DOI: 10.22122/jims.v38i588.12953 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۸۸/هفته‌ی چهارم مهر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۶ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۷/۲۸

بررسی اثر محافظتی ویتامین C بر روی اسپرماتوسیت‌ها در موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول به روش ایمونوهیستوشیمی

رحیم گل‌محمدی[۱]، حمیدرضا باغانی اول[۲]، بتول کمالی‌منش[۳]، سجاد افراسیابی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از آن جایی که در مورد تأثیر ویتامین C بر روی اسپرماتوسیت‌های موش‌های مبتلا به صرع، گزارشی مشاهده نشد؛ این مطالعه، با هدف ارزیابی نقش محافظتی ویتامین C بر روی تعداد و ساختار اسپرماتوسیت موش‌های مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ سر موش نر به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸تایی تقسیم شدند. گروه شم (اول) مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم + سرم فیزیولوژی)، گروه‌های دوم، سوم و چهارم تجربی مبتلا به صرع شده که دزهای ۱۲۵، ۲۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت کردند. گروه پنجم، گروه شاهد منفی بود که فقط سرم فیزیولوژی داخل صفاقی دریافت کردند. پس از دوره‌ی درمان، بیضه‌ی راست حیوانات، با بیهوشی عمیق خارج و پس از پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، شمارش اسپرماتوسیت انجام گرفت. تغییرات ریخت‌شناسی نمونه‌ها با استفاده از روش هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی انجام شد. برای بررسی تغییرات معنی‌دار بین نمونه‌های مورد و شاهد، داده‌ها با آزمون ANOVA واکاوی شد.

یافته‌ها: میانگین تعداد اسپرماتوسیت موش‌های گروه مبتلا به صرع شده در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت موش‌های مبتلا به صرع شده که ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C می‌گرفتند، در مقایسه با گروهی که ۱۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C و یا سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند، دیده شد ($P < ۰/۰۱۰$). تغییرات ریخت‌شناسی بر روی اسپرماتوسیت همچون متراکم شدن هسته و اسیدوفیلی در سیتوپلاسم سلول‌های اسپرماتوسیت در موش‌های مبتلا به صرع شده، نسبت به گروه شاهد بیشتر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که افزودن ویتامین C، اثرات سمی پنتلین تترازول را بر روی اسپرماتوسیت‌های موش‌های مبتلا به صرع کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: موش صحرایی؛ ویتا مین C؛ صرع؛ اسپرماتوسیت

ارجاع: گل‌محمدی رحیم، باغانی اول حمیدرضا، کمالی‌منش بتول، افراسیابی سجاد. **بررسی اثر محافظتی ویتامین C بر روی اسپرماتوسیت‌ها در موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول به روش ایمونوهیستوشیمی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۸۸):۶۲۰-۶۱۵.

مقدمه

صرع، یک بیماری عصبی است که شیوع آن در مناطق روستایی بیشتر از مناطق شهری است. حدود ۱۰ درصد از یک جامعه، تجربه‌ای از تشنج را در دوران زندگی از خود نشان می‌دهند (۱). یکی از روش‌های ایجاد صرع تجربی، ایجاد تشنج توسط پنتلین تترازول در حیوانات آزمایشگاهی است و ضایعات بافتی یکی از عوارض آن می‌باشد (۲).

گزارش شده است که ویتامین C حملات تشنجی را کاهش می‌دهد؛ ضمن این که ویتامین C از انتهای نورون‌های گلوتامینرژیک در مغز آزاد می شود و فعالیت دو سیستم گلوتامینرژیک و دوپامینرژیک را تا حدود زیادی تنظیم می‌کند. در رابطه با تداخل عمل این ویتامین و سیستم‌های نوروترانسمیتری، گزارش شده است که ویتامین C بر روی گیرنده‌های دوپامینرژیک تأثیر می گذارد (۳). افزودن ویتامین C در رژیم غذایی، بر روی سلول‌های بافت بیضه‌ی آسیب دیده‌ی موش‌های صحرایی غیر مبتلا به صرع نقش محافظتی دارد (۴).

