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

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 وکلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

چکیده

دریافت مقاله: ۹۸/۷/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۸/۹/۱۰

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

مواد و روش‌ها: از ۳۲ قطعه موش صحرایی 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+ کوآنزیمQ10) 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 آنتی اکسیدانتی، پراکسیداسیون چربی‌ها و سوپراکسیددیسموتاز جمع‌آوری و پس از اندازه‌گیری نسبت وزن بیضه به بدن، بیضه ها دو قسمت شده و مورد ارزیابی بیان ژن‌های Bax, Bcl-2 و Caspase-3 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 دریافت کننده کوآنزیم Q10 توانسته است استرس اکسیداتیو را به صورت معنی‌داری ($p<0.005$)کاهش دهد. ارزیابی RT-PCR نشان داد که میزان mRNA، Caspase 3 و Bcl-2 در گروهی که بوسولفان را به‌تنهایی دریافت کرده بود به طور چشمگیری ($p<0.005$) کاهش داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از مکمل کوآنزیمQ10 می‌تواند باعث تجدید فرآیند اسپرماتوژنز به واسطه کاهش استرس اکسیداتیو و تاثیر بر روند آپوپتوز در موش‌های درمان شده با بوسولفان شود.

واژه‌های کلیدی: کوآنزیمQ10 ، آپوپتوز، آنتی اکسیدانتی، موش صحرایی.

*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 بیضه ها 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 شیمی درمانی آسیب می‌زند. داروهای شیمی درمانی منجر به القای آپوپتوز در انواع سلول ها از جمله سلولهای زایای بیضه به واسطه آسیب به اسپرماتوگونی ها می شود.

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 توام بوسولفان با آنتی اکسیدانها 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 Q 10 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 آنتی اکسیدان در کاهش صدمات بافتی بیضه در درمان با بوسولفان مطالعه‌ای ثبت نشده و هدف از این مطالعه بررسی بافت شناسی و بیوشیمیایی تاثیر محافظتی کو آنزیم Q10 در بیضه موش‌های صحرایی بالغ تحت درمان با بوسولفان می‌باشد .

مواد و روش‌ها

در این تحقیق که نوع مطالعه ازنوع تجربی ونوع طراحی آن ازنوع فاکتوریل می باشد از ۳۲ قطعه موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با سن تقریبی ۷-۸ هفته و با وزن میانگین وزنی ۲۰±۱۸۰ گرم، جهت انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. حیوانات در اتاق پرورش و نگهداری دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تحت شرایط استاندارد در دمای ۲±۲۲ 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 + کوانزیم 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

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

با توجه به سیکل کامل ۳۵ روزه اسپرماتوژنز در موش، ۳۵ روز پس از درمان، حیوانات با کلروفرم بیهوش و به منظور جداسازی سرم برای اندازه گیری سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتی، پراکسیداسیون چربی‌ها و آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، 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. درادامه پس از پرفیوژن قلبی و آسان کشی حیوانات، بیضه ها جداسازی و با سرم فیزیولوژیک خنک شستشو داده شدند و پس از توزین و اندازه‌گیری نسبت وزن بیضه به کل بدن، بیضه های چپ جهت ارزیابی بیان ژن‌های Bax, Bcl-2 و Caspase-3 در منفی ۸۰ درجه قرارگرفته و بیضه های راست جهت رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شدند.

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتی سرم

ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی پلاسما به روش FRAP (قدرت آنتی اکسیدانتی احیایی آهن) به شرح زیر صورت گرفت. مقدار ۳۰۰۰ مول بر لیتر از بافر استات با محلول تری پیدیریل– S– تریآزین (TPTZ) و کلرید آهن اضافه و به عنوان معرف FRAP استفاده شد. ۷۵۰ میکرو لیتر از معرف FRAP با ۲۵ میکرولیتر 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 دی آلدئید به روش اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر و بر اساس غلظت ترکیب صورتی رنگ کروموژن که در اثر ترکیب مالون‌دی آلدئید با اسید تیو باربیتوریک ایجاد می‌شود اندازه‌گیری می‌شود. واحد اندازه گیری مالون‌دی‌آلدئید نانو مول بر میلی‌لیتر است.

