/kg B.W and Cadmium 1mg/kg B.W)، were injected intraperitoneally for 16 days at an interval of 48h between subsequent treatments. Animals were sacrificed on day 17 after the first treatment. For the evaluation of the sperm count the right cauda epididymis was removed and immidiately immersede into 10ml of the HBSS.For the histological evaluation, the right testis was submerged into the 10% formaline.

With immuno-histochemical (Ki-67) staining, the number of cell proliferation in the seminiferous tubes were evaluated, as well as the testicular histology evaluated by the Johnsen Score.

Results: Following contamination with Cadmium ,the rats showed decrease in the number of cuda epididymis sperm، the number of cell proliferation and number of spermatogenic cells in the seminiferous tubes. In addition L-Carnitine caused increase in the number of cuda epididymis sperm, the number of cell proliferation and number of spermatogenic cells in Cadmium induced group.

Conclusion: Reasults demonstrated beneficial effects of L-Carnitine treatment in cadmium toxicity on number of cauda epididymis sperm and testicular tissue.

Key words: L-Carnitine; Camdium; Testis Tissue; Sperm Number; Mature Male Rat

مقاله تحقیقی

بررسی آثار ال- کارنیتین بر بافت بیضه موش صحرایی بالغ تیمار شده با کادمیوم

اباذر یاری M.Sc. *، ✍ حسین بهادران Ph.D. *، محمد حسین اسدی Ph.D.*، محمود مفید M.Sc. *، حسین دشت نورد Ph.D.*،

حسین ایمانی Ph.D. *

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی اثرات ال-کارنیتین بر بافت بیضه موش صحرایی بالغ تیمار شده با کادمیوم

مواد و روش‌ها: برای انجام تحقیق حاضر ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ آلبینو از نژاد اسپراگو- داولی با وزن بین ۲۴۰-۱۸۰ گرم انتخاب شده و به‌صورت تصادفی به ۵ گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه اول (کنترل)؛ هیچ ماده‌ای دریافت نکردند و در شرایطی مانند بقیه گروه‌ها نگهداری شدند. گروه دوّم؛ آب مقطر به مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر، گروه سوم؛ ال- کارنیتین به مقدار ۵۰۰mg/kg وزن بدن، گروه چهارم؛ کادمیوم به مقدار ۱mg/kg وزن بدن و گروه پنجم؛ کادمیوم به مقدار ۱mg/kg وزن بدن + ال- کارنیتین به مقدار ۵۰۰ mg/kg وزن بدن را یک روز در میان و به مدت ۱۶ روز به‌صورت دا خل صفاقی دریافت کردند. در روز ۱۷ام بعداز اولین تزریق، موش‌های صحرایی نر در حالت بیهوشی تشریح شدند.

برای بررسی تعداد اسپرم، دم اپیدیدیم راست جدا و در داخل ۱۰ میلی لیتر، محلولHBSS تکه‌تکه شد. برای بررسی‌های بافت شناختی، بیضه راست حیوانات در داخل محلول تثبیت‌کننده، فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Ki-67 تقسیم سلولی در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه بررسی شد. همچنین با استفاده از Johensen Score ، جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه موش‌های مورد آزمایش بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان می‌دهد که کادمیوم باعث کاهش تعداد اسپرم دم اپیدیدیم، تقسیم سلولی در لوله‌های اسپرم‌ساز و جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم ساز بیضه می‌شود. به‌علاوه ال- کارنیتین باعث افزایش تعداد اسپرم دم اپیدیدیم، تقسیم سلولی در لوله‌های اسپرم‌ساز و جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه تیمار شده با کادمیوم می‌شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان عنوان کرد که ال-کارنیتین باعث بهبودی آثار مخرب کادمیوم بر بافت بیضه، تقسیم سلول اسپرماتوگونی و تعداد اسپرم دم اپیدیدیم می‌شود.

کلید واژه‌ها: ال- کارنیتین، کادمیوم، بافت بیضه، تعداد اسپرم، موش صحرایی نر بالغ

✍ **آدرس مکاتبه:** تهران، اقدسیه، گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

E-mail:hosseinbahadoran@yahoo.com

مقدمه

کادمیوم (Cd_{48}) یکی از آلوده‌کننده‌های صنعتی و محیطی است [۱]. از کادمیوم در صنعت برای تولید باتری‌ها، تهیه رنگ‌ها، پوشش‌ها، آبکاری فلزات، صنایع نظامی، کودهای شیمیایی، موادثبات بخش در پلاستیک‌ها (pvc) و ... استفاده می‌شود. افراد ممکن است از طریق رژیم غذایی، لوازم مصرفی، سیگار و آلوده‌کننده‌های محیطی در معرض آلودگی با کادمیوم قرار گیرند [۲].

کار و داس (Kar and Das) اعلام فرمودند؛ در حیواناتی که در معرض کادمیوم قرار می‌گیرند، ممکن است تغییراتی روی کبد، کلیه، استخوان، تخمدان و بافت بیضه اعمال شود. در بین این ارگان‌ها بیضه بیشتر از بقیه مستعد آسیب است و دوزی از کادمیوم (۱ mg/۱۰۰BW gr) به صورت تک دوز) که برای بقیه سمی نیست برای بیضه سمی است [۳].

در سال ۱۹۹۳ کادمیوم به‌وسیله آژانس تحقیقات سرطان (IARC) به‌عنوان یک ماده کارسینوژن در انسان تأیید شد [۱].

