

بررسی اثر مکمل کوآنزیم Q10 بر بیان ژن آپوپتوز و استرس اکسیداتیو پس از تزریق بوسولفان در موش

صحرائی

رسول شهروز^۱، مونس مولودی تپه^{۲*}، مزدک رازی^۳، لیلا زارعی^۴، وحید محمدی^۵

۱-استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲-دانشجوی دکتری تخصصی بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳-دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴-دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۵-استادیار، گروه علوم درمانگاهی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

یافته / دوره بیست و یکم / شماره ۴ / زمستان ۹۸ / مسلسل ۸۲

چکیده

دریافت مقاله: ۹۸/۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۸/۹/۱۰

مقدمه: بوسولفان یک داروی شیمی درمانی برای سرطان بوده که عوارضی را به واسطه رادیکال‌های آزاد در اندام‌های مختلف از جمله دستگاه تناسلی ایجاد می‌کند. حفظ سیستم تولیدمثل و باروری با داروها و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانسی در این بیماران ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: از ۳۲ قطعه موش صحرائی نر نژاد ویستار بالغ، در ۴ گروه ۸ تایی استفاده گردید. برای گروه کنترل، حلال بوسولفان (شامل DMSO+PBS) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و برای گروه بوسولفان، به صورت تک دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه درمان (بوسولفان + کوآنزیم Q10) بمیزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن روزانه در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر داخل صفاقی به مدت ۳۵ روز دریافت کردند. همچنین گروه کنترل مثبت، فقط Q10 به میزان گروه درمانی دریافت نمودند.

در پایان دوره، سرم حیوانات برای اندازه‌گیری سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی، پراکسیداسیون چربی‌ها و سوپراکسید دیسموتاز جمع‌آوری و پس از اندازه‌گیری نسبت وزن بیضه به بدن، بیضه‌ها دو قسمت شده و مورد ارزیابی بیان ژن‌های Caspase-3 و Bax, Bcl-2 و رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد در سرم موش‌های درمان شده با بوسولفان، استرس اکسیداتیو در طی ۳۵ روز افزایش یافته و گروه دریافت‌کننده کوآنزیم Q10 توانسته است استرس اکسیداتیو را به صورت معنی‌داری ($p < 0.005$) کاهش دهد. ارزیابی RT-PCR نشان داد که میزان Caspase 3 mRNA و Bcl-2 در گروهی که بوسولفان را به تنهایی دریافت کرده بود به طور چشمگیری ($p < 0.005$) کاهش داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از مکمل کوآنزیم Q10 می‌تواند باعث تجدید فرآیند اسپرماتوژنز به واسطه کاهش استرس اکسیداتیو و تاثیر بر روند آپوپتوز در موش‌های درمان شده با بوسولفان شود.

واژه‌های کلیدی: کوآنزیم Q10، آپوپتوز، آنتی‌اکسیدانسی، موش صحرائی.

*آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی.

پست الکترونیک: moloody81@yahoo.com

مقدمه

شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی با تغییرات زیادی در دستگاه تناسلی مردان همراه است (۱). در بین این عوامل، داروهای آلکیله کننده بیشترین اثرات سو را در بیضه‌ها دارند (۲). امروزه در کشورهای پیشرفته، درمان موفق بدخیمها و امید به زندگی در این افراد به میزان بالایی افزایش یافته است و عمده این افراد، به ویژه افراد جوان، پس از بهبودی تمایل به داشتن قدرت باروری و فرزند هستند. از جمله عوامل شیمی‌درمانی آلکیله کننده می‌توان بوسولفان را نام برد (۳). که قبل از پیوند مغز استخوان در کودکان و بالغین نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، این دارو در درمان لوسمی میلوژنیک مزمن و سرطان تخمدان نیز به‌طور وسیع کاربرد دارد. این در حالی است که بوسولفان به سلولهای سالم فرد تحت شیمی‌درمانی آسیب می‌زند. داروهای شیمی‌درمانی منجر به القای آپوپتوز در انواع سلول‌ها از جمله سلولهای زایای بیضه به واسطه آسیب به اسپرماتوگونی‌ها می‌شود.

در موارد شیمی‌درمانی با استفاده از بوسولفان، تاثیر منفی آن در از بین بردن سلول‌های مولد اسپرم از طریق تسهیل استرس اکسیداتیو در بافت بیضه را می‌توان از عوارض جانبی دارو عنوان کرد (۴). به نظر می‌رسد که استفاده توأم بوسولفان با آنتی‌اکسیدانها بتواند اثرات جانبی دارو را کاهش دهد. کوآنزیم Q10 بواسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند نقش هم‌افزایی داشته و مانع پراکسیداسیون چربی‌ها و تخریب سلولها شود (۵). همولوگهای متفاوتی از کوآنزیم Q10 وجود دارد که شکل غالب در انسان کوآنزیم Q10 و در جوندگان کوآنزیم Q9 است. کوآنزیم Q10 در هسته آب‌گریز فسفولیپیدهای غشا داخلی میتوکندری‌ها، جایی که زنجیره نقل و انتقال الکترون نقش دارد، قرار گرفته و به صورت محلول و متحرک در بین دو لایه غشا است. برای درمان اختلالات میتوکندریایی نقش استفاده از کوآنزیم Q10 بخوبی نشان

داده شده است. کوآنزیم Q10 یک ۴ - ۱ بنزوکینون به همراه یک زنجیره جانبی ایزوپرنوئید ۵۰ کربنه می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۵۷ در آمریکا از میتوکندری‌های قلب گاو جدا شده است (۶).