اندازه گیری 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 اندازه گیری 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 آوِن به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس در زایلین پارافین‌زدایی و با استفاده از الکل آبگیری شدند. ابتدا در محلول رتریوال (بافر سدیم سیترات 10 mM)، سپس در محلول آب اکسیژنه قرارگرفته 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) ومحلول (Dab-کروموژن) قرار گرفت. مراحل رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد (Biocare, USA). در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، قسمت‌هایی که حاوی پروتئین Bcl2 هستند در زیر میکروسکوپ نوری، به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شوند .

واکنشPCR

برای تعیین اثرات بوسولفان روی بیان ژن‌های Bax, Bcl-2 و Caspase-3 در سطحmRNA ، RNA کل، از نمونه‌های هموژن مخلوط و با استفاده از کیت اختصاصی جداسازی RNA به روش ستونی (Sina Clon, Tehran, Iran) استخراج گردید. برای RT-PCR ، از کیت One-step RT-PCR MasterMix یکتا تجهیز آزما، ایران، (YT4509) استفاده شد. برای این منظور در یک ترکیب واکنش ۳۰

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 بمدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد در دستگاه Thermal cycler (BIO-GENER, USA, GE9612T) قرار گرفت. سپس سیکل گرمایی واکنش برای هر یک از ژن‌ها مطابق جدول۱ انجام شد. محصولات PCR بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۷٪ محتوی اتیدیوم بروماید با کمک سیستم Gel Documentation (آرش‌طب‌پیشرو، ایران) مشاهده شده و تراکم باندهای PCR توسط نرم‌افزار Image ATP Documentation & edit (آرش‌طب‌پیشرو،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 ساخته‌شد (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'-TACCCTGAAATGGGCTTGTGT-3' F: 5'-GTTAACACGAGTGAGGATGTG-3'	۲۸

آنالیزهای آماری

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

یافته‌ها

تغییرات وزن و نسبت بیضه به وزن بدن

برای بررسی تغییرات وزنی، حیوانات در ابتدا، میان‌دوره و متعاقب پایان دوره مطالعه وزن‌کشی شدند. قابل ذکر این‌که، در انتهای طول دوره مطالعه نسبت وزن بیضه‌ها به وزن بدن نیز محاسبه گردید. در موش‌های گروه بوسولفان تغییرات وزنی به‌صورت قابل توجهی ($p<0.05$) نسبت به موش‌های گروه کنترل کاهش یافت، این در حالی بود که در گروه درمانی با کوآنزیمQ10 به‌تنهایی بیشترین نسبت وزن کل بیضه به وزن کل بدن مشاهده گردید (جدول ۲).

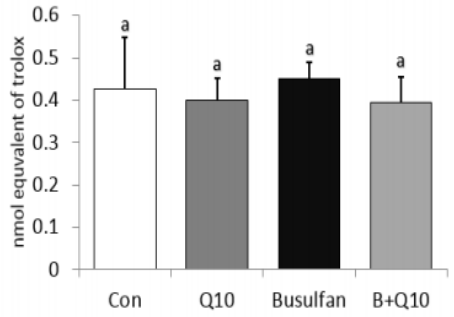
جدول ۲. تغییرات نسبت وزن بیضه چپ به وزن بدن در گروه‌های مختلف درمانی و کنترل

گروهها	وزن بیضه چپ نسبت به بدن (×۱۰۰)
کنترل	۰/۶۸±۰/۰۳ a
کوآنزیم q10	۰/۷۴±۰/۱۱ a
بوسولفان	۰/۲۶±۰/۰۵ b
بوسولفان + کوآنزیم q10	۰/۵۳±۰/۰۵ c

تمامی‌داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. گروههای متناظر باحروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) دارند.