بیضه یکی از ارگان‌های هدف اصلی برای مسمومیت حاد و مزمن با کادمیوم در حیوانات آزمایشگاهی است [٤].

هموراژی شدید بافت بیضه، ادم و نکروز همراه با تخریب لوله‌های اسپرم‌ساز، آسیب اصلی به بافت بیضه در اثر تزریق کادمیوم گزارش شده است[۵ و٦] .

زو(Xu) و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که کادمیوم باعث کاهش تعداد اسپرم روزانه، کاهش تحرک اسپرم و آسیب غیرقابل برگشت به اپی‌تلیوم ژرمینال می‌شود [۷] .

دالتون (Dalton)اظهار داشت که کادمیوم باعث نکروز بافت بیضه‌ای و کاهش باروری در موش می‌شود [۸].

چن (Chen) و همکارانش اظهار داشتند که کادمیوم باعث کاهش تعداد اسپرم و کاهش تولید هورمون تستوسترون می‌شود [۹]. راه‌های متفاوتی برای توضیح مکانیسم آسیب کادمیوم به سلول‌های بافت پیشنهاد شده است که عبارتند از رادیکال آزاد اکسیژن لیپیدپراکسیداز را افزایش می‌دهد، به DNA آسیب می‌زند، سیستم آنتی‌اکسیدان را مختل می‌کند یا اینکه بیان ژن و آپوپتوز را دچار نقص می‌کند که از این پیشنهادات افزایش لیپیدپراکسیداز و مخصوصاً کاهش گلوتاتیون می‌تواند به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها، بهبود یابد [۱۰] . آسیب به بافت بیضه در اثر مسمومیت با کادمیوم به‌وسیله درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها بهبود می‌یابد [۱۱]. استفاده ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌ها بعد از آسیب بافت بیضه‌ای در اثر مسمومیت با کادمیوم، بهبودی فوق العاده را به همراه داشت[۱۲].

ال- کارنتین با فرمول شیمیایی β- هیدروکسی γ-N- تری متیل آمینوبوتیریک اسید (amino butyric acid β-hydroxy - γ-N- trimethyl) یک نقش اساسی را در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره طویل در متیوکندری و در نهایت تولید انرژی سلول دارا است [۱۳]. ۷۵ درصد کارنتین موجود در بدن از طریق غذا وارد بدن می‌شود و ۲۵ درصد آن از اسیدهای آمینه لیزین و متیونین در داخل بدن در کبد، مغز وکلیه سنتز می‌شود . غلظت آن در خون انسان و موش بزرگ صحرایی ثابت و در حدود ۱۰ تا ۵۰ میکرومول در لیتر است. بیشترین غلظت کارنتین در مایع اپیدیدیم و حدود دو هزار بار بیشتر از غلظت آن در خون است [١٤]. غلظت L.کارنتین در لومن اپیدیدیم از ناحیه سر به طرف دم افزایش می‌یابد [۱۳].

ال- کارنتین (LC: L-Carnetine) و استیل ال- کارنتین (ALC: Acetyl-L-Carnetine) به مقدار زیاد در اپیدیدیم متمرکز شده و نقش مؤثری در متابولیسم اسپرم، رشد اسپرم و پروسه اسپرماتوژنیک دارد. این دو ماده نقش آنتی‌اکسیدانی را بازی می‌کنند [۱۵].

ویتالی (Vitali) و همکاران در مطالعات روی ٤۷ بیمار تأثیر تجویز خوراکی۳gr/day ال- کارنیتین به مدت ۳ ماه را بررسی کردند. بیماران مردانی جوان، نابارور با آتسنوزواسپرمیای ایدیوپاتیک بودند. در انتهای دوره درمان میانگین تعداد اسپرم، تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده سریع افزایش قابل توجهی یافتند [١٦].

ویژگی‌های آنتی اکسیدانی کارنتین ممکن است به‌عنوان یک وسیله مؤثر علیه افزایش غلظت رادیکال آزاد اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) در بیمارانی با التهاب حاد باکتریال غدد فرعی (Accessory Glond) دستگاه تولید مثل مرد استفاده شود. این تأثیر درمانی بهترین روشی است که توسط Vicari و همکاران توصیه شده است [۱۵].

هاکی کارا (Haki Kara) با بررسی آثار ترکیب ملاتونین، ویتامینE و سلنیوم بر موش‌های تیمار شده با کادمیوم دریافت که ترکیب فوق تأثیر عمیقی بر ترمیم بافت تستیکولار آسیب دیده دارد [۱۲].

حال با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی ال- کارنتین در تحقیق حاضر آثار ال- کارنتین بر بافت بیضه و تعداد اسپرم دم اپیدیدیم در رت بالغ تیمار شده با کادمیوم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر تعداد ۳۰ سرموش صحرایی نر بالغ آلبینو(Albino) از نژاد اسپراگو- داولی(Sprayue-Dawley) با وزن بین ۲۴۰-۱۸۰ گرم به روش تصادفی ساده انتخاب و به ۵ گروه تقسیم شدند:

گروه اول یا گروه کنترل شامل ٦ سرموش صحرایی نر بالغ: به مدت ١٦ روز در شرایطی مانند بقیه گروه‌ها بدون تزریق ماده خاصی نگهداری شدند.

گروه دوم یا گروه شم شامل ٦ سرموش صحرایی نر بالغ: به مدت ١٦ روز و به صورت یک روز در میان ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر (حلال) به فرم اینتراپریتونئال (داخل صفاقی) تزریق شد [۱۷].