بررسی منابع در ارتباط با موضوع نشان می‌دهد که تاکنون در مورد استفاده از این آنتی‌اکسیدان در کاهش صدمات بافتی بیضه در درمان با بوسولفان مطالعه‌ای ثبت نشده و هدف از این مطالعه بررسی بافت‌شناسی و بیوشیمیایی تاثیر محافظتی کوآنزیم Q10 در بیضه موش‌های صحرایی بالغ تحت درمان با بوسولفان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق که نوع مطالعه از نوع تجربی و نوع طراحی آن از نوع فاکتوریل می‌باشد از ۳۲ قطعه موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با سن تقریبی ۷-۸ هفته و با وزن میانگین وزنی 180 ± 20 گرم، جهت انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. حیوانات در اتاق پرورش و نگهداری دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تحت شرایط استاندارد در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰ درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعت (شروع روشنایی ساعت ۷ و شروع تاریکی ساعت ۱۹) در قفس‌های مخصوص، با دسترسی به آب و غذای کافی و براساس راهنمای مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند (National Institutes of Health publication No. 86-23).

حیوانات مورد مطالعه به صورت تصادفی در ۴ گروه ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. برای گروه کنترل، حلال بوسولفان (شامل DMSO+PBS) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. گروه بوسولفان (ساخت شرکت سیگما الدریک، کد: B2635) به صورت تک دوز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن و به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه درمان (بوسولفان + کوآنزیم Q10) نیز بعد از تجویز بوسولفان (دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن)، کوآنزیم Q10 به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن روزانه در حجم ۰/۱

تیو باربیتوریک ایجاد می‌شود اندازه‌گیری می‌شود. واحد اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید نانو مول بر میلی‌لیتر است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

به منظور بررسی فعالیت آنزیم SOD از کیت Zel Biol (ساخت کشور آلمان) استفاده شد. مکانیسم اندازه‌گیری SOD در کیت مذکور بر اساس تولید رادیکال های سوپر اکسید تولید شده در سامانه گزانتین و گزانتین اکسیداز است که با نیترو بلو تترازولیوم واکنش نشان داده و رنگ فورمازان را ایجاد میکند که در طول موج ۵۶۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد. در ضمن میزان این واکنش بر اساس میلی مول در دقیقه بیان شد.

بررسی پراکندگی سلول‌های بیان کننده Bcl-2 به

روش ایمنوهیستوشیمی

برش‌های بافتی، درون آون به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس در زایلین پارافین‌زدایی و با استفاده از الکل آبیگری شدند. ابتدا در محلول رتریوال (بافر سدیم سترات 10 mM)، سپس در محلول آب اکسیژنه قرار گرفته و بدنبال آن به ترتیب در محلول سوپر بلاک (بلاک کردن آنتی ژن غیراختصاصی) و آنتی بادی اولیه Bcl2 و آنتی بادی کنژوگه (آنتی بادی ثانویه -HRP) و محلول (Dab-کروموزن) قرار گرفت. مراحل رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد (Biocare, USA). در رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی، قسمت‌هایی که حاوی پروتئین Bcl2 هستند در زیر میکروسکوپ نوری، به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شوند.

واکنش PCR

برای تعیین اثرات بوسولفان روی بیان ژن‌های Bcl-2، Bax و Caspase-3 در سطح mRNA، RNA کل، از نمونه‌های هموزن مخلوط و با استفاده از کیت اختصاصی جداسازی RNA به روش سنتونی (Sina Clon, Tehran, Iran) استخراج گردید. برای RT-PCR، از کیت One-step RT-PCR MasterMix (YK4509) یکتا تجهیز آزما، ایران، استفاده شد. برای این منظور در یک ترکیب واکنش ۳۰

میلی‌لیتر داخل صفاقی به مدت ۳۵ روز دریافت کردند. همچنین گروه کنترل مثبت، فقط کوآنزیم Q10 ساخت شرکت سیگمالدریک (کد ۰-۹۸-۳۰۳) به میزان گروه درمانی دریافت نمودند.

با توجه به سیکل کامل ۳۵ روزه اسپرما توژنز در موش، ۳۵ روز پس از درمان، حیوانات با کلروفورم بیهوش و به منظور جداسازی سرم برای اندازه‌گیری سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتهی، پراکسیداسیون چربی‌ها و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، نمونه‌های خون توسط سرنگ ۵ سی‌سی استریل و سر سوزن نمره ۲۳ با توجه به ناحیه توپوگرافیک قلب، مستقیماً از قلب حیوانات جمع آوری شد. در ادامه پس از پرفیوژن قلبی و آسان‌کشی حیوانات، بیضه‌ها جداسازی و با سرم فیزیولوژیک خنک شستشو داده شدند و پس از توزین و اندازه‌گیری نسبت وزن بیضه به کل بدن، بیضه‌های چپ جهت ارزیابی بیان ژن‌های Bcl-2، Bax، و Caspase-3 در منفی ۸۰ درجه قرار گرفته و بیضه‌های راست جهت رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شدند.

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتهی سرم

ظرفیت آنتی اکسیدانتهی پلاسما به روش FRAP (قدرت آنتی اکسیدانتهی احیایی آهن) به شرح زیر صورت گرفت. مقدار ۳۰۰۰ مول بر لیتر از بافر استات با محلول تری پیدریل -S- تری‌آزین (TPTZ) و کلرید آهن اضافه و به عنوان معرف FRAP استفاده شد. ۷۵۰ میکرو لیتر از معرف FRAP با ۲۵ میکرو لیتر پلاسما در یک لوله آزمایش مخلوط شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب محلولها در ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شدند. تغییرات جذب مستقیماً به شدت احیا کنندگی کل الکترون دهی آنتی اکسیدانتهای موجود در مخلوط بستگی دارد (۷).

