(مقاله پژوهشی)

بررسی اثراگزامات بر حرکت اسپرم در موش صحرائی درشرایط *In vivo*

منیژه کدخدایی الیادرانی*، قاسم ساکی**[۱]، جواد ساکی***

چکیده

زمینه و هدف: LDH-C4 یکی از ایزوآنزیم های لاکتات دهید روژناز است که در بافت بیضه و اسپرماتوزوا گونه های با لقاح داخلی مشاهده می شود به نظر می رسد نقش فیزیولوژیک این ایزوآنزیم در ارتباط با تولید انرژی برای حیات و حرکت اسپرماتوزوا باشد. اگزامات یکی از آنالوگ های پیروات است که در محیط آزمایشگاهی به عنوان مهار کننده رقابتی LDH-C4 در واکنش احیاء پیروات به لاکتات مشاهده شده است. در این مطالعه اثر اگزامات، مهارکننده اختصاصی ایزوآنزیم LDH-C4 به صورت *In vivo* مورد بررسی قرار گرفت، با این هدف که چنانچه این ترکیب بر فعالیت آنزیم LDH-C4 اسپرم و حرکت آن در درون بدن تاثیر داشته باشد در مطالعات ناباروری مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۱۵ ± ۲۰۰ گرم در محدوده سنی ۱۲ تا ۱۳ هفته به چهار گروه تقسیم شدند و در قفس های جداگانه نگهداری گردیدند. یک گروه به عنوان گروه کنترل فقط سالین دریافت کردند و به سه گروه دیگر دوزهای مختلف اگزامات۶۰۰، ۳۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۴۵روز به روش داخل صفاقی تزریق گردید. سپس موشها با کلروفرم کشته شده و ناحیه دمی اپی دیدیم آنها جدا گردید. درناحیه دمی اپی دیدیم چند برش ایجاد شد و قطعات اپی دیدیم در محیط کشت T6 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار داده شدند تا اسپرم ها خارج شوند. تحرک اسپرم ها با استفاده از Makler Chamber در گروه های دریافت کننده دارو مشخص شد و با گروه کنترل مقایسه گردید.

نتیجه گیری: حرکت رو به جلو اسپرمها در گروه کنترل ۲/۸± ۶۰/۳درصد و در گروه های دریافت کننده اگزامات با افزایش غلظت اگزامات (۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) ۲/۴±۵۰، ۹/ ۱± ۵/ ۴۱ و ۲/۲± ۱۹درصد مشاهده شد. در این مطالعه نتیجه گرفته شد که اگزامات به طریق درون تنی حرکت اسپرم را کاهش می دهد و کاهش حرکت با افزایش غلظت اگزامات به صورت وابسته به دوز است. *م ع پ ۱۳۸۸؛ ۸ (۲): ۱۷۵ – ۱۶۹*

کلید واژگان: اگزامات، LDH-C4، حرکت اسپرم، موش صحرایی

مقدمه

امروزه موضوع کنترل جمعیت در رأس برنامه بسیاری از کشورها می باشد. طبق گزارش سازمان ملل تخمین زده شده که جمعیت دنیا در سال ۲۰۵۰ به ۱۰/۹ بیلیون برسد(۱). بنابراین تحقیق در خصوص روش های مؤثر جهت جلوگیری از باروری امری ضروری است. مسوولان بهداشت در این کشورها تلاش می کنند تا با ارائه روش های نوین جلوگیری از بارداری و بستن لوله ها در زن و مرد این امر مهم را به اجرا در آورند. با پیشرفت دانش فیزیولوژی تولید مثل، امروزه تحقیقات زیادی در ارتباط با male–contraceptive در حال انجام است (۲).

* دانشیارگروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
** دانشیارگروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
*** کارشناس ارشد گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۱- نویسنده مسوول: Email: ghasemsaki@yahoo.com

دریافت مقاله ۱۳۸۷/۳/۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۷/۱۰/۲۴ اعلام قبولی: ۱۳۸۷/۱۱/۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

LDH-C4 یکی از ایزوآنزیمهای لاکتات دهید روژناز (Lactate: NAD+ Oxidoreductase E.C:1.1.1.27) است که واکنش برگشت پذیر تبدیل پیروات به لاکتات را کاتالیز می نماید. LDH-C4 محصول ژن ldh-c می باشد که در بیضه و اسپرم در زمان بلوغ جنسی سنتز می شود (۳). حضور اختصاصی LDH-C4 در بیضه ها و اسپرم سبب شده که LDH-C4 به عنوان آنزیم هدف در مطالعات ضد باروری به کار رود (۴).

