

تأثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپریمیک: تعدیل توسط آنتی‌اکسیدانها

مهران عربی (Ph.D.)^۱، راویندر آناند (Ph.D.)^۲

۱-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده جانورشناسی، دانشگاه پنجاب، چندیکر، هند.

چکیده

نیکوتین یکی از عمده‌ترین اجزاء دود سیگار است که می‌تواند اثرات سوءای در بدن انسان داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپریمیک می‌باشد. در این پژوهش نیکوتین با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار بر روند اکسیداسیون لیپیدهای غشایی (LPO)، تعادل بین مولکولهای گلوکاتایون اکسیده (GSSG) و احیاء شده (GSH)، فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST) و نیز میزان شکنندگی DNA سلولهای اسپرم در افراد نورمواسپریمیک و با در نظرگیری اثرات متقابل آنتی‌اکسیدانها مورد بررسی قرار گرفت. ویتامین C، گلوکاتایون (GSH) و ترولوکس (آنالوگ محلول در آب از ویتامین E) به عنوان مواد آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای نیکوتینی (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) باعث افزایش سطوح مواد واکنش‌دهنده تیوباربیتوتیک- (TBARS) به میزان ۵۱/۵٪ و ۷۸٪ ($P < 0.001$ و $P < 0.01$) در محیط عمل گردیدند. مواد آنتی‌اکسیدان موجب کاهش سطوح TBARS گردیدند که در این بین ترولوکس در حالت تنها واجد بهترین نتیجه بود و در مقابل ویتامین C در هنگام حضور یونهای دو ظرفیتی آهن در محیط عمل، موجب افزایش TBARS گردید. نسبت GSH به GSSG در تیمارهای نیکوتینی به میزان ۴۹/۲۰٪ و ۶۰/۳۰٪ کاهش یافت ($P < 0.01$). فعالیت GST نیز به میزان ۳۴/۰۱٪ و ۵۷/۱۹٪ افزایش معنی‌داری را نشان داد. در بررسی میزان استحکام DNA سلولهای اسپرم توسط روش ستاره دنباله‌دار (Comet) مشخص شد که تیمارهای نیکوتینی موجب افزایش شکستگی در مارپیچ دوتایی DNA اسپرمهای تیمار یافته گردیدند. سطوح افزایش یافته TBARS و نیز کاهش نسبت GSH به GSSG مؤید گسترش روند اکسیداسیون در لیپیدهای غشایی سلولهای اسپرم بوده که به واسطه عمل رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن به انجام رسیده است. افزایش فعالیت GST نیز نشانگر گسترش روند LPO در این سلولها می‌باشد. مجموعه تغییرات فوق منجر به اختلال عملکردهای اسپرم شده که منجر به کاهش قدرت باروری اسپرم و ناباروری به دنبال خواهد داشت.

کل واژگان: اسپرم، نیکوتین، رادیکال آزاد، آنتی‌اکسیدان، گلوکاتایون S- ترانسفراز، پراکسیداسیون چربی و روش سنجش ستاره دنباله‌دار.

آدرس مکاتبه: دکتر مهران عربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، صندوق پستی ۱۱۵، شهرکرد، ایران.

پست الکترونیک: mehranarabi@yahoo.com

مقدمه

در خلال چند دهه گذشته کیفیت مایع اسپرمی^۱ و قدرت باروری در جوامع بشری به طور چشمگیری کاهش یافته است. این امر نشانگر آن است که کیفیت مذکور دستخوش تغییراتی شده که ریشه در عوامل سمی موجود در محیط زیست انسانها داشته که مواردی همچون مسمومیت با انواع آفتکشها، سرب و نیز قرارگیری در معرض تشعشعات از آن جمله می باشد. از این میان توجه ویژه‌ای به اجزاء موجود در دود سیگار شده و توجه هر چه بیشتر بر تأثیر این مواد بر بلوغ سلولهای زاینده دستگاه تولید مثلی بوده است(۱).

نیکوتین(C₁₀H₁₄N₂)^۲ به عنوان یک الکلونید بسیار فرار از اجزاء مهم دود سیگار بوده و قادر به تقلید بسیاری از اثرات زیان آور آن در بدن است(۲). مقدار نیکوتین موجود در گیاه تنباکو از ۰/۸-۰/۵٪ متغیر بوده و یک نخ سیگار حاوی ۲۴-۲٪ نیکوتین می باشد(۲).

در سالهای اخیر نیکوتین به صورت کیسه‌های زیرجلدی و نیز آدامس‌های نیکوتین‌دار در ترک اعتیاد به سیگار، کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است. مقدار جذب نیکوتین از طریق دود سیگار وابسته به pH دود سیگار مصرفی بوده، به طوری که در سیگارهای اروپایی با pH در حدود ۵/۵ به علت یونیزه شدن نیکوتین در این شرایط، از مقدار جذب آن در دستگاه تنفسی بسیار کاسته می شود(۳). نیکوتین به راحتی از غشاء سلولهای بدن عبور کرده و قابلیت واکنش با برخی از اجزاء درون سلولی نظیر پروتئین توبولین در سیتوپلاسم سلولهای در حال تقسیم نظیر سلولهای زاینده جنسی را دارا بوده و بدین ترتیب موجب اختلال در تقسیم سلول خواهد گردید(۴-۳). نیکوتین در اثر فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 کبدی متابولیزه شده و به کوتینین^۳ تبدیل شده که از طریق ادرار دفع می گردد.