تغییرات مربوط به ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)

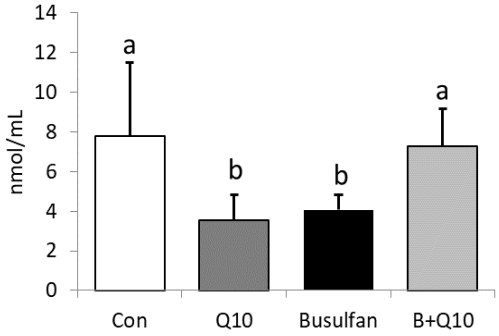
در بررسی بیوشیمیایی سرم گروه‌های مختلف مشخص گردید که ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم در گروه‌های مختلف آزمایشی با گروه کنترل هیچگونه تغییر قابل ملاحظه ای نداشته است (نمودار ۱).



نمودار ۱. میانگین تغییرات ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) در سرم گروه های مختلف کنترل، کوآنزیم Q10، بوسولفان و ترکیب بوسولفان و کوآنزیمQ10. تمامی‌داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده اند.

تغییرات مربوط به میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

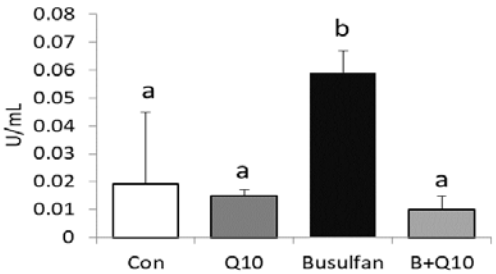
در بررسی بیوشیمیایی مقادیر مالون‌دی‌آلدئید، این نکته روشن گردید که میزان MDA در گروه بوسولفان در مقایسه با گروه‌های کنترل و درمانی در سطح معنی‌داری کاهش یافته بود (p< ۰/۰۵). این در حالی بود که، هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه بوسولفان +کوآنزیم Q10 با گروه کنترل مشاهده نگردید. این درحالی است که بین گروه کنترل وگروههای بوسولفان وکوآنزیم Q10 تفاوت معنی داری وجود دارد (نمودار۲).



نمودار ۲. میانگین تغییرات میزان مالون‌دی‌آلدئید در سرم گروه‌های مختلف درمانی و کنترل. تمامی‌داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. گروههای متناظر با حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار (p<۰/۰۵) دارند.

تغییرات مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

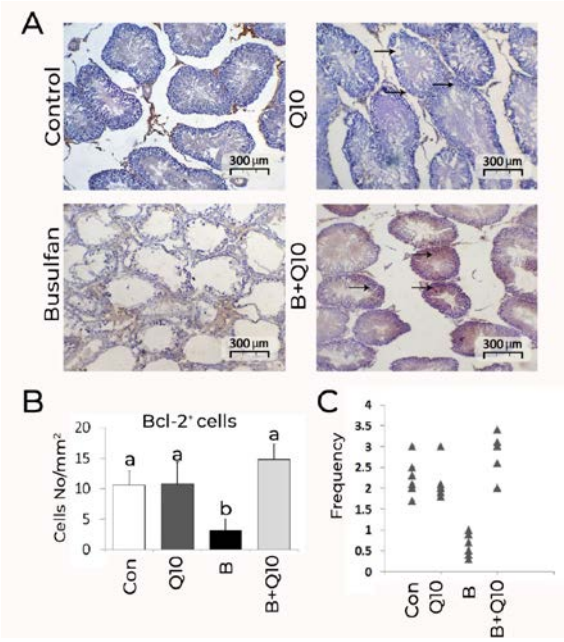
بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سرم نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم در گروه بوسولفان درمقایسه با سایر گروه های درمانی افزایش چشمگیری داشته دارد. این درحالی است که مقادیر آنزیم فوق‌الذکر در گروه کوآنزیم Q10 به‌تنهایی نسبت به گروه کنترل کمتر و نسبت به گروه بوسولفان به‌همراه کوآنزیم Q10 بیشتر ارزیابی گردید (نمودار۳).



نمودار ۳. میانگین تغییرات آنزیم SOD در سرم گروه‌های مختلف. تمامی‌داده ها بر اساس میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. گروههای متناظر باحروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار (p<۰/۰۵) دارند.