ایزو آنزیم LDH-C4 یکی از چندین مکانیزم تنظیمی در گیر در واکنش های متابولیک مورد نیاز برای باروری است. سنتز LDH-C4 برای اسپرمانوژنزیس فعال مورد نیاز است (۵). لاکتات توسط سلول های سرتولی ترشح می شود و برای فعالیت متابولیک اسپرم لازم است و ایزوآنزیم LDH-C4 در سلول های ژرمینال اکسیداسیون لاکتات را کاتالیز می کنند (۶).

اسپرم بیشتر پستانداران دو نوع حرکت فیزیولوژیک را به نمایش می گذارند: حرکت فعال (یا حرکتی که در اسپرم ها هنگام انزال دیده می شود که این نوع حرکت در اسپرمهای تازه دیده می شود و حرکت بیش فعال (این نوع حرکت را در محل باروری کسب می کنند) (۷). پیشنهاد شده که نقش حرکت فعال، رساندن و عبور دادن اسپرم از مسیر تناسلی ماده تا لوله فالوپ می باشد و حرکت بیش فعال به جدا شدن اسپرم از اپیتلیوم لوله فالوپ و رساندن آن به محل باروری و عبور از پوششهای تخمک به اووسیت کمک می کند (۹و۸). اگزامات یکی از آنالوگ های پیروات است که در محیط آزمایشگاهی بعنوان مهار کننده رقابتی LDH-C4 در واکنش احیاء پیروات به لاکتات مشاهده شده است (۱۱و۱۰).

LDH-C4 در سیتوزول، ماتریکس، فضای بین دو غشای میتوکندری و در غشای پلاسمایی اسپرم یافت می شود (۱۲). وجود این فرم منحصر به فرد LDH در سلولهای اسپرماتوگونیک، به نظر می رسد که عملکرد خاصی را در آن بافت دارا باشد (۱۳).

با توجه به این که مطالعات قبلی نشان داده اند که اگزامات و مشتقات آن در شرایط آزمایشگاهی بر روی حرکت اسپرم اثر مهاری دارند و به صورت درون تنی (In vivo) تحقیق بیوشیمیائی صورت نگرفته بود، هدف از انجام تحقیق این بود که اثر اگزمات را بر روی حرکت اسپرم در موش صحرائی به روش In vivo مورد مطالعه قرار دهیم.

روش بررسی

مواد شیمیایی استفاده شده در این پروژه از شرکت سیگمای آمریکا و موش های صحرائی نر بالغ از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه گردید.

تعداد ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۱۵ ± ۲۰۰ گرم در محدوده سنی ۱۲ تا ۱۳ هفته به طور جداگانه در چهار قفس نگهداری شدند. در تمام مدت آزمایش شرایط نور ۱۲/۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی و رژیم غذایی یکسان (شرکت خوراک دام پارس تهران) در اختیار آنها قرار داده شد. یک گروه به عنوان گروه کنترل فقط سالین دریافت کردند و به سه گروه دیگر دوزهای مختلف اگزامات (۶۰۰،۳۰۰ و۱۵۰) روزانه به مدت ۴۵روز با حجم ۲۵۰ میکرولیتر به روش داخل صفاقی تزریق گردید (۱).

پس از پایان دوره تزریق اگزامات، موشهای هر گروه با کلروفرم کُشته شدند و بیضه آنها جدا گردید. ناحیه دمی اپی دیدیم جدا شد و در یک ظرف حاوی بافر فسفات پتاسیم سرد ۵ ۰/۰ مولار و pH: ۷/۴ قرار داده شد. چند برش در آن ایجاد گردید و قطعات اپی دیدیم در محیط کشت T6 به مدت یک ساعت در انکوباتور تحت شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن قرار داده شدند. بدین ترتیب اسپرم ها از

Archive of SID
www.SID.ir

قطعات اپی دیدیم خارج گردیده و در محیط کشت وارد شدند.