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و مر کز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۲- دانشیار، گروه جراحی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۳- کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۴- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: رحیم گل‌محمدی؛ دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و مر کز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

Email: rahimgolmohammadi@yahoo.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

همچنین، گزارش شده است که رژیم‌های پرچرب با کلسترول بالا در حیوانات آزمایشگاهی موجب آسیب DNA اسپرم و برعکس، افزودن ویتامین E، موجب کاهش این آسیب شده است (۵). با توجه به اهمیت سلول‌های اسپرماتوسیت که زایش سلول‌های اسپرم به آن‌ها مرتبط است، بررسی آن‌ها با روش هیستولوژی هماتوکسیلین- ائوزین (H-E) و ایمونوهیستوشیمی با Caspase-3 که یک روش اختصاصی است، مفید می‌باشد (۶).

گزارش دیگری نشان می‌دهد که ویتامین C اثرات سمی هیستوپاتولوژی سیکلوفسماید را بر روی ساختار بافت بیضه‌ی موش‌ها کاهش می‌دهد (۷). اهمیت مطالعه‌ی حاضر به این دلیل است که در حدود ۱۵ درصد از زوجین، دچار ناباروری (Infertility) هستند که جمعیتی حدود ۱۸۶ میلیون نفر در دنیا را به خود اختصاص می‌دهند. بیش از نیمی از مشکل ناباروری، مربوط به جنس مذکر می‌باشد و عواملی همچون سبک‌های جدید زندگی و استرس‌ها، فرایند ناباروری را افزایش می‌دهند (۸).

هر چند که مطالعاتی در مورد اثر ویتامین C بر روی بافت‌های مختلف بدن انجام شده است، اما در جستجوی انجام شده در مورد اثر ویتامین C بر روی اسپرماتوسیت‌ها در موش‌های صحرایی مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول، گزارشی مشاهده نشد. از این رو، مطالعه‌ی حاضر طراحی شد تا اثر محافظتی ویتامین C بر روی سلول‌های اسپرماتوسیت در موش صحرایی مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول به روش بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی انجام شود.

روش‌ها

القای صرع به حیوانات: این مطالعه‌ی تجربی بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ که به طور تصادفی به ۵ گروه ۸تایی تقسیم شدند، انجام شد. برای القای صرع به موش‌های صحرایی، پنتیلن تترازول (Pentylene tetrazole یا PTZ) با دز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن حیوان به صورت داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت یک بار به موش‌های صحرایی تزریق شد تا زمانی که هر حیوان ۴-۳ بار مرحله‌ی ۵ تشنج (کیندل شده یا ابتلا به صرع) را نشان دهد. در این مرحله، حیوان به خاطر تشنجات تونیک و کلونیک، تعادل خود را از دست می دهد و به زمین می‌افتد (۳). گروه‌های مبتلا به صرع شده، شامل گروه اول (مبتلا به صرع شده یا شم) که سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۹)؛ گروه‌های دوم، سوم و چهارم تجربی مبتلا به صرع شده، دزهای متفاوت ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C را به صورت تزریقی داخل صفاقی دریا فت کردند (۱۰). گروه پنجم، گروه غیر مبتلا به صرع یا شاهد منفی (Intact) بود که فقط سرم فیزیولوژی به صورت داخل صفاقی دریافت نمود.

موش‌های صحرایی پس از گذراندن دوره‌ی درمان ۴ هفته‌ای باکتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلزین ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی به طور عمیق بیهوش شدند و پس از پرفیوژن سرم فیزیولوژی و فرمالدئید، بیضه‌ی سمت راست حیوان با دقت خارج و در داخل محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد (۹).