گروه سوم شامل ٦ سرموش صحرایی نر بالغ: ال-کارنتین را به مدت ١٦ روز و به صورت یک روز درمیان به مقدار ۵۰۰mg/kg Body Weight به صورت داخل صفاقی دریافت کردند [۱۸].

گروه چهارم شامل ٦ سرموش صحرایی نر بالغ: کادمیوم را به مدت ١٦ روز و به صورت یک روز در میان به مقدار BW۱mg/kg به فرم داخل صفاقی دریافت کردند [۱۲].

گروه پنجم شامل ٦ سرموش صحرایی نر بالغ: به مدت ١٦ روز و به صورت یک روز در میان در هر بار کادمیوم به میزان ۱ mg/kg BW و ال - کارنیتین به میزان ۵۰۰mg/kg BW یک ساعت قبل از کادمیوم به فرم داخل صفاقی دریافت کردند.

شایان ذکر است که برای تطبق موش‌ها با شرایط محیط حیوانخانه، موش‌ها به مدت یک هفته قبل از شروع تحقیق در محل فوق نگهداری شدند و در تمام مدت تحقیق شرایط نوری و غذایی مناسب و یکسانی برای آنها فراهم شد.

در روز هفدهم بعداز اولین تزریق، موش‌ها تحت شرایط استریل و در حالت بیهوشی تشریح و پارامترهای زیر بررسی شدند.

مطالعه تقسیم سلولی با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی Ki-67 در لوله‌های اسپرم ساز بیضه

به‌طور کلی فعالیت میتوزی سلول می‌تواند به‌وسیله روش‌های متفاوت ارزیابی شود. برای بررسی میتوز از برچسب زدن (labelling) نوکلئوتیدها (تیمیدین یا برموداکسی یوریدین) یا از نمایان کردن (detecting) پروتئین‌های خاص فاز S (PCNA یا Ki-67) استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر از روش Ki-67 استفاده شد [۱۹].

نمونه‌های بافتی به ضخامت ٤ میکرومتر از بلوک‌های پارافینی تهیه و مراحل روتین پارافین‌زدایی و آب‌دهی طی شد. سپس مراحل زیر به ترتیب انجام شد:

- نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب اکسیژنه (H_2O_2) قرار گرفتند تا آنزیم‌های آندوژن اکسید شوند.
- شستشو با بافر
- قرار گرفتن در Skimmed Milk (۱۰ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه برای بلوکه شدن لیگاندهای غیراختصاصی
- شستشو با بافر فسفات (PBS: Phosphate Buffered Solution)
- Rabbit Anti-Human Ki-67 Antige به مدت ۱-۱/۵ ساعت

- شستشو با بافر فسفات (PBS)
- استفاده از کیت ABLS (Avidin-Biutin Linker-sterepto) برای نمایان کردن آنتی‌ژن قبلی
- در انتها لام‌ها با آب شستشو داده شده و برای رنگ زمینه از هماتوکسیلین به مدت ۲ دقیقه استفاده شد [۲۰] .

از هر نمونه، ۱۰ لوله منی‌ساز به‌طور تصادفی انتخاب و با استفاده از کامپیوتر (نرم‌افزار intervideo) با بزرگنمایی ۱۰۰۰× عکس گرفته شد. سپس در هر تصویر تعداد سلول‌های در حال تقسیم شمارش و به‌صورت درصد بیان شد.

روش جمع‌آوری و شمارش اسپرم دم اپیدیدیم

بعد از تشریح برای جمع‌آوری اسپرم، دم اپیدیدیم راست جدا شده [۲۱] و در ظرفی محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول HBSS (Hanks BaLanced salt solution) [۲۲] که از قبل به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شده بود تکه‌تکه شد. پس از گذشت نیم ساعت و خروج اسپرم‌ها از مجاری اپیدیدیم و ایجاد یک محلول همگن، با استفاده از سمپلر ۵ میکرولیتر از محلول HBSS حاوی اسپرم روی مربع مرکزی لام نئوبار قرار گرفت و به‌وسیله لامل کوچک پوشانده شد. پس از ۵ دقیقه اسپرم‌ها ته‌نشین شدند. فقط اسپرم‌هایی که دارای سر، ناحیه میانی و دم بودند با استفاده از بزرگنمایی ۴۰۰ × میکروسکوپ نوری توسط دو نفر شمارش شدند تا خطا به حداقل کاهش یابد [۲۳ و۲۴]. برای این کار تعداد اسپرم‌های موجود در چهارخانه ۱۶ تایی مربوط به گلبول‌های سفید خون شمارش شده و میانگین گرفته شد. عدد حاصل تعداد اسپرم در ۰/۱ میلی‌متر مکعب خواهد بود ($۰/۱ mm^3 = ۱ mm \times ۱ mm \times ۰/۱ mm$) که در عدد۱۰ ضرب شد تا تعداد در ۱ میلی متر مکعب ($۱mm^3$) حاصل شود.

برای به‌دست آوردن تعداد اسپرم در یک میلی‌لیتر (سانتی‌متر مکعب) تعداد به‌دست آمده در $۱mm^3$ در ۱۰۰۰ ضرب شد. حال چون دم اپیدیدیم در ۱۰ میلی لیتر HBSS حل شده، برای محاسبه تعداد اسپرم‌های موجود در دم اپیدیدیم عدد حاصل در ۱۰ ضرب شد.

نتیجه اینکه عدد حاصل از میانگین ٤ خانه ١٦ تایی در $۱۰^۵$ ($۱۰^۵ = ۱۰ \times ۱۰۰۰ \times ۱۰$) ضرب شد تا تعداد اسپرم در دم اپیدیدیم به‌دست آید.

