بررسی اثر تجویز بتائین خوراکی بر کیفیت اسپرم موش رت متعاقب مسمومیت با کادمیوم

آرش خردمند[1]، مسعود علیرضایی[2]، امید دزفولیان[3]

۱- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۲- استادیار، بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره شانزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۳ / مسلسل ۵۹

چکیده

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۱ ، پذیرش مقاله: ۹۳/۲/۳۰

مقدمه: هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر حفاظتی بتائین خوراکی در برابر اثرات کادمیوم بر کیفیت اسپرم شامل حرکات پیشرونده اسپرم، سلامت غشاء اسپرم، غلظت و نیز وزن بیضه می باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۳۰ عدد موش رت نر بالغ به ۳ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل-سالین، کادمیوم-سالین و کادمیوم-بتائین تقسیم شده و به دو گروه آخر یک دوز کادمیوم از طریق صفاقی تزریق شده و سپس به گروه سوم، از یک روز قبل از تزریق کادمیوم به مدت ۱۰ روز پیاپی محلول بتائین خورانده شد. سپس ۵ موش از هر ۳ گروه در روزهای ۵ و ۱۰ پس از تزریق کادمیوم کشته شده و نمونه اسپرم از دم اپیدیدیم جهت ارزیابی آن اخذ شد.

یافته ها: کادمیوم به طور معنی داری باعث کاهش وزن بیضه ها شد. از طرف دیگر، درصد اسپرم های با حرکت پیشرونده و همچنین درصد اسپرم های با غشاء سالم و نیز غلظت اسپرماتوزوئیدها به طور معنی داری در گروه کادمیوم نسبت به گروه کنترل در هر دو روز کشتار کاهش یافت. درحالی که تجویز بتائین توانست درصد سلامت غشاء اسپرم را بطور معنی داری نسبت به گروه کادمیوم سالین در روز ۱۰ افزایش دهد (۲۸/۸٪ در گروه بتائین در برابر ۹/۴٪ در گروه کادمیوم($P=۰/۰۴۴$). اگرچه درصد حرکات پیشرونده اسپرم در روز ۱۰ متعاقب تجویز بتائین نسبت به گروه کادمیوم-سالین افزایش داشت، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود.

بحث و نتیجه گیری: بتائین احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی می تواند اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم را در بافت بیضه کاهش دهد که این امر باعث افزایش سلامت غشاء اسپرم و متعاقباً افزایش نسبی حرکات پیشرونده اسپرم می گردد.

واژه‌های کلیدی: بتائین، کادمیوم، اسپرم، رت.

آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی.
پست الکترونیک: arashkheradmand@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

کادمیوم (Cd) یک عنصر سمی محیطی است که باعث اختلالات اندوکرینی در انسان و جوندگان می شود. بسیاری از بافتها مثل کبد و کلیه و به ویژه بیضه ها به سمیت ناشی از کادمیوم حساس بوده و یکی از دلایل عمده کاهش باروری و افت عملکرد بیضه در مردان در دهه های اخیر را ناشی از آلودگی آنان با این گونه مواد سمی می‌دانند (۱). معمولاً آلودگی با Cd از طریق آب و غذا و یا در مشاغل باطری سازی و رنگ سازی و یا صنایع آب کاری اتفاق می افتد. به طور معمول پیامد مصرف بی رویه کودهای فسفاته علاوه بر تجمع فسفر بیش از نیاز، باعث ایجاد رقابت با جذب عناصر ریزمغذی به ویژه روی و از همه مهمتر تجمع آلاینده هایی نظیر Cd در محصولات کشاورزی می شود. به طور متوسط هر فرد روزانه از طریق غذا یک میکروگرم Cd دریافت می‌کند. آژانس بین المللی تحقیقات سرطان، کادمیوم را جزء یکی از عوامل کارسینوژن طبقه بندی کرده است. همچنین این ماده باعث آسیب به رویان و نیز بیضه ها و تخمدان می شود که ثابت شده به سمیت ناشی از Cd بسیار حساس هستند (۲).

یکی از مکانیسم های عملکرد Cd در بیضه ها، استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن متعاقب مصرف این ماده می باشد (۳). بطوریکه ثابت شده Cd باعث افزایش معنی دار غلظت مالوندیول دهاید و کاهش معنی دار در فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در بیضه ها می گردد. از طرف دیگر، افزایش رادیکال های آزاد متعاقب مصرف Cd باعث مهار فعالیت استروئیدسازی از جمله تستوسترون در بیضه ها می گردد (۴،۵). از همین رو در مطالعات مختلف نشان داده شده که مصرف آنتی اکسیدان های مختلف می تواند اثرات مخرب ناشی از Cd را در بیضه ها تا حدود زیادی کاهش دهد (۹-۴).