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و بررسی هیستولوژی: بعد از تثبیت شدن (Fixation)، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد و انجام پاساژ بافتی (Tissue processing) قالب‌گیری نمونه‌ها در پارافین انجام شد. از بلوک‌های پارافینی، مقاطع ۵ میکرونی با میکروتوم دوار Litz انجام گرفت. از هر صد مقطع (Section) یک مقطع انتخاب شد. مقاطع به صورت کرونال و سریال تصادفی (Random) از بافت بیضه‌ی راست تهیه شد. اسلایدها با هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری چهل میدان دید میکروسکوپی یعنی ۱۰ لام از هر گروه و چهار میدان از هر لام به صورت تصادفی سیستماتیک انتخاب گردید. سپس، تصویر گرفته شد و در مرحله‌ی بعدی، شمارش سلول‌های اسپرماتوسیت انجام شد (۹).

ایمونوهیستوشیمی: پس از مقطع‌گیری ۵ میکرونی از بافت بیضه با میکروتوم بر روی تعداد محدودی از لام‌ها با استفاده از روش معمول آویدن- بیوتین- ایمونوپرکسیداز رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام گرفت؛ به طور خلاصه، مراحل انجام کار ایمونوهیستوشیمی در نمونه‌هایی که در پارافین قالب‌گیری شدند، به ترتیب زیر انجام شد.

ابتدا، پس از پارافین‌زدایی نمونه‌ها با گزیلول، ماسک‌زدایی شدند تا محل شاخص‌های آنتی‌ژنیک برای واکنش بهتر با آنتی‌بادی آماده شود. برای این مرحله، نمونه‌ها که داخل بافر سیترات شناور شده بودند، در داخل دستگاه میکروویو قرار گرفتند. برای مهار فعالیت آنزیمی داخل بافتی نظیر پراکسیداز نمونه‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۳ درصد آب اکسیژنه قرار گرفتند و در مرحله‌ی بعدی، با بافر فسفات ساین اسلایده شستشو داده شدند. با آنتی‌بادی Biotinylated (Rabbit anti-cleaved caspase 3 antibody) روی لام‌ها چکانده شد. از استرپتوآویدین متصل به Horseradish peroxidase (HRP) که قادر است دی‌آمینوبنزیدین (Diaminobenzidine یا DAB) را اکسید کند، برای رنگ‌آمیزی هسته استفاده گردید و با میکروسکوپ نوری تصویر گرفته و بررسی شد (۶).

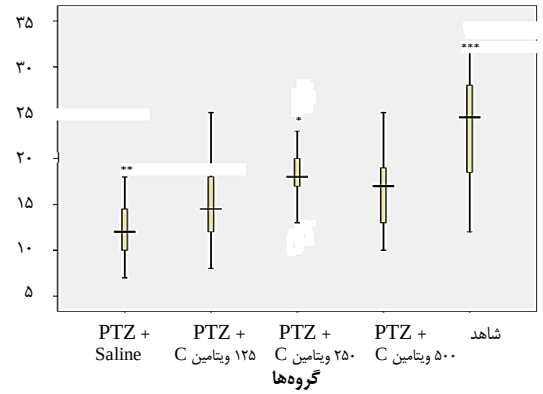
واکاوی آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶/۵ (version 16.5, IBM Corporation, Armonk, NY) با آزمون One-way ANOVA با استفاده از آزمون Dunnett برای مقایسه‌ی میانگین گروه های تجربی با شاهد و آزمون Duncan با ضریب آلفای برابر با ۰/۵ و Scheffe برای میانگین بین گروه‌های تجربی مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت: تغییرات کاهشی معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه مبتلا به صرع شده‌ی دریافت کننده‌ی سرم فیزیولوژی در مقایسه با گروه مبتلا به صرع شده‌ی دریافت کننده‌ی ویتامین C و گروه مبتلا به صرع نشده، مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت موش‌های صحرایی مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول که در ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت می‌کردند، در مقایسه با گروه که ۱۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت می‌کردند، به طور معنی‌داری بیشتر بود. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه‌های مبتلا به صرع شده که در ۱۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و یا ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت می‌کردند، تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > ۰/۰۵۰$).