لازم به ذکر است اسپرم‌هایی که در مرکز این مربع‌ها بودند شمارش شدند و در مورد اسپرم‌هایی که لبه‌ها را قطع می‌کردند تنها آنهایی شمارش شدند که در تماس با لبه فوقانی و سمت راست مربع‌ها بودند [۲۵].

بررسی جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه براساس Johensen Score

پس از تشریح هر موش، بیضه سمت راست جدا شده و مراحل تثبیت، پردازش، برش(٤ میکرومتر) و در نهایت رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین به صورت روتین انجام شد. بعد از تهیه اسلاید از نمونه‌های تهیه شده، به منظور بررسی جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم ساز بیضه از Johensen Score (٢٦ و٢٧) استفاده شد. براساس این روش از هر نمونه،۱۰ لوله منی‌ساز به‌طور تصادفی انتخاب و با استفاده از کامپیوتر (نرم افزارintervideo) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ × عکس گرفته شد. سپس در هر تصویر جمعیت سلولی درون لوله‌ها طبق johnson score (جدول۱) نمره‌گذاری شده، میانگین اعداد حاصل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

اطلاعات به‌دست آمده توسط روش‌های آماری ANOVA و TUKEY مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

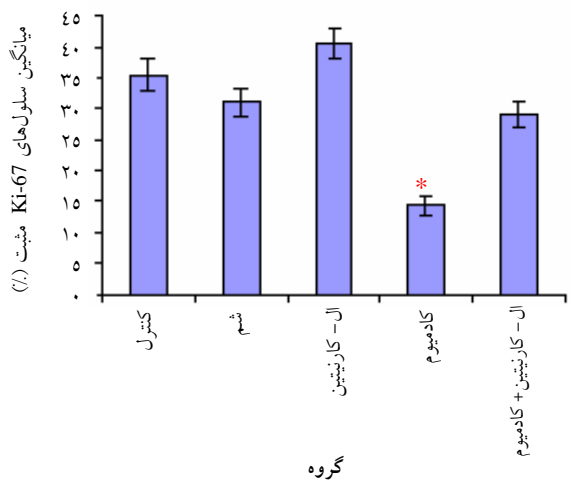
یافته‌ها

بررسی تقسیم سلولی در لوله‌های اسپرم ساز بیضه

شکل ۱، میانگین درصد سلول‌های در حال تقسیم ($Ki\text{-}67^+$)

جدول۱. johnson score

ظاهر هیستوپاتولوژی	امتیاز
توبولار اسکلروسیس	۱
فقط سلولهای سرتولی	۲
فقط سلولهای اسپرماتوگونیا	۳
توقف در اسپرماتوسیت اولیه	٤
تعداد زیادی اسپرماتوسیت بدون سلولهای اسپرماتید	٥
بدون اسپرماتید دیررس (late spermatids)، توقف در مرحله اسپرماتید	٦
بدون اسپرماتید دیررس (late spermatids)، تعداد زیادی اسپرماتید زودرس (early spermatids)	۷
تعداد کمی اسپرماتید دیررس (late spermatid s)	۸
تعداد زیادی اسپرماتید دیر رس، توبولار اپیتلیوم نامنظم	۹
اسپرماتوژنزیس کامل	۱۰



شکل ۱. میانگین درصد سلولهای در حال تقسیم در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه، درگروههای مورد مطالعه (Mean±SE)

*: کاهش معنی‌دار نسبت به کنترل ($p < 0.05$)

را در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه نشان می‌دهد (شکل۱).

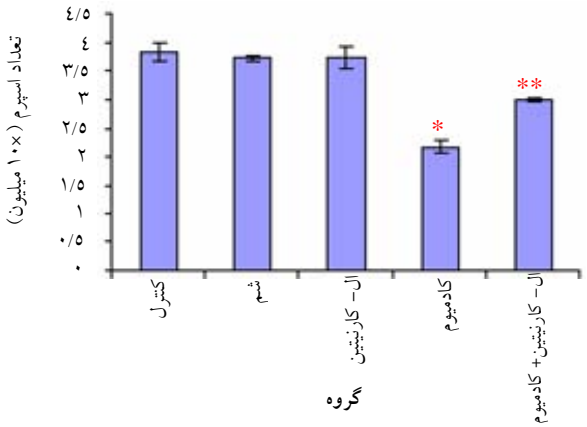
میانگین درصد سلول‌های در حال تقسیم در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه ٤ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را از نظر آماری نشان می‌دهد ($p <0.05$) .

میانگین درصد سلول‌های در حال تقسیم در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه‌های ۲ و ۵ نسبت به گروه کنترل کاهش یافته‌اند که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

همچنین افزایش این پارامتر در گروه ۳ نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بررسی تعداد اسپرم دم اپیدیدیم

شکل۲، میانگین تعداد اسپرم دم اپیدیدیم راست را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، تعداد اسپرم دم اپیدیدیم راست گروه‌های ۲ و۳ نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می‌دهند که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نیست. گروه‌های ٤ و ٥ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را از نظر آماری در تعداد اسپرم دم اپیدیدیم راست نشان می‌دهند ($p<0.05$). در ضمن افزایش این پارامتر در گروه ٥ نسبت به گروه ٤ نیز از نظر آماری معنی‌دار است ($p<0.05$).