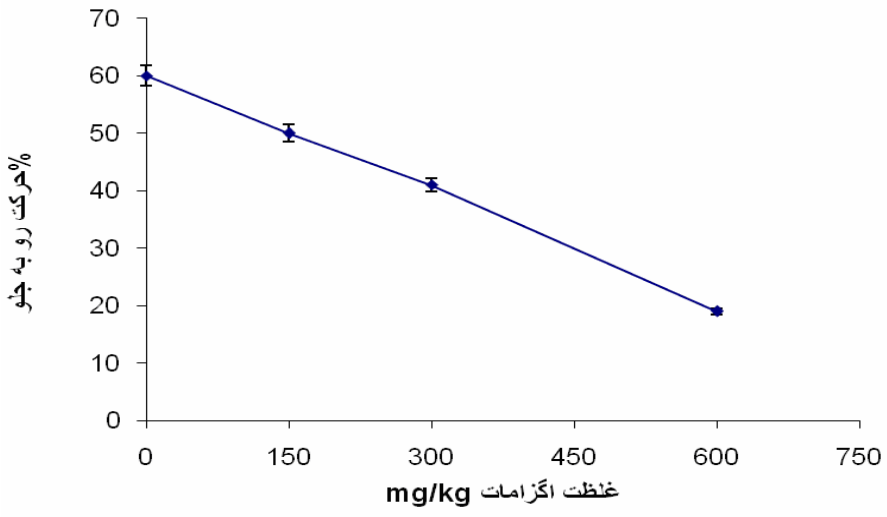
جهت بررسی تحرک اسپرم مقدار ۱۰ میکرولیتر از قطرات گروه کنترل و غلظت های مختلف اگزامات را روی حفره شمارش اسپرم (Makler Chamber) قرار داده شد و تحرک اسپرم ها به کمک میکروسکوپ معکوس (Inverted microscope) ارزیابی شد. بدین ترتیب که ابتدا تعداد کل اسپرم ها شمارش و سپس تعداد اسپرم های دارای حرکت رو به جلو (a + b)، حرکت در جا (c)، و بدون حرکت (d) موجود در ۱۰ خانه به طور تصادفی شمارش گردید و تحرک اسپرم ها در هر گروه به صورت در صد نشان داده شد (۷).

نتایج آزمایشات با استفاده از نرم افزار SPSS Ver.15.0 و روش های آماری تی و آنالیز واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفت.

..

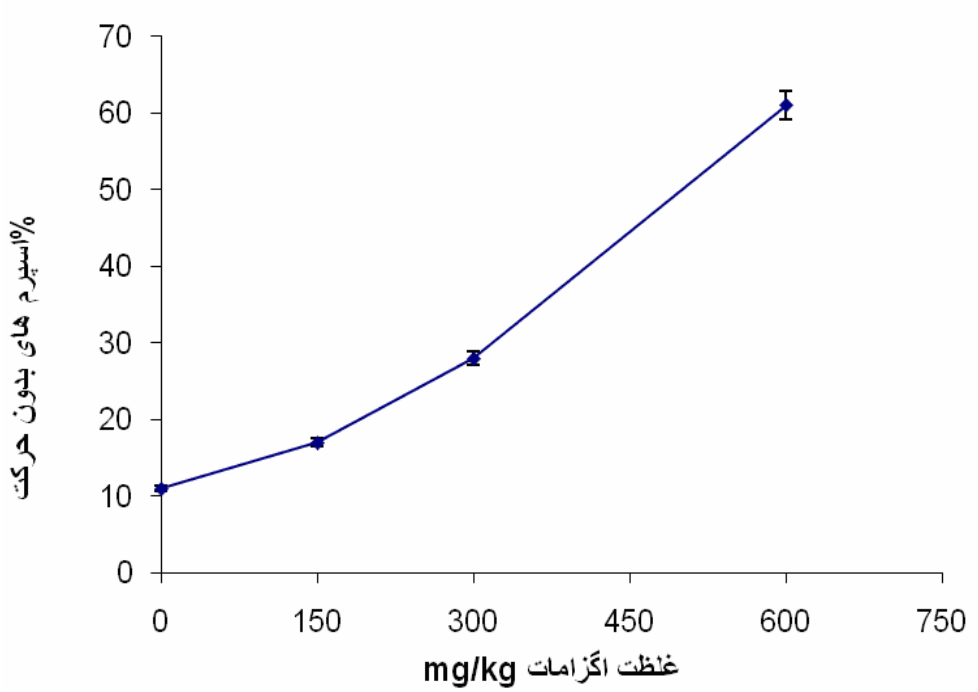
میانگین و انحراف معیار تحرک رو به جلو اسپرمها در چهار گروه کنترل و گروه هایی که اگزامات با غلظت های ۱۵۰، ۳۰۰ و۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن دریافت کرده بودند به ترتیب معادل ۲/۸±۶۰، ۲/۴±۵۰، ۱/۹±۴۱/۵ و ۲/۲±۱۹ محاسبه شد (نمودار ۱). در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم اگزامات، حرکت رو به جلو اسپرم در حدود ۶۹ درصد نسبت به گروه کنترل به طور معنا دار کاهش یافته بود (P <۰/۰۵). درصد اسپرم های غیر فعال در گروههای مختلف در نمودار ۲ نشان داده شده است. میانگین و انحراف معیار تحرک درجا اسپرمها در چهار گروه کنترل و گروه هایی که اگزامات با غلظت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن دریافت کرده بودند به ترتیب ۲/۲±۲۹ ، ۱/۷۵±۳۳ ، ۳/۵±۳۱ و۱/۷۵±۲۰ محاسبه شد. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف آماری معنا داری بین گروه های ذکر شده فوق وجود دارد(P <۰/۰۵).