بتائین در بعضی از گیاهان نظیر چغندر قند، غلات و اسفناج یافت شده و مستقیماً از طریق روده ها جذب می شود (۱۰). به طوریکه عنوان شده، حداکثر جذب روزانه بتائین از طریق مواد غذایی ۵۰۰-۴۰۰ میلی گرم می باشد (۱۱). در مطالعات جدید ثابت شده که مصرف بتائین خوراکی استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف الکل را در مغز (۱۲) و بیضه رت (۱۳) کاهش می دهد. لذا انتظار می رود که تجویز بتائین بتوانند از طریق افزایش فعالیت آنزیم ها و ترکیبات آنتی اکسیدانی و نیز کاهش پراکسیداسیون لیپیدها بافت بیضه و بخصوص اسپرم ها را در برابر اثرات زیانبار کادمیوم مصون بدارد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ عدد موش رت نر بالغ با وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم برای انجام این مطالعه در نظر گرفته شد که به تعداد ۵ عدد در هر قفس در خانه حیوانات با دما و نور کنترل شده نگهداری می شدند. غذای پلت شده و آب تازه نیز در اختیار آنان قرار داشت. بتائین خوراکی برای انجام مطالعه از شرکت Biochem آلمان و کلرید کادمیوم نیز از شرکت Sigma آمریکا تهیه شدند.

سپس موش ها به ۳ گروه ۱۰ تایی شامل کنترل-سالین، کادمیوم-سالین و کادمیوم-بتائین تقسیم شدند. برای ایجاد آسیب به بیضه یک دوز از محلول کلرید کادمیوم به میزان ۲ mg/kg به شکل داخل صفاقی تزریق شد. ثابت شده که این دوز کادمیوم باعث آسیب و تخریب سلول های بیضه می شود (۷). بتائین خوراکی به شکل محلول و با دوز ۱۸۰ mg به ازاء هر موش از یک روز قبل از تزریق کادمیوم و به مدت ۱۰ روز به گروه سوم خورانده شد. سپس موش ها در روزهای ۵ و ۱۰ پس از تزریق کادمیوم (از هر گروه ۵ موش) کشته شده و بیضه آنها به منظور ارزیابی کیفیت اسپرم استخراج و با ترازوی دیجیتالی توزین شدند. به دنبال آن دم اپیدیدیم با قیچی جدا

1. National Comprehensive Cancer Network

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-29]

شده و برای خروج اسپرم ها، در ۲cc سالین نرمال ریزریز شـده و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند.

برای ارزیابی سلامت غشاء اسپرم از آزمون HOS و براسـاس روش اسـلیوا و مـاکورا (۱۴) اسـتفاده شـد. بـدین ترتیـب کـه ۱۰ میکرولیتر از اسپرم به ۰/۴ cc آب مقطر اضافه گردید و بـه مـدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری می شدند. اسپرم هـای بـا دم پیچ خورده بعنوان اسپرم های با غشاء سـالم (HOS مثبـت) تلقـی می‌شوند. برای تعیین غلظت، ۵۰ میکرولیتر اسپرم در یک میلی لیتر فرمالین سالین رقیق شده (میزان رقت ۱ به ۲۰) و سپس با اسـتفاده از لام هماسیتومتر تعداد اسپرم در هـر نمونـه مـشخص شـد. آنـالیز آماری داده ها نیز پس از بررسی وضعیت نرمال بودن داده هـا و نیـز برابری واریانس ها، با استفاده از آزمون آنالیز واریـانس یـک طرفـه و سپس آزمون Tukey انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج بدست آمده از پارامترهای مختلف اسپرم در روزهای ۵ و ۱۰ پس از تزریق کـادمیوم در جـداول ۱ و ۲ نـشان داده شـده انـد.