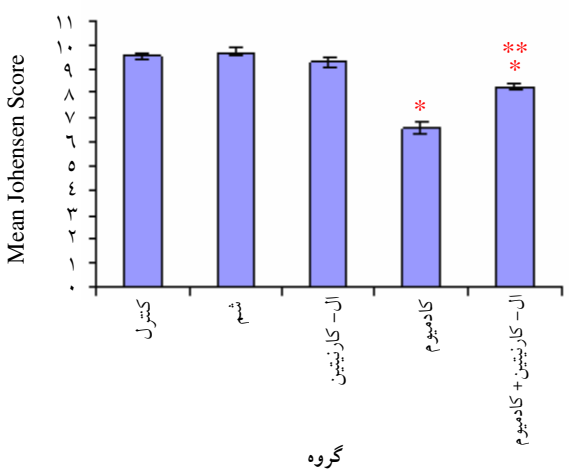
شکل ۲. میانگین تعداد اسپرم دم اپیدیدیم راست درگروههای مورد مطالعه (Mean ±SE)

*: کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$)

**: افزایش معنی‌دار نسبت به گروه ٤ ($p < 0.05$)

بررسی جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه

در شکل۳ میانگین جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه‌های ٥ گانه مشاهده می‌شود (شکل۳). میانگین جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم ساز بیضه گروه‌های ۲ و ۳ در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را از نظر آماری نداشتند.



شکل ۳. میانگین Johnson Score، در گروههای مورد مطالعه (Mean ± SE)

*: کاهش معنی‌دار نسبت به کنترل ($p < 0.05$)

**: افزایش معنی‌دار نسبت به گروه ٤ ($p < 0.05$)

میانگین جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گروه‌های ٤ و ٥ در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری دارای کاهش معنی‌دار بودند ($p<0.05$).

افزایش این پارامتر در گروه ٥ نسبت به گروه ٤ نیز از نظر آماری معنی‌دار است ($p<0.05$).

بحث

کادمیوم یک فلز سمی است که به‌وسیله القای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف تغییرات دژنراتیو ایجاد می‌کند. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که بیضه نسبت به مسمومیت با کادمیوم بسیار حساس است و کادمیوم با تغییر دادن سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت می‌شود [۱۱، ۲۸ و۲۹].

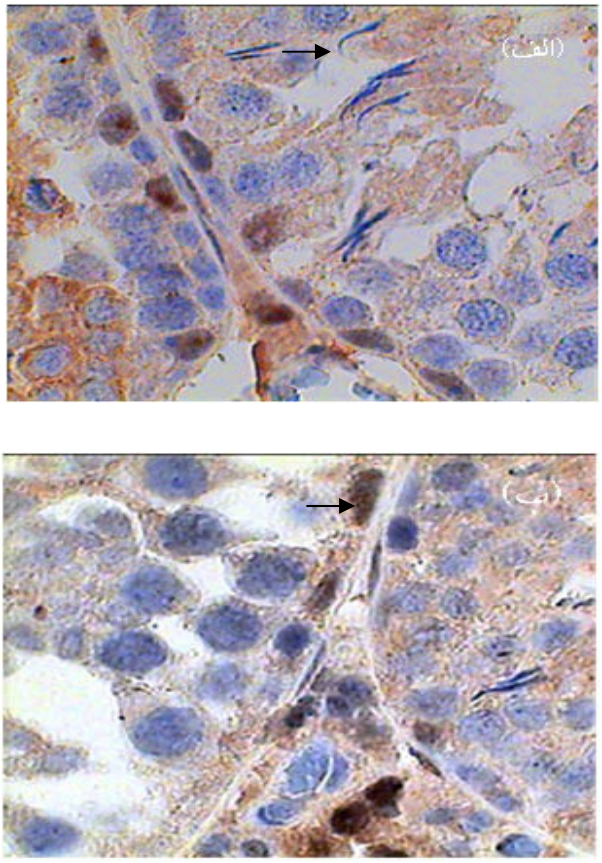
از طرف دیگر مطالعه‌ای که توسط مرال کویوترک (Meral koyuturk) و همکاران انجام شد، نشان داد که ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌ها (ویتامین C، E و سلنیوم) تأثیر زیادی را در بهبودی آسیب ایجاد شده توسط کادمیوم در بافت بیضه ایجاد کرده‌اند [۱۰]. مطالعات مشابهی نیز تأثیر درمانی آنتی‌اکسیدان‌ها بر بافت بیضه حیوان تیمار شده با کادمیوم را نشان داده‌اند [۱۲، ۱٦و۳۰]. همان‌طور که بیان شد ال- کارنتین و استیل- ال- کارنیتینبه میزان فراوان در اپیدیم انباشته می‌شوند و نقش مهم و تعیین کننده‌ای را در متابولیسم اسپرم، بلوغ اسپرم و روند اسپرماتوژنز داشته و همچنین نقش آنتی‌اکسیدانی دارند [۱۵].

حال با توجه به اینکه اثر درمانی برخی از آنتی اکسیدان‌ها در بهبودی استرس اکسیداتیو حاصل از کادمیوم روی بافت بیضه مثبت گزارش شده، ولی مطالعه‌ای که اثر ال- کارنیین بر سمیت کادمیوم در بافت بیضه را بررسی کرده باشد مشاهده نشد؛ بنابراین در تحقیق حاضر اثر آنتی اکسیدانی ال- کارنیتین بر بافت بیضه موش صحرایی تیمار شده با کادمیوم بررسی شد.