میانگین و انحراف معیار اسپرمها ی بدون حرکت در چهار گروه کنترل و گروه هایی که اگزامات با غلظت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن دریافت کرده بودند به ترتیب به میزان ۲±۱۱، ۲/۷±۷، ۲/۱۷±۲۸ و ۱/۸±۶۱ محاسبه شد. با انجام آزمون آماری آنالیز واریانس مشخص شد که اختلاف آماری معنا داری بین گروه های ذکر شده فوق وجود دارد(P <۰/۰۵).



نمودار ۱: درصد حرکت رو به جلو اسپرم ، در گروه کنترل و گروه هایی که غلظتهای مختلف اگزامات (۶۰۰mg/kg/day ip، ۳۰۰ و۱۵۰) دریافت کرده بودند.

www.SID.ir



نمودار ۲: درصد اسپرم بدون حرکت، در گروه کنترل وگروه هایی که غلظتهای مختلف اگزامات (mg/kg/day ip۶۰۰،۳۰۰و۱۵۰) را دریافت کرده اند.

بحث

این مطالعه نشان داد که حرکت رو به جلو اسپرمها در گروه های دریافت کننده اگزامات با افزایش غلظت اگزامات کاهش می دهد. فعالیتLDH-C4 متناسب با تراکم اسپرم است و نشان داده شده است که در افراد اولیگو اسپرم کاهش یافته است(۱۳). در اسپرم از اکسیداسیون فروکتوز و گلوکز NADH حاصل می شود و باید مکانیزم هایی باشد که الکترون های NADH را به میتوکندری منتقل کند، وجود LDH-C4 در سیتوزول و میتوکندری اسپرم سبب شده است که علاوه بر شاتل مالات-آسپارتات، شاتل دیگری را جهت اکسیداسیون NADH پیشنهاد کنند. به نظر می رسد این ایزوآنزیم در ایجاد انرژی برای حرکت و زنده بودن اسپرم نقش مهمی داشته باشد (۱۵و ۱۴). چنانچه LDH-C4 غیر فعال شود، سلول اسپرم قادر به استفاده از لاکتات نبوده که منجر به کاهش حرکت و غیرفعال شدن اسپرم می شود(۱۷و۱۶).

با توجه به نقشی که LDH-C4 در ایجاد انرژی اسپرم ها دارد، تلاش هایی توسط محققین در زمینه مهار فعالیت این آیزوآنزیم انجام شده تا شاید از این طریق بتوانند انرژی لازم جهت انجام فرایندهای ظرفیت پذیری، تحرک و واکنش آکروزومی را کاهش دهند و در

Archive of SID
www.SID.ir

نهایت از طریق این کاهش انرژی، فرآیند لقاح را مهار کنند.

یکی از مهار کننده های LDH-C4 که در سال های اخیر مورد استفاده قرار گرفته است اگزامات و مشتقات آن می باشد (۱۸و۱). مطالعات انجام شده نشان داده اند که در شرایط آزمایشگاهی اگزامات باعث کاهش فعالت آنزیم LDH-C4 می شود.