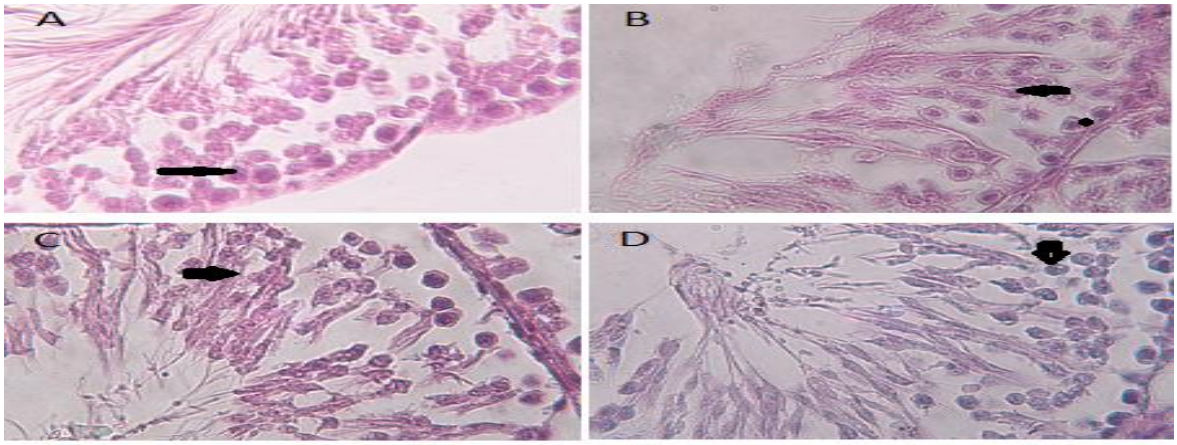
همچنین، میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت بین گروه‌های مبتلا به صرع که دزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت می‌کردند، تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، مربوط به گروه مبتلا به صرع دریافت کننده‌ی سرم فیزیولوژی (گروه شم) و بیشترین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت مربوط به گروه غیر مبتلا به صرع (شاهد منفی) بود (شکل ۱).

نتایج هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی سلول‌های اسپرما توسیت: تغییرات ریخت‌شناسی مانند متراکم شدن هسته، تغییر مکان هسته از مرکز به محیط، مشخص نبودن محدوده‌ی هسته از سیتوپلاسم اسپرماتوسیت در موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع با پنتلین تترازول (PTZ) که سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند، نسبت به موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع شده که ویتامین C دریافت می‌کردند، بیشتر مشاهده شد. کمترین تغییرات ریخت‌شناسی یعنی کاهش اسیدوفیلی سیتوپلاسم و کاهش متراکم شدن هسته‌ی سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه‌های تجربی موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع دریافت کننده‌ی ویتامین C مربوط به گروهی بود که در ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت می‌کردند، مشاهده شد (شکل ۲).