آنتی‌ژن Ki-67 مربوط به پروتئین هسته‌ای است و در مراحل M، انتهای G1، S و G2 چرخه سلولی نمایان می‌شود. در میتوز آنتی‌ژن Ki-67 روی همه کروموزوم‌ها وجود داشته و در ساختمان مشبک اطراف کروموزوم‌های متافازی ظاهر می‌شود. این آنتی‌ژن در ابتدای مرحله G1 و مرحله G0 و در مراحل ترمیم DNA قابل تشخیص نیست. بنابراین وجود آن در طول چرخه سلول در محدوده هسته نشانه اهمیت آن در تنظیم تقسیمات سلول است [۳۱]. در تحقیق حاضر با توجه به نتایج به‌دست آمده در حیوانات مواجهه شده با کادمیوم تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه کاهش یافته بود. به هر حال، تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه درمان شده با آنتی‌اکسیدان افزایش نشان داد (شکل‌های ۱ و ٤).

اسپرماتوگونی سلول زاینده اولیه در لوله‌های اسپرم ساز بیضه است که بعد از تقسیم به اسپرم تبدیل می‌شود [۳۲]. بنابراین ادامه تقسیم میتوزی در سلول‌های اسپرماتوگونی برای حمایت از ترمیم بافت بیضه و تعداد اسپرم مهم است.

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که کادمیوم باعث کاهش وزن ارگان‌های تناسلی، مقدار هورمون تستوسترون و کم شدن



شکل ٤. تصاویر میکروسکوپ نوری از بافت بیضه موش صحرایی بالغ در گروه‌های مورد مطالعه: تقسیمات سلولی به رنگ قهوه‌ای تیره با نوک پیکان نشان داده شده است که در گروه ٤ (ب) تعداد تقسیم کمتر از گروه کنترل (الف) است. رنگ‌آمیزی: Ki-67، بزرگنمایی:×۱۰۰۰

تعداد و تحرک اسپرم در حیوانات می‌شود [۳، ۹ و۳۳]. آکینلوی (Akinloye) و همکاران با بررسی ٦۰ مرد نیجریه‌ای عقیم دارای اختلالات آزواسپرمی و الیگواسپرمی دریافتند که میزان کادمیوم مایع منی آن‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است [۳٤].

در مطالعه حاضر نیز با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که کادمیوم باعث کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم اپیدیم حیوانات آلوده شده است (شکل ۲). کاهش تعداد اسپرم در اپیدیم موش‌های آلوده به کادمیوم را می‌توان به کاهش جمعیت سلولی موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه و کاهش تقسیم سلولی نسبت داد. همچنین مطالعات گذشته نشان داده اند، کادمیوم باعث کاهش تولید مقدار هورمون تستوسترون می‌شود که می‌تواند دلیل ثانویه بر کاهش جمعیت سلولی موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه و تعداد اسپرم باشد.

کاوالینی (Cavalini) و همکاران براساس مطالعات خود پی بردند، تجویز خوراکی ال- کارنیتین و استیل- ال- کارنیتین در درمان الیگوآستنوزو اسپرمیای ایدیوپاتیک به همراه واریکوسل مؤثر است [۳۵]. همچنین مطالعات مشابهی که تجویز ال- کارنتین در افراد نابارور را بررسی کرد، نشان داد که ال- کارنتین باعث افزایش میانگین تعداد و تحرک اسپرم می‌شود [۱٦، ۳٦ و۳۷].

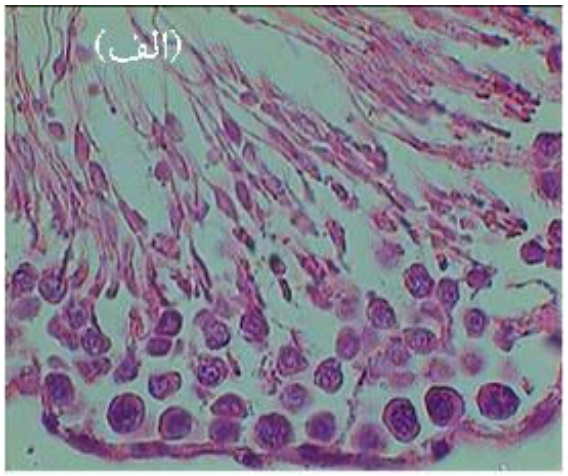
در تحقیق حاضر هم مشاهده شد که درمان با ال- کارنتین به‌عنوان یک آنتی اکسیدان باعث افزایش تعداد اسپرم در حیوانات تیمار شده با کادمیوم شده است. به‌نظر می‌رسد ال- کارنتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان احتمالاً با خنثی کردن رایکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از کادمیوم توانسته باشد از آثار تخریبی کادمیوم بر تعداد اسپرم جلوگیری کرده باشد.

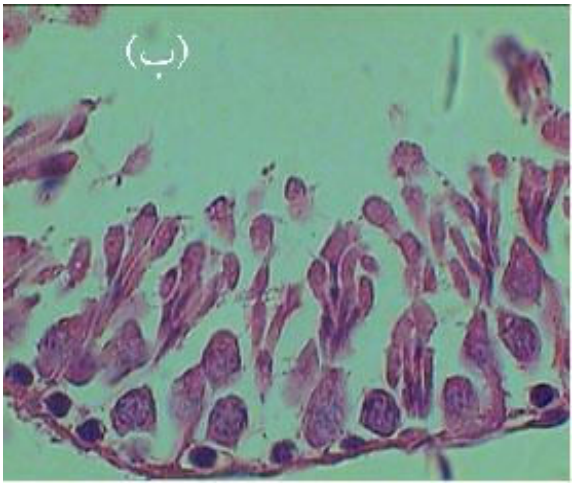
راماریا (Ramaĭia) و همکاران با بررسی روی موش گزارش نمودند که کادمیوم باعث مرگ سلولی اسپرماتوسیت، اسپرماتوگونی و در نتیجه عقیمی می‌شود [۱۷]. همچنین مطالعه مشابهی که توسط کاسیناتان (kasinathan) و همکاران (۱۹۸۷) انجام شد، نشان داد که کادمیوم باعث کاهش معنی‌دار اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه می‌شود [۳۸].