در تحقیق حاضر پس از تزریق غلظت های مختلف اگزامات (۶۰۰ ، ۳۰۰ و ۱۵۰میلی گرم در کیلوگرم) مشاهده شده که با افزایش غلظت اگزامات حرکت اسپرم کاهش یافته و درصد حرکت رو به جلو اسپرم در گروه هایی که اگزامات با غلظت ۱۵۰ ، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن دریافت کرده بودند به طور معنا دار کاهش یافته است. مقدار این کاهش وابسته به دوز اگزامات مصرف شده بود، به طوریکه در غلظت۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم اگزامات، حرکت رو به جلو اسپرم؛ در حدود ۶۹ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که اگزامات با غلظت۶۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در شرایط in vivo بطور مشخصی باعث کاهش حرکت اسپرم شده است.

در مطالعه ای که توسط گلدبرگ و همکاران (۱۷) بر روی اثر مهارکنندگی اگزامات بر ظرفیت پذیری (capacitation) اسپرم موش در شرایط آزمایشگاه انجام شده نشان داده شده که اگزامات در روش وابسته به دوز موجب کاهش حرکت رو به جلو می شود (۱۸). در مطالعه دیگری اثر ان- ایزوپروپیل اگزامات بر روی حرکت اسپرم و لقاح در موش سفید آزمایشگاهی بررسی شد و مشاهده گردید که ان ایزوپروپیل اگزامات به عنوان یک مهار کننده اختصاصی آنزیم LDH-C4 موجب کاهش حرکت اسپرم و لقاح می شود؛ به نحوی که در غلظت ۴۵ میلی مولار حدود تحرک اسپرم ۶۷درصد کاهش یافته بود(۱).

در مطالعه ای که توسط ادت(Odet) و همکاران انجام شده با غیر فعال کردن ژن Ldhc در موش های مذکر و مؤنث نشان داده اند که در حالت فقدان ژن مربوطه (-/-) باروری در جنس مذکر به شدت آسیب دیده است در صورتی که در جنس مونث تاثیر بارزی مشاهده نشده است. همچنین در این مطالعه مشخص گردید که فعالیتLDH-C 4 در اسپرم به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافته است. این مطلب که نشان دهنده نقش اساسی این آنزیم در تولید ATP لازم برای حرکت اسپرم و عمل لقاح می باشد (۱۹).

داده ها در این مطالعه نشان دادند که نتایج مطالعه درون بدنی اثر اگزامات با مطالعات *in vitro* مطابقت دارد و اگزامات در داخل بدن موش نیزاست اثر مهار کننده گی را بر حرکت اسپرم القاء نماید چنانچه این ترکیب شیمیائی عوارض جانبی بر سایر بافت های بدن نداشته باشد، می تواند به عنوان داروی ضد باروری مردانه مورد توجه قرار گیرد.

قدردانی

تحقیق حاضر از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۸۶۱۰۱ – U از پایانامه دانشجویی ارشد آقای جواد ساکی استخراج شده و بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که حمایت مالی طرح را بر عهده داشتند تشکر و قدر دانی می شود.

منابع

1- Rodríguez-Páez L, Guzmán-Ibarra R, Acuña-González C, Santillán-Báez A, Moreno-Rodríguez R, Wong C. The study of N-isopropyl oxamate on sperm motility and fertility, in mice. Proc West Pharmacol Soc 2002; 45:171-3.

2- Coonrod S,Vital A,Duan C,Bristol Gould S Herr J Goldberg E. Testis specific lactate dehydrogenase (LDH-C4;idh3)in murine oocytes and preimplantation embryos. J Androl 2006; 27:502-509.