سنجش میزان پراکسیداسیون چربی

میزان مالون دی‌آلدئید به روش اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۲ نانومتر و بر اساس غلظت ترکیب صورتی رنگ کروموزن که در اثر ترکیب مالون دی‌آلدئید با اسید

برای بررسی تغییرات وزنی، حیوانات در ابتدا، میان دوره و متعاقب پایان دوره مطالعه وزن کشی شدند. قابل ذکر این که، در انتهای طول دوره مطالعه نسبت وزن بیضه‌ها به وزن بدن نیز محاسبه گردید. در موش‌های گروه بوسولفان تغییرات وزنی به صورت قابل توجهی ($p < 0.05$) نسبت به موش‌های گروه کنترل کاهش یافت، این در حالی بود که در گروه درمانی با کوآنزیم Q10 به‌تنهایی بیشترین نسبت وزن کل بیضه به وزن کل بدن مشاهده گردید (جدول ۲).

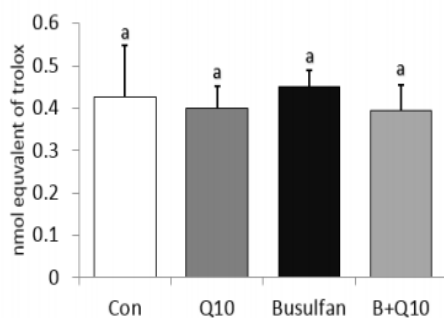
جدول ۲. تغییرات نسبت وزن بیضه چپ به وزن بدن در گروه‌های مختلف درمانی و کنترل

گروه‌ها	وزن بیضه چپ نسبت به وزن بدن ($\times 100$)
کنترل	0.68 ± 0.02 a
کوآنزیم q10	0.74 ± 0.11 a
بوسولفان	0.26 ± 0.05 b
بوسولفان + کوآنزیم q10	0.53 ± 0.05 c

تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. گروه‌های متناظر باحروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) دارند.

تغییرات مربوط به ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)

در بررسی بیوشیمیایی سرم گروه‌های مختلف مشخص گردید که ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم در گروه‌های مختلف آزمایشی با گروه کنترل هیچگونه تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشته است (نمودار ۱).



نمودار ۱. میانگین تغییرات ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) در سرم گروه‌های مختلف کنترل، کوآنزیم Q10، بوسولفان و ترکیب بوسولفان و کوآنزیم Q10. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده‌اند.

تغییرات مربوط به میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

میکرولیتری، ۳ میکرولیتر از پرایمرهای مخصوص Forward و Reverse از هر کدام یک و نیم میکرولیتر، ۳ میکرولیتر از RNA الگو (محتوی ۱ نانوگرم) و ۱۰ میکرولیتر آب فاقد RNAase، بر اساس پروتکل شرکت سازنده اضافه شد. ۳۰ میکرولیتر ترکیب واکنش جهت سنتز cDNA ب مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه Thermal cycler (BIO-GENER, USA, GE9612T) قرار گرفت. سپس سیکل گرمایی واکنش برای هر یک از ژن‌ها مطابق جدول ۱ انجام شد. محصولات PCR بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۰۷٪ محتوی اتیدیوم بروماید با کمک سیستم Gel Documentation (آرژنطب‌پیشرو، ایران) مشاهده شده و تراکم باندهای PCR توسط نرم‌افزار Image ATP Documentation & edit (آرژنطب‌پیشرو، ایران) مورد تحلیل قرار گرفته و بر اساس تراکم باندهای β -actin نرمالیزه گردید. پرایمر مخصوص برای ژنهای Bax, Bcl2, caspase-3 و β -actin بوسیله سیناژن طراحی و ساخته شد (سیناژن، ایران).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده (۸) (۹) (۱۰)

نام پرایمر	توالی پرایمر	تعداد سیکل
Bax	F: 5'-AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT-3' R: 5'-CAAAGATGGTCACTGTCTGC-3'	۲۹
Bcl-2	F: 5'-CTGGTGGACAACATCGCTCTG-3' R: 5'-GGTCTGCTGACCTCACTTGTG-3'	۳۵
Caspase-3	F: 5'-TACCTGAAATGGGCTTGTGT-3' R: 5'-GTTAACACGAGTGAGGATGTG-3'	۲۸

آنالیزهای آماری

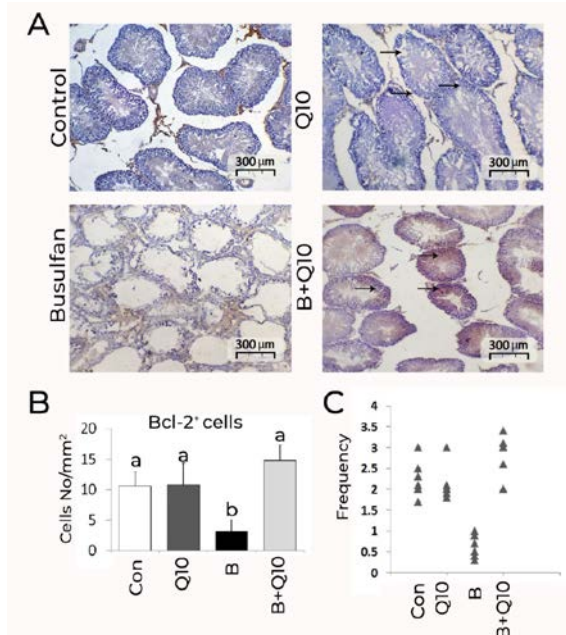
مقایسه تمامی داده‌ها در بین گروه‌ها توسط نرم افزار SPSS و ویرایش ۲۱ و آزمون مقایسات دو بدو و آزمون ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی Bonferroni صورت پذیرفت. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان گردید و $p < 0.05$ مقدار معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات وزن و نسبت بیضه به وزن بدن

بررسی پراکندگی سلول‌های بیان کننده Bcl-2 به روش ایمنوهیستوشیمی

در بررسی ایمنوهیستوشیمیایی مقاطع بافتی به منظور بررسی بیان پروتئین Bcl-2، بیان پروتئین مذکور در گروه بوسولفان به‌تنهایی در مقایسه با سایر گروه‌ها در سطح معنی‌داری کاهش یافته بود ($p < 0.05$). در بررسی نرم‌افزاری و کمی سلول‌های Bcl-2 نیز نتایج مشابه بدست آمد (تصویر ۱).