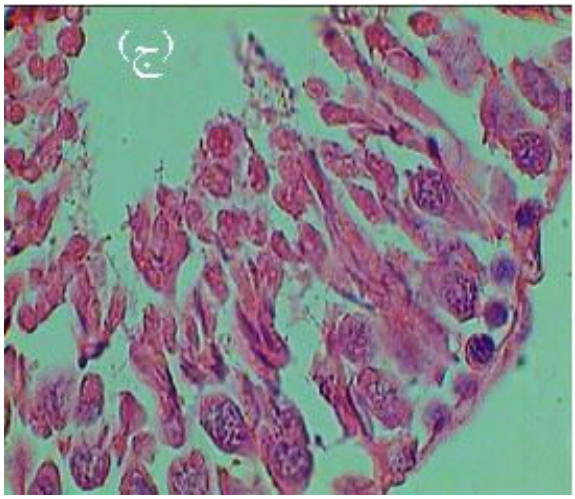
فوت (Foote) و همکاران بیان کردند که کادمیوم باعث کاهش اسپرماتوژنزیس و نکروز عناصر اسپرماتوژنیک در خرگوش می‌شود [۳۹].

در تحقیق حاضر هم با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که کادمیوم باعث کاهش جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز حیوانات تیمار شده با آن شده است (شکل‌های ۳ و ۵ ب).

مواجه شدن با کادمیوم در سیکل سلولی، تقسیم سلولی، آپوپتوز و تعمیر DNA اختلال ایجاد می‌کند و بیان ژن‌های مسئول تقسیم سلولی را کاهش می‌دهد [٤]. کالمودولین یک







شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ نوری از بافت بیضه موش‌های بزرگ صحرایی بالغ در گروه‌های کنترل (الف)، گروه ٤ (کادمیوم) (ب) گروه ۵ (کادمیوم+ ال- کارنیتین) (ج) ، رنگ‌آمیزی: H&E ، بزرگنمایی: ۱۰۰۰×

پروتئین تنظیمی است که در تقسیم سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند و کادمیوم باعث تخریب آن می‌شود [۳]. با توجه به اینکه سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه نیز دارای تقسیم سلولی زیادی هستند، بنابراین می‌توانند تحت تأثیر کادمیوم قرار گیرند و تقسیم سلولی در آن‌ها مهار شود که این خود منجر به کاهش جمعیت سلولی موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه می‌شود.

در یک مطالعه موش‌های سوری در معرض اشعه X قرار گرفتند تا اسپرماتوگونی‌ها در آن‌ها از بین برود. تعداد اسپرم در موش‌هایی که ال- کارنتین دریافت کرده بودند نسبت به موش‌هایی که آن را دریافت نکرده بودند، بهبودی سریعتری را نشان داد. ال- کارنتین در مراحل اولیه اسپرماتوژنز تأثیر زیادی بر ترمیم DNA و تکثیر سلول‌های زایای دژنره شده دارد [۱۵]. بنابراین ال- کارنیین می‌تواند با افزایش تقسیم سلولی در گروه تیمار شده با کادمیوم باعث افزایش جمعیت سلول‌های اسپرماتوژنیک (بهبود در روند اسپرماتوژنز) شده باشد (شکل ۵ ج).

با توجه به نتایج به‌دست آمده می توان نتیجه‌گرفت که ال- کارنتین از آثار منفی کادمیوم بر تعداد اسپرم دم اپیدیدیم، تقسیم سلول اسپرماتوگونی و جمعیت سلول‌های زایای موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه موش صحرایی جلوگیری می‌کند.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر در گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شده است، بنابراین نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های گروه آناتومی، خانم ابوعلی و آقای مهدوی نسب کمال تشکر را داشته باشند.