Archive of SID
www.SID.ir

3- Goldberg E. Reproductive implementation of LDH-C4 and other testes specific isozymes. Exp Clin Immunogenet 1985; 2:120-4.
4- Dutta RC, Goldberg E.Testis specific lactate dehydrogenase as target for immunoliposomes. Am J Reprod Immunol 2008; 60(1):26-32.
5- Wong C, Rodriguez-Paezl, Nogueda B, Perez A, Baez I. Selective inhibition of the sperm-specific lactate dehydrogenate isozyme- C4 by N -isoproyl Oxamat. Biochem Biophys Acta 1997; 1343:16-22.
6- Yu Y, Deck JA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, Goldberg E, et al. Selective active site inhibitors of lactate dehydrogenaseA4 , B4,and C4. Biochem Pharmacol 2001; 62(1):81-9.
7- Girad MN, Motta C, Boucher D, Grizard G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15(1.): 2160-4.
8- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. Reprod Fertil Dev 2006; 18:25-38
9- Lakmichi MA, Niang L, Tligui M, Traxer O, Cussenot O, Gattegno B, et al. Infertility and testicular seminoma. Presse Med 2007; 36(12):1753-5.
10- Kadkhodaei Elyaderani M, Khoshnezhad A, Ghaffari MA, Amozgari Z. Effect of oxamate on the activity of LDH-C4 extracted from rat testis. Biochem Cell Arch 2007; 7(2):237-44.
11- Rahim F, Saki G, Ghavamizadeh B, Jafaee A, Kadkhodaee M, The Effect of Oxamate on Fertilization Capacity of Mouse Sperm in vitro. Int J Pharmacol. 2009 ; 5(2): 178-180
12- Burgo C, Maldonado C, Nelia M. Intracellular localization of the testicular and sperm specific lactate dehydrogenases isozyme-C4 in mic. Biol Reprod 1995; 53:84-92.
13- Sawane MV, Kaore SB, Gaikwad RD, Patil PM, Patankar SS, Deshkar AM. Seminal LDH-C4 isoenzyme and sperm mitochondrial activity: a study in male partners of infertile couples. Indian J Med Sci 2002; 56(11):560-6.
14- Gerez NM, Burgos C, Montamat EE. A shuttle system for the transfer of reducing equivalents in mouse mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 1987; 81:644-9.
15- Gallina FG, Gerez de Burgos NM, Burgos C, Coronel CE, Blanco A. The lactate/pruvate shuttle in spermatozoa : opration in vitro. Arch Biochem Biophys 1994; 308:515-9.
16- Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproduction 2001; 122:519-29.
17- Kumar TR, Muralidhara. Induction of oxidative stress by organic hydroperoxides in testis and epididymal sperm of rats in vivo. J Androl 2007; 28(1):77-85.
18- Goldberg E Duane. Inhibition of lactate dehydrogenate C4 blocks Capacitation of mouse sperm in vitro. Cytogenet Genome Res 2003; 103 :352-9.
19- Odet F, Duan C, Willis WD, Goulding EH, Kung A, Eddy EM, et al. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. Biol Reprod 2008; 79(1):26-34.

Archive of SID

www.SID.ir

(Original Article)

Study the effect of oxamate on rat sperm motility *in vivo*

Kadkhodaei Elyaderani[1] M, Saki[*2]G, Saki[3] J

[1] Department of Biochemistry and Thalassaemia & Hemoglobinopathy Research Center [2]Department of Anatomical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences,[3] Physiology research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract

Background and Objective: LDH- C4 is an isoenzyme of lactate dehydrogenase that is found in mature testes and spermatozoa of species with internal fertilization. Its physiological function appears related to metabolic processes that provide energy for motility and survival of spermatozoa. Oxamate is a new selective competitive inhibitor of sperm LDH- C4 with pyruvate as substrate. In the present experimental study on male rat, the effectiveness of oxamate was evaluated as a novel approach to the development of a male contraceptive.

Materials and Methods: In this study, 20 adult rats were divided into 4 groups, the first used as control and the remaining three used as experimental groups. Experimental groups received different concentration, of oxamate (150, 300, 600 mg/kg/,ip) for 45 days. Control animals received normal saline solution. The sperms from the cauda division of epididymidis were collected by placing minced cauda in culture medium (T6) for one hour at 37˚ C in a 5% CO_2 atmosphere. Sperm motility was evaluated utilizing Makler chamber and compared with the control group. Statistical analysis was performed by the student t- test and one – way ANOVA.

Results: Progressive sperm motility in control and treated there groups were %60.3 ± 2.8), %50 ± 2.4), %41.5 ± 1.9) , %19 ± 2.2) respectively. We conclude that oxamate *in vivo* can reduce sperm motility significantly and this reduction was concentration-dependent.

Conclusion: The results of this work show that sperm motility can be reduced by concentration- dependent effect of oxamate under *in vivo* conditions.

Keywords: Oxamate, LDH-C4, Sperm motility

Received: 8/3/1387 **Revised: 24/10/1387** **Accepted: 15/11/1387**

Archive of SID

* Corresponding author email:ghasemsaki@yahoo.com

www.SID.ir