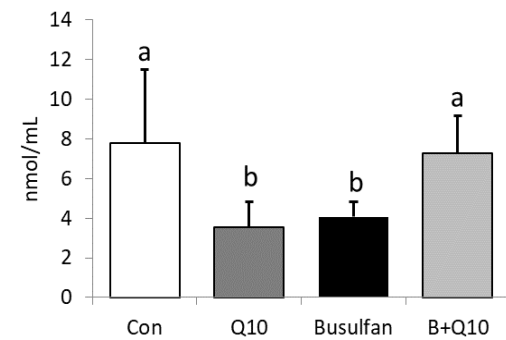


تصویر ۱. A- برش عرضی از بافت بیضه با رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین Bcl-2: برش عرضی متعلق به گروه بوسولفان بیان پایین تر پروتئین Bcl-2 را در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان می‌دهد (نقاط قهوه‌ای رنگ). این در حالی است که در گروه درمان شده با کوآنزیم Q10، میزان سنتز پروتئین Bcl-2 در سطح معنی‌داری نسبت به گروه بوسولفان افزایش یافته است. B و C نمودار تعداد و فراوانی سلول‌های مثبت Bcl-2 را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهند. توجه: گروه‌های متناظر با حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) دارند.

بررسی میزان mRNA در بیان ژنهای Bcl2، BAX و caspase 3

ارزیابی RT-PCR نشان داد که میزان mRNA Caspase 3 و Bcl-2 در گروهی که بوسولفان را به‌تنهایی دریافت کرده بودند به طور چشمگیری در مقایسه با سایر

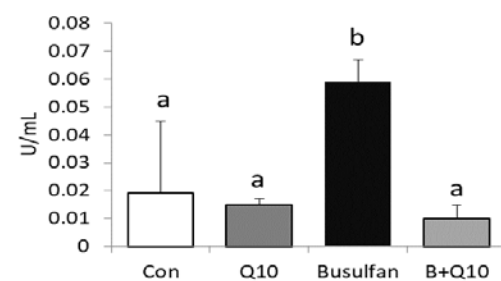
در بررسی بیوشیمیایی مقادیر مالون‌دی‌آلدئید، این نکته روشن گردید که میزان MDA در گروه بوسولفان در مقایسه با گروه‌های کنترل و درمانی در سطح معنی‌داری کاهش یافته بود ($p < 0.05$). این در حالی بود که، هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه بوسولفان + کوآنزیم Q10 با گروه کنترل مشاهده نگردید. این در حالی است که بین گروه کنترل و گروه‌های بوسولفان و کوآنزیم Q10 تفاوت معنی‌داری وجود دارد (نمودار ۲).



نمودار ۲. میانگین تغییرات میزان مالون‌دی‌آلدئید در سرم گروه‌های مختلف درمانی و کنترل. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. گروه‌های متناظر با حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) دارند.

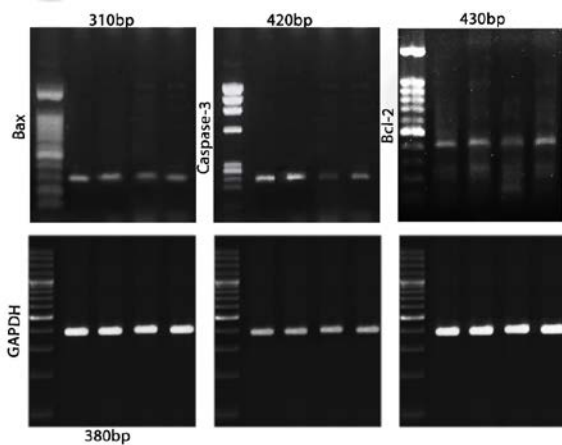
تغییرات مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سرم نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم در گروه بوسولفان در مقایسه با سایر گروه‌های درمانی افزایش چشمگیری داشته دارد. این در حالی است که مقادیر آنزیم فوق‌الذکر در گروه کوآنزیم Q10 به‌تنهایی نسبت به گروه کنترل کمتر و نسبت به گروه بوسولفان به‌همراه کوآنزیم Q10 بیشتر ارزیابی گردید (نمودار ۳).



نمودار ۳. میانگین تغییرات آنزیم SOD در سرم گروه‌های مختلف. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. گروه‌های متناظر با حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) دارند.

که، مقادیر mRNA مربوط به ژن‌های هدف علی‌رغم کمتر بودن تعداد سلول‌ها در واحد یک میلی‌متر مربع

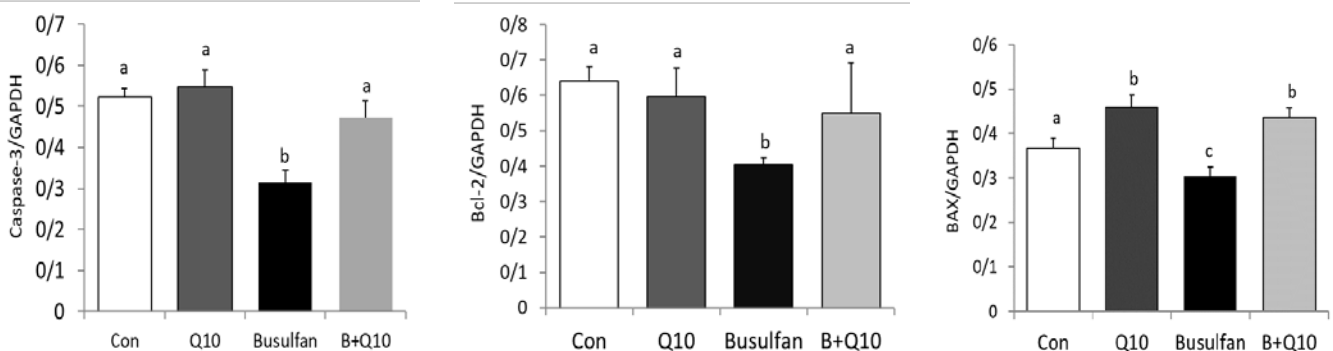


بافت بیضه گروه بوسولفان به‌تنهایی نسبت به تعداد بالاتر سلول‌ها در سایر گروه‌ها بالاتر می‌باشد (نمودار ۴).