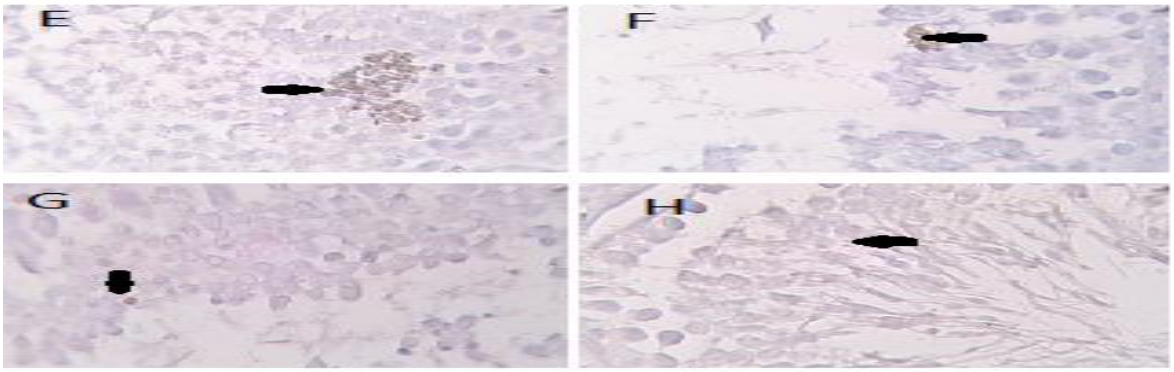
شکل ۱. تفاوت میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌ها در موش‌های صحرایی بالغ نر در گروه‌های مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول و گروه شاهد

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول که سرم فیزیولوژی **(PTZ+Saline)** دریافت می‌کردند، نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های مبتلا به صرع شده که ویتامین **C** دریافت می‌کردند (**PTZ** + ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین **C**)، به طور معنی‌داری کمتر بود (**P** < ۰/۰۲۰). در گروه‌های مبتلا به صرع شده که در ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین **C** دریافت می‌کردند، نسبت به گروه ۱۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، به طور معنی‌داری بیشتر بود (**P** < ۰/۰۰۱). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در موش‌های گروه‌هایی که دزهای ۱۲۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین **C** دریافت می‌کردند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (**P** > ۰/۰۵۰).



شکل ۲. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H-E)، مقاطع ۵ میکرونی کرونال از بافت بیضه‌ی موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول که دزهای متفاوتی از ویتامین C را دریافت کردند.

تصویر **A**، پیکان سلول‌های اسپرماتوسیت در گروهی از موش‌های صحرایی می‌باشد که پس از مبتلا به صرع شدن با **PTZ** فقط سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند. تصویرهای **B** و **C** مربوط به گروه‌هایی از موش‌های مبتلا به صرع شده است که به ترتیب دزهای ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین **C** می‌گرفتند. تصویر **D** مربوط به گروه غیر مبتلا به صرع (شاهد) است. پیکان‌ها، سلول‌های اسپرماتوسیت را در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ×).



شکل ۳. رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوهیستوشیمی مقاطع ۵ میکرونی کرونال از بافت بیضه‌ی موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول (PTZ) را که دزهای متفاوتی از ویتامین C دریافت کردند.

تصویر **E** پیکان سلول‌های اسپرماتوسیت در گروهی از موش‌های صحرایی می‌باشد که پس از مبتلا به صرع شدن با **PTZ** فقط سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند. تصاویر **F** و **G** مربوط به گروه‌هایی از موش‌های مبتلا به صرع می‌باشد که به ترتیب دزهای ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین **C** می‌گرفتند. تصویر **H**، مربوط به گروه غیر مبتلا به صرع (شاهد منفی) است. پیکان‌ها، سلول‌های اسپرماتوسیت را در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ×).

تغییرات کاهشی اسپرماتوسیت‌ها، به احتمال زیاد، می‌تواند ناشی از اثر پنتلین تترازول باشد که بر روی فرایند حرکتی اسپرم‌ها داشته است؛ یعنی چرخه‌ی عبور اسپرماتوسیت‌ها از یک مرحله به مرحله‌ی بعدی را کاهش می‌دهد و یا به آسیب آن‌ها منجر می‌شود (شکل ۳).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در موش‌های صحرایی نر مبتلا به صرع شده که ویتامین C به صورت تزریقی دریافت می‌کردند، به طور معنی‌داری بیشتر از گروهی از موش‌های صحرایی مبتلا به صرع شده بود که به جای ویتامین C، سرم فیزیولوژی می‌گرفتند. مطالعه‌ی Buhling و Laakmann، نشان می‌دهد که عوامل مختلفی در فرایند اسپرم‌زایی نقش دارند که می‌توان آن‌ها را به دو دسته‌ی مفید و مضر تقسیم‌بندی کرد. از گروه مفید، افزودن ریز مغذی‌ها به رژیم غذایی را می‌توان اشاره نمود که در فرایند اسپرم‌زایی نقش مفیدی دارند. از دسته‌ی دوم، می‌توان به استنشاق سیگار و نوشیدنی‌های الکلی که نقش مضر در فرایند اسپرماتوژنز دارند، اشاره کرد (۱۱).