References

1. **Blanco A, Moyano R, Vivo J, Flores-Acuña R, Molina A, Blanco C, et al.** Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. Environ Toxicol Pharmacol 2007; 23 (1): 96-101.
2. **Francielli W, Dominguita S, Graca L, Zeni G, Joao B, Rocha T, et al.** Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. Reprod Toxicol 2006; 22(3): 546-50.
3. **Ibrahim M, El-Ashmawyl A, Sameh A.** The Antagonistic Effect of Chlorpromazine on Cadmium Toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1999; 161: 34-9.
4. **Zhou T, Jia X, Robert E, Robert R, Martha W, Jie L, et al.** Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. Toxicol Let 2004; 154 (3): 191-200.
5. **Mason K, Brown J, Young J, Nesbit R.** Cadmium-induced injury of the rat testis. Anat Res 1964; 149:135-48.
6. **Gupta RK, Barnes GW, Skelton FR.** Light microscopic and immunopathologic observations on cadmium chloride induced injury in the mature rat testis. Am J Pathol 1967; 51: 191-204.
7. **Xu LC, Wang SY, Yang XF, Wang XR.** Effects of cadmium on rat sperm motility evaluated with computer assisted sperm analysis. J Biomed Environ Sci 2001; 14(4): 312-7.
8. **Dalton T, Fu K, Enders GC, Palmiter RD, Andrews GK.** Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium J. Environ Health Perspect 1996; 104(1):68-76.
9. **Chen L, Ren WH, Zhu SL, Gao W, Zhou J, Jiang YZ, et al.** Effects of chronic cadmium loading on the testis and endocrine function of reproduction in male rats. J Acta Physiologica Sinica 2002; 54(3): 258-62.
10. **Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S.** Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. J Environ Toxicol Pharmacol 2006; 21: 235-40.
11. **Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY, Lin TH.** Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. Biometals 1999; 12: 353-9.
12. **Kara H, Cevik A, Konar V, Dayangac A, Yilmaz M.** Protective Effects of Antioxidants Against Cadmium-induced Oxidative Damage in Rat Testes. J Biological Trace Element Res 2007; 120: 1-3.
13. **Jeulin C, Lewin LM.** Role of free l-carnitine & acetyle l-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. J Hum Reprod Update 1996; 2(2): 87-102.
14. **Lenzi A, Sgro P, Salacone P.** Aplacebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine & l-acetyle-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. J Fertil Steril 2004; 81(6): 1578-84.
15. **Agarvwal A, Said TM.** Carnitine and male infertility. Repro Biomed Online 2004; 8(4): 376-84.
16. **Vitali G, Parente R, Melotti C.** Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: clinical results. Drugs Expt Clin Res 1995; 21(4): 157-59.
17. **Ramaïia LK, Pomerantseva MD.** Mutagenic action of cadmium on the sex cells of male mice. J Genetika 1977; 13(1): 59-63.
18. **Dokmeci D, Inan M, Basaran U, Yalcin O, Aydogdu N, Turan FN, et al.** Effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. J Cell Biochem Funct 2006; 2: 137-46.
19. **Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M.** The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohischemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. J Mol Hum Reprod 1998; 4 (3): 227-33.
20. **Silva TMC, Souza SS, Almeida TF, Andrade ZA.**

Ki-67 is expressed in multiplying forms of chistosoma mansoni,but not in snail host tissues. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro 2000; 102(5): 651-53.

21. **Rashidi I, Movahedin M, Tiraihi T.** The Effects of Pentoxifylline on Mouse Epididymal Sperm Parameters, Fertilization and Cleavage Rates after Short Time Preservation. Ir J Reprod Med 2004; 2(2): 51-7.
22. **Mesbah SF, Shokri S, Karbalay-Doust S, Mirkhani H.** The Effect of Nandrolone Decanoate on the Body, Testis and Epididymis Weight and Semen Parameters in Adult Male Rats. Ir J Med Sci 2007; 32(2): 93-9.
23. **Roob GW, Amann RP, Killian GJ.** Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. J Reprod Fertil 1978; 54(1): 103-7.

۲٤. رضازاده ولوجردی م. تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم. چاپ اول، بشری ۱۳۸۱، صفحات ۳٤-۲۷.

25. **Manual for basic semen analysis,** NAFA andrology laboratory quality group on semen analysis, 2002 , pp 7-23.
26. **Glander Hj, Horn Lc, Dorschner W, Paasch U, Kratzsch J.** Probability to retrive testicular spermatozoa in azoospermic pathion. J Asian Androl. 2000; 2: 199-205.
27. **Johnsen SG.** Testicular biopsy and score count a method for registration of spermatogenesis in human testis. normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1970; 1: 2-25.
28. **El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH.** Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical arameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and carotene. Food Chem Toxicol 2004; 42: 1563-71.
29. **Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M.** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2001; 20: 77-82.
30. **Yadav N, Khandelwal S.** Effect of Picroliv on cadmium induced testicular damage in rat. Food Chem Toxicol 2008; 46(2): 494-501.
31. **Hall PA, Levison DA.** Review: Assessment of cell proliferation in histological material. J Clin Pathol 1990; 43:184-92.
32. **Olive V, Cuzin F.** The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. Int. J Biochem Cell Biol 2005; 37: 246-53.
33. **Chia SE, Ong CN, Lee ST, Tsakok FH.** Blood concentrations of lead, cadmium, mercury, zinc, and copper and human semen parameters. J Arch Androl 1992; 29(2): 177-83.
34. **Akinloye O, Arowojolu AO, Shittu OB, Anetor JI.** Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. J Reprod Biol 2006; 6(1): 17-30.
35. **Cavallini G, Ferrareti AP, Gianaroli L, Biagioti G, Vitalli G.** Cinnoxicam and L-carnitine/ acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele associated oligoasthenospermia. J Androl 2004; 25(5): 761-70.
36. **Costa M, Canale D, Filicori M, Dlddio S, Lenzi A.** L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. Italian study group on carnitine and male infertility. Andrologia 1994; 26(3): 155-9.
37. **Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, et al.** Aplacebo-cotrolled bouble-blind randomized trial of the use of combind L-carnitine and l- acetyl - carnitine treatment in men with asthenozoospermia. Fertil Steril 2004; 81(6): 1578-84.
38. **Kasinathan S, Veeraraghavan K, Ramakrishnan S.** Effect of cadmium on the spermatogenesis of Rana hexadactyla Lesson. J Acta Morphol Hung 1987; 35(3-4):183-7.
39. **Foote RH.** Cadmium affects testes and semen of rabbits xposed before and after puberty. J Reprod Toxicol 1999; 13(4): 269-77.