تصویر ۲. تصویر ژل آگارز مربوط به بیان mRNA BAX، Caspase 3 و Bcl2 در گروه‌های مختلف (ردیف‌های بالا) و ژل آگارز مربوط به GAPDH (ردیف‌های پایین).

گروه‌های آزمایشی و گروه کنترل کاهش داشته و از لحاظ آماری هیچ تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه‌ها در مورد مقادیر mRNA Bcl2 و Caspase-3 مشاهده نگردید. الگو مشابه در مورد مقادیر mRNA Bax مشاهده گردید، با این تفاوت که گروه‌های کوآنزیم Q10 به‌تنهایی و گروه بوسولفان به همراه کوآنزیم Q10 مقادیر بالاتری از mRNA Bax را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دادند (تصویر ۱).

به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر و مقایسه شفاف‌تر تغییرات مربوط به مقادیر mRNA ژن‌های هدف در این مطالعه، نسبت مقادیر mRNA به تعداد سلول‌ها به‌ازای یک میلی‌متر مربع بافت بیضه مجدداً ارزیابی و بین گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. مشاهدات نشان داد که، میزان بیان پروتئین‌های Caspase-3 و Bax در گروه بوسولفان به‌تنهایی در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی و کنترل در سطح معنی‌داری بالاتر بوده است. بدین معنی



نمودار ۴. میزان بیان mRNA BAX، Bcl2 و Caspase 3 با اندازه‌گیری نسبت شدت بیان آن بر GAPDH ارائه شده است. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند و $p < 0.05$ شاخص تفاوت معنی‌دار می‌باشد. توجه: گروه‌های متناظر با حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

کاهش در اندازه بیضه، کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز یا به عبارتی آتروفی آنها، کاهش ضخامت اپیتلیال و یا افزایش در فضای بین لوله‌ای باشد که نهایتاً منجر به تخریب بیضه می‌شود (۱۲) این درحالی است که، در موش‌های درمان شده با کوآنزیم Q10 به دلیل کاهش تخریب بافتی و کاهش آسیب‌های ناشی از بوسولفان، ساختار بافتی بیضه حفظ گردیده که به نوبه خود، نسبت وزنی بیضه به کل بدن را حفظ نموده است. این فرضیه با

بررسی نسبت وزن بیضه به کل وزن بدن در موش‌های گروه‌های مختلف نشان داد که درمان با کوآنزیم Q10 باعث افزایش معنی‌دار در نسبت وزنی بیضه به کل بدن در مقایسه با گروه درمان نشده، شده است. کاهش در وزن بیضه‌ها متعاقب تجویز بوسولفان می‌تواند به علت کاهش تعداد سلول‌های زایا و آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز باشد (۱۱) همچنین کاهش وزن کلی بیضه می‌تواند بخاطر

در این مطالعه، مقادیر مالون دی‌الدئید سرمی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه بوسولفان به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل مقادیر کمتر مالون دی‌الدئید و مقادیر بالاتری از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را نشان داد. این در حالی بود که هیچ تفاوت معنی‌داری بین میزان آنتی‌اکسیدانی سرم گروه‌های مختلف مشاهده نشد که میتوان نتیجه گرفت، تخلیه سلولی قابل توجه در بافت بیضه و تداخل سایر مولکول‌های غیر آنزیمی در تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی باعث شده است تا سطح ظرفیتی سرم تغییر نکند. این نکته نیز نباید فراموش شود که، در جنس نر به دلیل پاسخ‌های هورمونی مثل کورتیزول در برابر درمان با داروهای ضدسرطان، پاسخ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در مقایسه با جنس ماده متفاوت می‌باشد (۲۱).

در مقابل اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد، اسپرماتوزوا و پلاسمای سمینال، دارای مجموعه‌ای از آنتی-اکسیدانتهای آنزیمی و غیر آنزیمی با وزن مولکولی پایین، تحت عنوان کلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانتهای تام (TAC) میباشند. این آنتی‌اکسیدانتهای با عنوان جمع‌کننده‌های رادیکال آزاد، جهت حفاظت اسپرماتوزوا در برابر ROS عمل میکنند و از آنجایی که حجم عمده‌ای از آنتی‌اکسیدانتهای سیتوپلاسمی طی اسپرماتوزنر تخلیه میشود، نسبت به اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد فوق-العاده حساس میباشند. لذا آنتی‌اکسیدانتهای مایع سمینال، جبرانی برای از دست رفتن این آنزیمهای سیتوپلاسمی اند (۲۲) و (۲۳). مضافاً اینکه، تولید ROS باعث توقف سیکل سلولی و افزایش فرآیند آپوپتوز میشود که بدین ترتیب تولید روزانه اسپرم و تعداد کلی اسپرمهای حاصل از موشهای که با بوسولفان درمان شده اند، کاهش می‌یابد (۱۵). کوآنزیم Q10، آنتی‌اکسیدان قوی، یک تثبیت‌کننده‌ی غشاء و کوفاکتور در تولید آدنوزین‌تری فسفات است. در تحقیقی که صفری‌نژاد و همکاران بر

یافته‌های قبلی تطابق دارد زیرا که تجویز آنتی‌اکسیدانها در تخریب بافت بیضه با بهبود روند اسپرماتوزنر، ارتفاع اپی‌تلیوم ژرمینال را افزایش داده و همچنین تولید اسپرماتوگونیاها و اسپرماتوسیتها را بالا میبرد (۱۳) و (۱۴).