در مطالعه‌ی حاضر، افزودن ویتامین C، نقش مفید و پنتلین تترازول نقش مضری در فرایند اسپرم‌زایی داشت. مطالعه‌ی Wang و همکاران، نشان می‌دهد که ویتامین C در برابر اثرات سمی کادمیوم در مورد حرکت اسپرم‌ها از طریق القای فسفریلاسیون و یا مهار آنزیم‌های تیروزین کیناز یک، نقش محافظتی دارد. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، با نتایج پژوهش پیش‌گفته هم‌خوانی دارد؛ هر چند که روش‌های مطالعه در دو پژوهش با یکدیگر تفاوت دارد (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در موش‌های صحرایی که ویتامین C دریافت می‌کردند، بیشتر از گروهی از موش‌های صحرایی **مبتلا به** صرع بود که سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند. شاید افزایش میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌ها در حیوانات مبتلا به صرع که ویتامین C دریافت کرده‌اند، ناشی از خاصیت ضد اکسیدانی و ضد التهابی ویتامین C بوده است؛ به طوری که توانسته است تا حد زیادی مضرات پنتلین تترازول را بر روی سلول‌های اسپرماتوسیت کاهش دهد؛ یا این احتمال داده می‌شود که در گروه مبتلا به صرع که فقط سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت ناشی از تأثیر توکسیک پنتلین تترازول بوده است که فرایند دوره‌ای تبدیل اسپرماتوگونی به اسپرماتوسیت را به تأخیر انداخته است. گزارش‌های دیگر، نشان می‌دهد که ویتامین C موجب کاهش واکنش‌های استرسی در سلول و کاهش آسیب DNA، Tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) و اینترلوکین ۶ می‌شود.

مطالعه‌ی طغیانی و همکاران، نشان می‌دهد که Acyclovir از طریق القای آپوپتوز در سیستم تولید مثل نقش مخربی دارد؛ در حالی که ویتامین C، نقش محافظتی در پیش‌گیری از آسیب DNA در سلول‌های اسپرم داشته است (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر، میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه‌های مورد مطالعه‌ی مبتلا به صرع که دز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ویتامین C دریافت می‌کردند، در مقایسه با گروه‌های مبتلا به صرع که دز ۱۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم می‌گرفتند، به طور معنی‌داری بیشتر بود. بنابراین، می‌توان در مورد این بخش از مطالعه‌ی حاضر چنین نتیجه گرفت که دز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم برای کاهش اثرات پنتلین تترازول بر روی سلول‌های اسپرم دز مناسبی

است. مطالعات Manjula و همکاران بر روی موش‌های نژاد Wistar، نشان می‌دهد که تزریق ویتامین C در موش‌هایی که تحت تأثیر سرما قرار گرفته‌اند، یک نقش محافظتی داشته است (۱۴).

مطالعه‌ی Jahan و همکاران، نشان می‌دهد که ویتامین C نقش محافظتی در برابر اثرات کلرید جیوه بر روی سلول‌های اسپرم بافت بیضه‌ی موش‌های نژاد Sprague Dawley دارد (۱۵). این مطالعه، هر چند با پژوهش حا ضر تفاوت‌هایی دارد، اما هر دو مطالعه، نقش محافظتی ویتامین C را بر روی اسپرماتوسیت‌ها بیان می‌کنند.