تزریق کادمیوم به طور معنی داری باعث کـاهش وزن بیـضه هـا در روزهای ۵ و ۱۰ شد (P=۰/۰۲۴). اما ۱۰ روز تجویز بتائین نتوانـست افزایش معنی داری در وزن بیضه ها ایجاد نمایـد. همچنـین درصـد حرکت پیشرونده اسپرم ها نیز به طور معنـی داری متعاقـب تجـویز کادمیوم در هر دو روز مطالعه کاهش یافت. اگرچه مـصرف خـوراکی بتائین توانست در روز ۱۰ باعث افزایش درصد اسپرم های متحـرک نسبت به گروه کادمیوم- سالین شود (۲۱ ٪ در گروه کادمیوم- بتائین در مقابل ۴/۲ ٪ در گروه کادمیوم– سالین)، امـا ایـن افـزایش نیـز از لحاظ آماری معنی دار نبود. در مقابل، بتائین توانست درصـد اسـپرم های با غشاء عملکردی سالم یا HOS مثبت را که به دلیل مـصرف کادمیوم کاهش معنی دار یافته بود بطور معنی داری افزایش داده، به طوریکه در روز ۱۰ از نظر آماری بیش از درصد اسپرم هـای HOS مثبت در گروه کادمیوم-سالین بود (P=۰/۰۴۴). این در حالی است که مصرف بتائین نتوانست کاهش غلظـت اسـپرم هـا را کـه در اثـر تجویزکادمیوم اتفاق افتاده بود، به طور معنـی داری در هـیچ یـک از گروه های آزمایشی بهبود بخشد.

جدول ۱. میانگین ± خطای استاندارد پارامترهای مختلف اسپرم در روز ۵ پس از تزریق کادمیوم در سه گروه مورد مطالعه

گروه ها	وزن بیضه (گرم)	حرکات پیشرونده (٪)	سلامت غشاء (٪)	غلظت ($\times 10^6$)
کنترل-سالین	۱/۴۴ ± ۰/۰۵	۵۴/۴۰± ۳/۲۶	۶۵/۶۰± ۱/۶۹	۴۹/۵۰± ۲/۰۰
کادمیوم-سالین	۱/۰۸ ± ۰/۰۸*	۲۵/۰۰± ۹/۳۵*	۳۴/۰۰± ۳/۶۷*	۲۴/۰۰± ۳/۳۱*
کادمیوم-بتائین	۰/۹۳± ۰/۰۹*	۷/۴۰± ۳/۳۵*	۳۹/۰۰± ۱۱/۱۱*	۱۹/۵± ۵/۰۲*

علامت * نشان دهنده تفاوت میانگین با گروه کنترل-سالین است (P<۰/۰۵).

جدول ۲. میانگین ± خطای پارامترهای مختلف اسپرم در روز ۱۰ پس از تزریق کادمیوم در سه گروه مورد مطالعه

گروه ها	وزن بیضه (گرم)	حرکات پیشرونده (٪)	سلامت غشاء (٪)	غلظت ($\times 10^6$)
کنترل-سالین	۱/۵۶ ± ۰/۰۸	۴۸/۲۰± ۳/۹۵	۵۹/۰۰± ۱/۸۷	۷۵/۰۰± ۱۳/۲۹
کادمیوم-سالین	۰/۸۹ ± ۰/۰۷*	۴/۲۰± ۲/۹۳*	۹/۴۰± ۴/۸۳*	۹/۵± ۷/۶۴*
کادمیوم-بتائین	۰/۹۰± ۰/۲۲*	۲۱/۰۰± ۸/۷۱*	۲۸/۸۰± ۶/۹۳#*	۳۳/۰۰± ۱۲/۸۳*

علامت * نشان دهنده تفاوت میانگین با گروه کنترل-سالین است (P<۰/۰۵).
علامت # نشان دهنده تفاوت میانگین با گروه کادمیوم-سالین است (P<۰/۰۵).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-29]

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق قابلیت بتائین را در کاهش اثرات مخرب کادمیوم بر کیفیت اسپرم نشان داد. به طوریکه باعث افزایش معنی دار عملکرد غشاء اسپرم نسبت به گروه کادمیوم-سالین شده که این امر خود باعث افزایش نسبی درصد اسپرم های با حرکات پیشرونده نسبت به این گروه شد.

بتائین یکی از نیازهای بدن بوده که در بسیاری از بافت های پستانداران وجود داشته و نقش موثری در حفظ فشار اسمزی داخل سلول دارد و از طریق تنظیم ماکرومولکول های خارج سلولی باعث تنظیم حجم سلول می شود. بتائین در بعضی از خوراک ها وجود داشته و به طور مستقیم از طریق روده جذب می شود. از طرف دیگر نقش آنتی اکسیدانی بتائین در بیضه موش رت ثابت شده است (۱۱). همچنین وجود غلظت بالای بتائین در بیضه رت ثابت شده است (۱۵). شواهد نشان می دهند که بتائین به عنوان یک دهنده متیل عمل می کند که این امر نقش مهمی در باروری جنس نر دارد (۱۶). متابولیسم بتائین از طریق بتائین-هموسیستئین متیل ترانسفراز در نهایت می تواند باعث تولید S-آدنوزیل متیونین شود که نقش مهمی در سنتز کراتین دارد. کراتین نیز اهمیت ویژه ای در تحرک و عملکرد اسپرم دارد (۱۷).