متعاقب تجویز بوسولفان، بخشی از سلول‌های زایا به دلیل خاصیت آلكالیتی بوسولفان دچار آسیب می‌شوند و به‌واسطه تولید رادیکال‌های آزاد روند اسپرماتوزنر را نیز دچار آسیب می‌کنند (۱۵). مکانیسم دیگری که در همین راستا گزارش شده این است که بوسولفان سطح ck18 (یک نشانگر سطح سلولی سلول‌های سرتولی) را افزایش می‌دهد، که تغییر در این مارکر باعث اختلال در روند اسپرماتوزنر، تولید رادیکال‌های آزاد و در نهایت ناباروری می‌شود (۴). این نکته نباید فراموش شود که، به دلیل افزایش سطح آسیبهای سلولهای زایا و سلولهای سوماتیک بافت بیضه، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد که به نوبه خود استرسهای اکسیدی را بوجود می‌آورد (۱۶).

شدت آسیب پراکسیداتیو را می‌توان با تخمین محصولات آلدئیدی پایدار انتهایی پراکسیداسیون لیپید از قبیل مالون دی‌آلدئید (MDA) سنجید (۱۷). افزایش میزان MDA بافت از این لحاظ اهمیت دارد که مولکول‌های MDA با نفوذ به درون ساختار غشاء سلول موجب عدم تقارن در توزیع اجزاء لیپیدی غشاء میشوند. علاوه بر این با ایجاد پیوندهای محکم با DNA سلول، موجب بروز صدمات و شکستگی‌هایی در سطح کروموزوم می‌گردند (۱۸). بنابراین تولید میزان بالایی از گونه‌های فعال اکسیژن در بافت بیضه همانند ROS و NO میتواند با افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئینی، القاء آسیب را در سطح پروتئین، لیپید، DNA و همچنین RNA افزایش دهد (۱۹). در تحقیقی که توسط حسینی و همکارانش صورت گرفته، نشان میدهد که استفاده از بوسولفان می‌تواند MDA سرم را افزایش داده و یکی از ریسک فاکتورهای ناباروری باشد (۲۰).

نوبه‌ی خود می‌تواند روند آپوپتوز وابسته به میتوکندری را بوجود آورد (۲۷) و (۲۸). بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که، کوآنزیم Q10 با افزایش بیان پروتئین Bcl-2، بیان پروتئین Bax و الیگومره شدن آن را مهار نموده و بدین ترتیب بروز آپوپتوز وابسته به میتوکندری را کاهش داده است. کاهش آسیب DNA در گروه کوآنزیم Q10 به همراه بوسولفان می‌تواند تاییدی بر این فرضیه باشد.

با در نظر گرفتن نقش کاسپازها در سلول‌های مختلف، مطالعات نشان داده‌اند که Bcl-2 بواسطه مهار سنتز و تولید کاسپازها نیز می‌تواند فرایند آپوپتوز را مهار نماید (۲۹) و (۳۰). به طور اختصاصی‌تر، پروتئین‌های Bcl-2 موجود در دیواره میتوکندری‌ها بواسطه‌ی جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C و یا با اتصال به Apaf-1 مانع از تشکیل آپوپتوزوم و به راه افتادن آبشار کاسپازی می‌شود (۲۶). در این راستا به منظور پی‌بردن به مکانیسم محافظتی آنتی اکسیدان تجویز شده، میزان پروتئین و mRNA ی caspase-3 مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش میزان caspase-3 در سطح معنی‌داری در بیضه موش‌های درمان شده کاهش یافته بود. برای درک بهتر این موضوع این نکته می‌بایستی در نظر گرفته شود که، دخالت گسترده پروتئین‌های p53 و Bcl-2 در طی فرایند آپوپتوز، بیوسنتز کاسپاز-3 در ادامه افزایش نفوذپذیری غشا میتوکندری و خروج سیتوکروم‌های C اتفاق می‌افتد. در شرایط آسیب DNA و اختلالات فاکتورهای رشدی، مسیر داخلی وابسته به پروتئین Bcl-2 فعال می‌شود که به دخالت پروتئین‌های سیستئینی یا کاسپازها (کاسپاز ۳، ۸، ۹ و ۶) وابسته می‌باشد (۳۱). در صورت کاهش بیان پروتئین Bcl-2 در غشاء میتوکندری‌ها، تولید و سنتز سیتوکروم‌های بیضه‌ای افزایش می‌یابد که با ایجاد تغییر در نفوذپذیری و فعالیت غشاء میتوکندری‌ها، به درون سیتوپلاسم آزاد می‌شوند. با آزاد شدن سیتوکروم‌های C به درون سیتوپلاسم، کاسپازهای ۸ و ۹ فعال می‌شوند که به نوبه‌ی خود

روی این کوفاکتور بر روی مردان نابارور انجام داده‌اند، متوجه شده‌اند که پارامترهای باروری و آنتی اکسیدانتی در گروه‌های درمان شده با کوآنزیم Q10 افزایش می‌یابد (۲۴) که در تایید نتایج حاصل از این تحقیق می‌باشد.