گزارش دیگر نیز نشان می‌دهد که ویتامین C، باعث افزایش تحرک سلول‌های جنسی و کاهش عوامل استرس‌زا و کاهش ژن Nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (Nrf2) و برعکس، باعث افزایش بیان ژن Nuclear factor-κB (NF-κβ) در بافت بیضه شده است (۱۶). کاهش تعداد سلول‌های اسپرم (Oligospermia) به هر عللی که ایجاد شده باشند، از نظر بالینی مهم است؛ چرا که مقدمه‌ای بر نازایی و منجر به کاهش تولید نسل یا بقا خواهد شد.

پیشنهاد می‌شود تأثیر ویتامین C بر روی بیان ژنومی عوامل رشد که در فرایند چرخه‌ی زایشی اسپرم در موش‌های مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول نقش دارند، بررسی شود. این مطالعه، اولین گزارشی است که تأثیر ویتامین C را بر روی اسپرماتوسیت‌های موش‌های صحرایی مبتلا به صرع شده با پنتلین تترازول نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که ویتامین C اثرات سمی (Toxic) پنتلین تترازول را بر روی اسپرماتوسیت‌های موش‌های مبتلا به صرع را کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این طرح با شماره‌ی ۹۸۱۵۳ و کد اخلاق IR .Medsab.REC.1398.110 در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار تصویب شد. بدین وسیله از اعضای محترم این شورا سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. Neurology 2017; 88(3): 296-303.
2. Shimada T, Yamagata K. Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. J Vis Exp 2018; (136): 56573.
3. Hsine Z, Bizid S, Milka R, Sauriat-Dorizon H, Haj SA, Korri-Youssoufi H. Nanocomposite based on Poly (para-phenylene)/Chemical Reduced Graphene Oxide as a Platform for Simultaneous Detection of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid. Sensors (Basel) 2020; 20(5): 1256.
4. Zare S, Hossein DM, Noorafshan A, Koohpeyma F, Bakhshayeshkaram M, Montazeri-Najafabady N. Protective effect of vitamin E and vitamin C alone and in combination on testicular damage induced by sodium metabisulphite in rats: A stereological study. Andrologia 2019; 51(2): e13193.
5. Ghasemi N, Dashti G, Amoozgar F, Vaez SA. Effect of cholesterol, iron and vitamin E on protamine deficiency and dna fragmentation of male rabbit sperm. J Isfahan Med Sch 2013; 31(259): 1769-78. [In Persian].
6. Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. J Histochem Cytochem 2002; 50(4): 449-54.
7. Shabanian S, Farahbod F, Rafieian M, Ganji F, Adib A. The effects of vitamin C on sperm quality parameters in laboratory rats following long-term exposure to cyclophosphamide. J Adv Pharm Technol Res 2017; 8(2): 73-9.
8. Li Y, Xue Y, Bao B, Wang J, Dai H, Gong X, et al. Effectiveness comparison of a Chinese dicitraditionalmene formula Wuzi Yanzong Pill and its analogous prescriptions for the treatment of oligoasthenozoospermia: A systematic review and meta-analysis protocol. Medicine (Baltimore) 2019; 98(20): e15594.
9. Santos LF, Freitas RL, Xavier SM, Saldanha GB, Freitas RM. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. Pharmacol Biochem Behav 2008; 89(1): 1-5.
10. Azari O, Gholipour H, Kheirandish R, Babaei H, Emadi L. Study of the protective effect of vitamin C on testicular tissue following experimental unilateral cryptorchidism in rats. Andrologia 2014; 46(5): 495-503.
11. Buhling KJ, Laakmann E. The effect of micronutrient supplements on male fertility. Curr Opin Obstet Gynecol 2014; 26(3): 199-209.
12. Wang L, Li P, Wen Y, Yang Q, Zhen L, Fu J, et al. Vitamin C exerts novel protective effects against cadmium toxicity in mouse spermatozoa by inducing the dephosphorylation of dihydrolipoamide dehydrogenase. Reprod Toxicol 2018; 75: 23-32.
13. Toghiani S, Hayati RN, Dashti GR, Rouzbehani S. The effects of vitamin C and menthone on acyclovir induced DNA damage in rat spermatozoa: An experimental study. Int J Reprod Biomed 2018; 16(11): 703-10.
14. Manjula KR, Subramanyam MV, Asha DS. Protection against oxidative stress caused by intermittent cold exposure by combined supplementation with vitamin E and C in the aging rat hypothalamus. Neurochem Res 2013; 38(4): 876-85.
15. Jahan S, Azad T, Ayub A, Ullah A, Afsar T, Almajwal A, et al. Ameliorating potency of Chenopodium album Linn. and vitamin C against mercuric chloride-induced oxidative stress in testes of Sprague Dawley rats. Environ Health Prev Med 2019; 24(1): 62.
16. Rizk NI, Rizk MS, Mohamed AS, Naguib YM. Attenuation of sleep deprivation dependent deterioration in male fertility parameters by vitamin C. Reprod Biol Endocrinol 2020; 18(1): 2.