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< ۰/۰۵). در بررسی نرم‌افزاری و کمی سلول‌های Bcl-2 نیز نتایج مشابه بدست آمد (تصویر ۱).



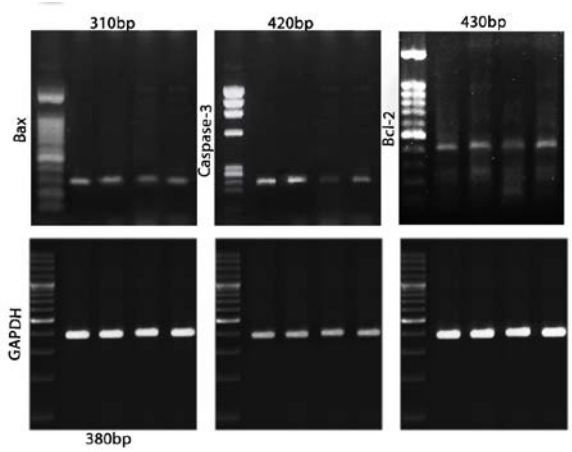
تصویر ۱. A- برش عرضی از بافت بیضه با رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین Bcl-2: برش عرضی متعلق به گروه بوسولفان بیان پایین تر پروتئین Bcl-2 را در مقایسه با سایرگروه ها نشان می‌دهد (نقاط قهوه‌ای رنگ). این در حالی است که در گروه درمان شده باکوآنزیم Q10، میزان سنتز پروتئین Bcl-2 در سطح معنی‌داری نسبت به گروه بوسولفان افزایش یافته است. B وC نمودار تعداد و فراوانی سلولهای مثبت Bcl-2 را در گروه های مختلف نشان می‌دهند. توجه: گروههای متناظر با حروف متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار (p<۰/۰۵) دارند.

بررسی میزان mRNA دربیان ژنهای BAX، Bcl2 و caspase 3

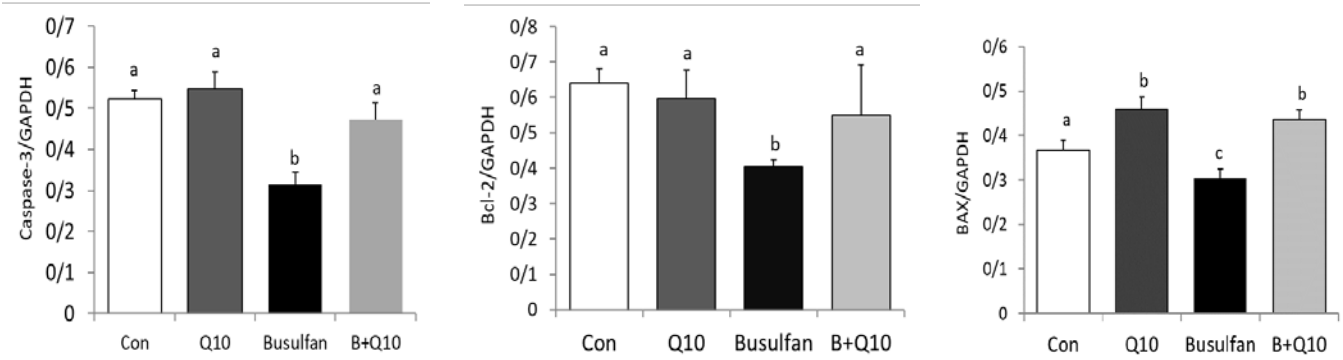
ارزیابی RT-PCR نشان داد که میزان mRNAی Caspase 3 وBcl-2 در گروهی که بوسولفان را به‌تنهایی دریافت کرده بودند به طور چشمگیری در مقایسه با سایر

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

به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر و مقایسه شفاف‌تر تغییرات مربوط به مقادیر mRNAی ژن‌های هدف در این مطالعه، نسبت مقادیر mRNA به تعداد سلول‌ها به‌ازای یک میلی متر 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 که، مقادیر mRNAی 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 mRNAی BAX، Bcl2 و Caspase 3 در گروه‌های مختلف (ردیف های بالا) و ژل آگارز مربوط به GAPDH (ردیف های پایین).