خانواده‌ی پروتئین‌های Bcl-2 در غشاء میتوکندری و شبکه آندوپلاسمیک جای گرفته و می‌توانند نقش‌های متناقض القای آپوپتوز و مهار آپوپتوزی را ایفا کند (۲۵). پروتئین Bcl-2 به عنوان یک پروتئین‌انکوژن در سلول‌های ژرمینال در تنظیم فرایند آپوپتوز سلولی دخالت می‌نماید (۲۶). با در نظر گرفتن اهمیت مذکور در بالا، در مطالعه حاضر میزان پروتئین و mRNA ی Bcl-2 مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد که، بیان mRNA و پروتئین Bcl-2 در گروه بوسولفان به‌تنهایی در سطح معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. این در حالی است که، تجویز همزمان کوآنزیم Q10 به همراه بوسولفان در سطح معنی‌داری بیان پروتئین مذکور را افزایش داده بود. نکته‌ای که در این میان باید به آن توجه داشت این است که، پروتئین Bcl-2 مهم‌ترین پروتئین دخیل در پایداری غشاء میتوکندری می‌باشد، بدین ترتیب که هرگونه کاهش در بیان پروتئین مذکور پایداری غشاء میتوکندری را در سطح قابل توجهی کاهش می‌دهد که، به نوبه‌ی خود قادر است تا روند آپوپتوز و شکست DNA را دامن بزند.

می‌بایستی این نکته را نیز در نظر داشت که، بیان پروتئین Bcl-2 به‌تنهایی ملاکی برای بروز آپوپتوز نمی‌باشد. بلکه نسبت بیان پروتئین Bcl-2 با پروتئین Bax بسیار مهم می‌باشد. در بررسی‌های آماری تکمیلی مطالعه‌ی حاضر مشخص گردید که بیان پروتئین Bax نسبت به جمعیت سلولی در بافت بیضه گروه بوسولفان به‌تنهایی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. این نکته از این لحاظ اهمیت دارد که، بیان پروتئین Bax در صورت کاهش بیان پروتئین Bcl-2 افزایش می‌یابد که پروتئین‌های مذکور الیگومره شده و کانال‌هایی را در غشاء میتوکندری بوجود می‌آورند که به

می‌توانند در نهایت کاسپاز-۳ را تولید نمایند (۳۲). کاسپاز ۳ به عنوان آخرین فاکتور در فرایند آپوپتوز به شمار می‌رود که در حقیقت مسئول تخریب پروتئین‌ها در سلول‌های در حال آپوپتوز، شکست DNA در سلول‌ها و حتی فشردگی کروماتین در سلول‌ها می‌باشد و در ادامه منجر به مرگ سلول خواهد شد (۳۳) و (۳۴). نوع فعال کاسپاز-۳ در نمونه‌ی اسپرمی افراد نابارور با تحرک کمتر به شدت افزایش می‌یابد. مطالعات نشان داده که ارتباط معنی‌داری بین بیان شکل فعال کاسپاز-۳ و آسیب DNA وجود دارد (۳۵) و (۳۶). با در نظر گرفتن کاهش بیان پروتئین Caspase-3 در گروه دریافت کننده کوآنزیم Q10 به همراه بوسولفان، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که، کوآنزیم Q10 با کاهش دادن بیان Bax و همچنین مهار بیان Caspase-3 در بافت بیضه قادر بوده است تا آپوپتوز ناشی از بوسولفان را مهار نماید . با توجه به نتایج می‌توان اشاره کرد که امروزه مصرف داروهای شیمی درمانی به دلیل ابتلاء فراوان به بیماری سرطان رو به افزایش است. حتی با پیشرفت شیوه‌های درمانی، گاهی بعد از درمان، افراد دچار ناباروری شده و فراهم کردن شرایطی برای ادامه باروری در این بیماران امری ضروری می‌باشد. تحقیق حاضر نشان داد که تجویز مکمل کوآنزیم Q10 می‌تواند در بهبود روند اسپرماتوژنز در موش‌های در معرض دوزهای بالای شیمی درمانی تاثیر داشته باشد و پارامترهای آنتی‌اکسیدانتی را بهبود و مسیره‌های آپوپتوز را نیز تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران این پژوهش از مسئولین محترم دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارند و بدین وسیله اعلام می‌دارند که منابع مالی پژوهش تماماً توسط معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تأمین شده است.