از طرف دیگر ثابت شده که تجویز کادمیوم باعث افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیز میزان MDA (بعنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها) و همچنین کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی GPx و SOD می شود (۷). لذا نقش بتائین در کنترل این استرس اکسیداتیو می تواند مؤثر باشد. در حقیقت غشاء پلاسمایی اسپرم سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع بوده و بنابراین به پراکسیداسیون لیپیدها حساس بوده که این امر خود باعث از بین رفتن سلامت غشاء و کاهش تحرک اسپرم می شود. بنابراین کاهش درصد HOS در موش های گروه کادمیوم-سالین در مطالعه حاضر قابل توجیه بوده و جالب این که تجویز بتائین به طور معنی داری احتمالاً با جلوگیری از پراکسیداسیون غشاء اسپرم ها، باعث افزایش درصد اسپرمهای HOS مثبت گردید. از طرف دیگر ثابت شده که ارتباط معنی داری بین اسپرم های HOS مثبت و میزان نفوذ اسپرم به داخل اووسیت وجود دارد. همچنین ارتباط معنی داری بین اسپرم های HOS مثبت انسان با میزان تحرک اسپرم مشاهده شده است (۱۸). این یافته ها شاید توجیهی جهت افزایش میزان تحرک اسپرم در مطالعه حاضر باشد که با دریافت ۱۰ روزه بتائین، عملکرد غشاء اسپرم آنها افزایش معنی دار داشته است.

به عنوان نتیجه گیری می توان عنوان کرد تجویز بتائین خوراکی احتمالاً بتواند باعث اثر حفاظتی در اسپرم‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم شود، به طوریکه باعث افزایش معنی دار سلامت غشاء اسپرم‌ها و نیز افزایش نسبی درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده می شود.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این طرح از محل اعتبارات مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تأمین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-29]

References

1. Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 238: 240-249.
2. Thompson J, Bannigan J. Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. Reprod Toxicol. 2008; 25: 304-315.
3. Oteiza PI, Adonaylo VN, Keen CL. Cadmium-induced testicular oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. Toxicol. 1999; 137: 13-22.
4. Ognjanovic BI, Markovic SD, Dordevic NZ, Trbojevic IS, Stajn AS, Saicic ZS. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reprod Toxicol. 2010; 29: 191-197.
5. Messaoudi I, Banni M, Said L, Said K, Kerkeni A. Evaluation of involvement of testicular metallothionein gene expression in the protective effect of zinc against cadmium-induced testicular pathology in rat. Reprod Toxicol. 2010; 29: 339-345.
6. Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. Environ. Toxicol Pharmacol. 2006; 21: 235-240.
7. Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur, Ahnn J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. Mol Cells. 2004; 17: 132-139.
8. Amara S, Abdelmelek H, Garrel C, Guiaud P, Douki T, Ravanat JL, Favier A, Sakly M, Rhouma KB. Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. J Reprod Develop. 2008; 54: 129-134.
9. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Prevention of testicular damage by free-radical scavengers. Urology. 1997; 50: 759-763.
10. Zeisel SH, Mar MH, Howe JC, Holden JM. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. J Nutr. 2003; 133: 1302-1307.
11. Detopoulou P, Panagiotakos DB, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. Am J Clin Nutr. 2008; 87: 424-430.
12. Alirezaei M, Jelodar G, Niknam P, Ghayemi Z, Nazifi S. Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. J Physiol Biochem. 2011; 67: 605-612.
13. Alirezaei M, Jelodar G, Ghayemi Z. Antioxidant Defense of Betaine Against Oxidative Stress Induced by Ethanol in the Rat Testes. Int J Pept Res Ther. 2012; 18: 239-247.
14. Sliwa L, Macura B. Evaluation of cell membrane integrity of spermatozoa by hypoosmotic swelling test-water test in mice after intraperitoneal diadzein administration. Archives Androl. 2005; 51: 443-448.
15. Slow S, Lever M, Chambers ST, George PM. Plasma dependent and independent

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-29]

transport systems in the male reproductive tract. Biol Reprod. 1998; 58: 1437-1444.

18. Chan SY, Fox EJ, Chan MMC. The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. Hum Reprod. 1985; 44: 668-672.

accumulation of betaine in male and female rat tissues. Physiol Res. 2009; 58: 403-410.

16. Kelly TLJ, Nega OR, Sghwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice in partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. Biol Reprod. 2005; 72: 667-677.

17. Lee H, Kim JH, Chae YJ, Ogawa H, Lee MH, Gerton GL. Creatine synthesis and

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-29]