نمودار ۴. میزان بیان mRNAی BAX، Bcl2 و Caspase 3 با اندازه‌گیری نسبت شدت بیان آن بر GAPDH ارائه شده است. تمامی‌داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف‌معیار 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

بررسی نسبت وزن بیضه به کل وزن بدن در موشهای گروههای مختلف نشان داد که درمان باکوآنزیم 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 لوله های اسپرم‌ساز باشد (۱۱) همچنین کاهش وزن کلی بیضه میتواند بخاطر کاهش در اندازه بیضه، کاهش قطر لوله های 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 باکوآنزیم 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

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

متعاقب تجویز بوسولفان، بخشی از سلول های زایا به دلیل خاصیت آلکالیتی بوسولفان دچار آسیب می‌شوند و به‌واسطه تولید رادیکالهای آزاد روند اسپرماتوژنز 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 اسپرماتوژنز، 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 می-آورد (۱۶).

شدت آسیب پراکسیداتیو را می‌توان با تخمین محصولات آلدئیدی پایدار انتهایی پراکسیداسیون لیپید از قبیل مالون دی آلدئید (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 DNAی 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).

در این مطالعه، مقادیر مالون‌دی‌الدئید سرمی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و مقادیر آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه بوسولفان به‌تنهایی در مقایسه با گروه کنترل مقادیر کمتر مالون‌دی‌الدئید و مقادیر بالاتری از آنزیم سوپراکسیددیسموتاز 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 مولکول های غیرآنزیمی 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 غیرآنزیمی با وزن مولکولی پایین، تحت عنوان کلی ظرفیت آنتی اکسیدانت‌های تام (TAC) میباشند. این آنتی اکسیدانت‌ها به عنوان جمع کننده‌های رادیکال آزاد، جهت حفاظت اسپرماتوزوا در برابر ROS عمل میکنند و از آنجایی که حجم عمده‌ای از آنتی اکسیدانت‌های سیتوپلاسمی طی اسپرماتوژنز تخلیه میشود، نسبت به اثرات پاتولوژیک رادیکالهای آزاد فوق-العاده حساس میباشند. لذا آنتی اکسیدانت‌های مایع سمینال، جبرانی برای از دست رفتن این آنزیمهای سیتوپلاسمی‌اند (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 تثبیت کننده‌ی غشاء و کوفاکتور در تولید آدنوزین‌تری فسفات است. در تحقیقی که صفری‌نژاد و همکاران بر

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

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 پروتئواونکوژن 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 پرتئین 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 به‌همراه 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، به‌نوبه‌ی 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 به تنهایی 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 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 بدین‌ترتیب بروز آپوپتوز وابسته به میتوکندری را کاهش داده است. کاهش آسیب DNA در گروه کوآنزیم Q10 به‌همراه 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 caspas-3 مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش میزان caspas-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 فرآیند آپوپتوز، بیوسنتز کاسپاز-۳ 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 (کاسپاز۳ ، 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 به‌درون سیتوپلاسم، کاسپازهای ۸ و ۹ فعال می‌شوند که به نوبه‌ی خود

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 کوانزیم Q10 به‌همراه 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، گاهاً بعد از درمان، افراد دچار ناباروری شده و فراهم کردن شرایطی برای ادامه باروری در این بیماران امری ضروری می باشد. تحقیق حاضر نشان داد که تجویز مکمل کو آنزیم Q10 می تواند در بهبود روند اسپرماتوژنز در موش های در معرض دوزهای بالای شیمی درمانی تاثیر داشته باشد و پارامترهای آنتی اکسیدانتی را بهبود و مسیرهای 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, Haghir 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, Irmler 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 R[1], Moloody-Tappe M[2*], Razi M[3], Zarei L[4], Mohammadi V[5]

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, Razi1 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.