References

1. Bucci L, Meistrich M. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *MUTAT RES-FUND MOL M*, 1987. 176(2): p. 259-268.
2. Brydøy M, Fossa SD, Dahl O, Bjoro T. Gonadal dysfunction and fertility problems in cancer survivors. *Acta Oncol*, 2007. 46(4): p. 480-489.
3. Pacheco DY, Stratton NK, Gibson NW. Comparison of the mechanism of action of busulfan with hepsulfam, a new antileukemic agent, in the L1210 cell line. *Cancer res*, 1989. 49(18): p. 5108-5110.
4. Nasimi P, Tabandeh MR, Vahdati A, Khatamsaz S. Busulfan induces oxidative stress-and Bcl-2 family gene-related apoptosis in epididymal sperm and testis of adult male mice. *Physiol Pharmacol*. 2015;19(3):208-15.
5. Kates SA, Lader AS, Casale R, Beeuwkes R. Pre-clinical and Clinical Safety Studies of CMX-2043: A Cytoprotective Lipoic Acid Analogue for Ischaemia-Reperfusion Injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014. 115(5): p. 456-464.
6. Crane F. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1957. 25: p. 220-221.
7. Zarei L, Shahrooz R, Sadrkhanlou R, Malekinejad H, Ahmadi A, Bakhtiary Z. Protective effects of cornus mas extract on in vitro fertilization potential in methotrexate treated male mice. *Vet Res Forum*. 2015; 6 (1) 55 - 61
8. Rogério F, Júnior HJ, Vieira AS, Maria CCJ, de Rezende ACS, Pereira GAG, et al. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. *Brain Res*. 2006;1112(1):80-90.
9. Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, Varasteh A-R, Haghiri H. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. *Exp. Diabetes Res*. 2008;2008.
10. Kermer P, Klöcker N, Labes M, Thomsen S, Srinivasan A, Bähr M. Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS Lett*. 1999;453(3):361-364.
11. Ji M, Minami N, Yamada M, Imai H. Effect of protopanaxatriol saponin on spermatogenic stem cell survival in busulfan-treated male mice. *Reprod Med Biol* . 2007;6(2):99-108.
12. Panahi M, Karimaghai N, Rahmanifar F, Tamadon A, Vahdati A, Mehrabani D, et al. Stereological evaluation of testes in busulfan-induced infertility of hamster. *Comp Clin Path*. 2015;24(5):1051-6.
13. Rohnavaz F, Mirzapour T, Bayrami A, Zahiri M. Antioxidant effects of alpha-tocopherol (vitamine E) on testis regeneration in busulfan-treated mice. *Iran South Med J* . 2016;19(4):511-25.
14. Moshtaghion S-M, Malekinejad H, Razi M, Shafie-Irannejad V. Silymarin protects from varicocele-induced damages in testis and improves sperm quality: evidence for E2f1 involvement. *Systems biology in reproductive medicine. SYST BIOL REPROD MED*. 2013;59(5):270-80.
15. 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. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(5):385-400.
16. Khosravanian N, Razi M, Farokhi F, Khosravanian H. Testosterone and vitamin E administration up-regulated varicocele-reduced Hsp70-2 protein expression and ameliorated biochemical alterations. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(3):341-54.
 17. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014.
 18. Atig F, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34(3):373-81.
 19. Sajedianfard J, Nazifi S, Izadi A, Chahardahcherik M, Honarmand M. Effect of Various Doses of Silymarin on the Oxidative Stress Induced by Busulfan Administration in the Different Organs of Rats. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;13(2).
 20. HOSSEINI AN, Khaki A, Akbari G, GHAFFARI NM. The effect of busulfan on body weight, testis weight and MDA enzymes in male rats. *Int. J. Women's Health Reprod*. 2014; 5(2): 316-319.
 21. Paris JJ, Franco C, Sodano R, Freidenberg B, Gordis E, Anderson DA, et al. Sex differences in salivary cortisol in response to acute stressors among healthy participants, in recreational or pathological gamblers, and in those with posttraumatic stress disorder. *HORM BEHAV*. 2010;57(1):35-45.
 22. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *REPROD BIOMED ONLINE*. 2004;8(6):616-27.
 23. Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nut Res*. 2001;21(3):551-67.
 24. Safarinejad MR. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. *J Urol*. 2009;182(1):237-48.
 25. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *JQUMS*. 2013;17(3):48-57.
 26. Marsden VS, O'connor L, O'reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*. 2002;419(6907):634.
 27. Borner C, Martinou I, Mattmann C, Irmeler M, Schaerer E, Martinou J-C, et al. The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J CELL BIOL*. 1994;126(4):1059-68.
 28. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov. Med*. 2010;9(45):145-52.
 29. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM. Molecular Ordering of the Cell Death Pathway Bcl-2 And Bcl-x Function Upstream Of The Ced-3-Like Apoptotic Proteases. *J. Biol. Chem*. 1996;271(9):4573-

30. Chen D, Zheng W, Lin A, Uyhazi K, Zhao H, Lin H. Pumilio 1 suppresses multiple activators of p53 to safeguard spermatogenesis. *CURR BIOL.* 2012;22(5):420-5.
31. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *NAT REV MOL CELL BIO.* 2008;9(1):47.
32. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26:389-420.
33. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *CSH PERSPECT BIOL.* 2013;5(4): a008656.
34. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases-an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008;151(1):10-27.
35. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod.* 2004;10(1):39-51.
36. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas Jr AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *FERTIL STERIL.* 2003;80(3):531-5.

Investigation of the Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Apoptosis Gene Expression and Oxidative Stress after Busulfan Injection in Rats

Shahrooz R¹, Moloody-Tappe M^{2*}, Razi M³, Zarei L⁴, Mohammadi V⁵

1. Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2. PhD post graduated scholar, Department of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, moloody81@yahoo.com

3. Associated professor, Department of Basic Sciences Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

4. Associated professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

5. Assistant professor, Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: Oct. 8, 2019

Accepted: Dec. 1, 2019

Abstract

Background & Objectives: As a chemotherapy drug which is used for the treatment of cancer, busulfan causes certain complications in tissues, including the genital system, due to the existence of free radicals. Preserving the reproductive system and fertility with medications and antioxidant supplements seems necessary in these patients.

Materials & Methods: Thirty-two male Wistar rats were used in 4 groups of 8. For the control group, the busulfan solution was injected (incl. DMSO + PBS) at a volume of 0.1 ml, and for the busulfan group, a single dose of 10 mg / kg was injected intraperitoneally. The Co.A Q10 group received 10 mg / kg of body weight daily (0.15 ml) by intraperitoneal injection for 35 days. At the end of the experiment, the serum of animals was collected in order to measure the antioxidant capacity, lipid peroxidation and superoxide dismutase. Moreover, after measuring the testicular to testicle ratio, the testicles were divided into two parts and evaluated for the expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 genes, and immunohistochemical staining they got.

Results: The results showed that oxidative stress increased in muscles treated by busulfan in 35 days, while it was significantly decreased in the Co.A Q10 receptor group by increasing antioxidant enzymes. RT-PCR evaluation showed that Caspase 3 and Bcl-2 mRNA levels were significantly reduced in the group receiving busulfan alone.

Conclusion: The use of Co.A Q10 supplementation can lead to a renewal of spermatogenesis due to the reduction of oxidative stress and the effect on apoptosis in busulfan treated mice.

Keywords: busulfan, Co.A Q10, apoptosis, antioxidant, rat

***Citation:** Shahrooz R, Moloody-Tappe M, Razi M, Zarei L, Mohammadi V. Investigation of the Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Apoptosis Gene Expression and Oxidative Stress after Busulfan Injection in Rats. *Yafte*. 2020; 21(4):118-130.