DOI: 10.22122/jims.v38i588.12953 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Vol. 38, No. 588, 4th Week, October 2020

Received: 19.07.2020 Accepted: 16.09.2020 Published: 26.10.2020

Evaluation of the Protective Effect of Vitamin C on Spermatocytes in Rats with Pentylenetetrazole-Induced Epilepsy Using Immunohistochemistry

Rahim Golmohammadi[1], Hamid Reza Baghani-Aval[2], Batool Kamalimanesh[3], Sajad Afraciabi[4]

Original Article

Abstract

Background: There has not been yet reports regarding the protective effect of vitamin C on spermatocytes in epileptic rats. The present study aimed to evaluate the protective role of vitamin C on numbers and structure spermatocytes in rats with pentylentetrazol-induced epilepsy.

Methods: Forty male rats were randomly divided into five groups of 8, and were kindled with pentylentetrazol (40 mg/kg). The first group (sham) received normal saline. The second, third, and forth experimental groups treated with 125, 250, and 500 mg/kg of vitamin C, respectively. The negative control group was given only normal saline via intraperitoneal injection. All rats were then deep anesthetized and sacrificed, and their right testis were dissected. Histological sections were prepared, and stained with hematoxylin-eosin (H/E). The number of spermatocytes in sections were counted, and morphological changes were studied using histology and immunohistochemical methods. Data were analyzes using ANOVA test to determine significant differences between cases and controls.

Findings: There was a significant decrease in spermatocytes numbers in epileptic rats compared with intact control group ($P < 0.001$). The spermatocytes significantly increased in rats, which received 250 mg/kg vitamin C compared to those received 125 mg/kg vitamin C or normal saline ($P < 0.010$). The morphological changes such as dense nuclei and more acidophilic cytoplasm were observed in epileptic rats compared to control groups.

Conclusion: The present study showed that vitamin C supplementation would protect spermatocytes by decreasing the neurotoxin effects of pentylentetrazol in epileptic rats.

Keywords: Rats; Vitamin C; Epilepsy**;** Spermatocytes

Citation: Golmohammadi R, Baghani-Aval HR, Kamalimanesh B, Afraciabi S. **Evaluation of the Protective Effect of Vitamin C on Spermatocytes in Rats with Pentylenetetrazole-Induced Epilepsy Using Immunohistochemistry.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(588): 615-20.

1- Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine AND Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzvar, Iran
2- Associate Professor, Department of Surgery, School of Medicine AND Non-Communicable Diseases Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzvar, Iran
3- Student Research Committee, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzvar, Iran
4- Student of Medicine, Student Research Committee, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
Corresponding Author: Rahim Golmohammadi, Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine AND Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzvar, Iran; Email: rahimgolmohammadi@yahoo.com