بر اساس تحقیقی تیمار نیکوتینی موجب اختلال در فرایند اسپرماتوژنز، آتروفی و تحلیل بیضه‌ها در موش‌های آزمایشگاهی می گردد(۵).

همچنین در انسان، استفاده از آگونیست‌های نیکوتین با اثر بر روی گیرنده‌های استیل کولین موجب کاهش تولید آندروژن‌ها می شود(۶). در حیوانات ماده نیز تأثیر مستقیم و سمی نیکوتین بر دستگاه تولید مثلی موجب کاهش تولید استرادیول و مهار تخمگذاری شده است(۷). Cope در سال ۱۹۹۸، نشان داد که نیکوتین با تأثیر مستقیم بر گلبولهای سفید^۴ موجود در مایع اسپرمی، سبب تولید و آزادسازی انواع رادیکالهای فعال اکسیژن یا ROS^۵ شده که در نهایت باعث کاهش شدید در تحرک اسپرم‌ها^۶ می گردد(۸).

تمامی موجودات زنده جهت بقا خود نیازمند به اکسیژن هستند. عمده متابولیت‌های فعال اکسیژن(ROS) شامل O₂⁻، OH^۰ و H₂O₂ بوده که قادر به حمله به بیومولکولها و تغییرات زیان آور در ساختار سلولی می باشند. ROS از جمله عوامل مهم در بروز ناباروری در مردان بوده و از دو منبع متفاوت در مایع اسپرمی تولید می گردد، شامل یکی سلولهای اسپرم آسیب دیده و دیگری گلبولهای سفید فعال شده می باشد. تولید ROS در سلولهای اسپرم سالم و فعال به عنوان یک فرایند فیزیولوژیک شناخته شده که موجب بروز واکنش اکروزومی^۷ در اسپرم می شود. این تأثیر مثبت ROS منوط به وجود آنتی‌اکسیدان‌ها یا حذف‌کننده‌های مازاد ROS در محیط عمل اسپرم است. در اسپرم هرگونه عدم تعادل بین تولید و حذف ROS، موجب بروز فرآیند استرس اکسیدتیو^۸ در سلول می گردد. ROS با اختلال در مورفولوژی، ساختار DNA، منجر به کاهش تحرک

4-Leukocyte

5-Reactive Oxygen Species

6-Motility

7-Acrosome reaction

8-Oxidative stress

1-Semen

2-Nicotine

3-Cotinine

تأثیر نیکوتین بر اکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم

دکتر عربی و...

اسپرم و در نهایت عدم اتصال اسپرم به سطح تخمک می‌گردد (۹).

وظیفه آنتی‌اکسیدان‌ها جمع‌آوری، خنثی‌سازی و یا حذف رادیکال‌های آزاد موجود در درون اسپرم و نیز محیط خارج از آن یعنی پلاسمای سمینال است. دو نوع سیستم آنتی‌اکسیدانی مهم در این رابطه شامل: آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر کاتالاز^۱، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)^۲ و گلوکاتایون S- ترانسفراز (GST)^۳ و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (شامل دو گروه محلول در آب و محلول در چربی) نظیر: آلبومین، اسکوربات، گروه‌های سولفیدریل و ویتامین E می‌باشد. اسپرم به علت دارا بودن مقادیر کمی از آنتی‌اکسیدان‌ها در سیتوپلاسم خود (کاهش سیتوپلاسم در طی روند اسپرماتوزن)، بسیار وابسته به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای مایع سمینال بوده و چنانچه در طی شستشو این بخش از مایع اسپرمی از اسپرمها جدا گردد، اسپرمها بسیار مستعد اکسیداسیون لیپیدهای غشایی (LPO)^۴ و تغییر در ساختار غشاء سلولها خواهند شد. از جمله پیامدهای آسیب‌رسان LPO در سلول تخریب غشاء، غیر فعال شدن آنزیمهای متصل به غشاء نظیر ATPases، غیرفعال شدن آنزیمهای سیتوپلاسمی مانند گلوکز ۶- فسفاتاز و سیتوکروم اکسیداز (با سازوکار مسدودسازی گروه‌های آمینی و سولفیدریلی این پروتئین‌ها)، می‌باشند. سیالیت و انعطاف‌پذیری بالای غشاء اسپرم ناشی از وجود مقادیر بالایی از اسیدهای چرب اشباع نشده در آن بوده که بسیار مستعد LPO می‌باشند و در پی آن سیالیت غشاء و قدرت اتصال به تخمک و باروری آن کاهش می‌یابد (۹-۱۰). وجود مقادیر زیاد ROS در مایع اسپرمی مردان افراد سیگاری، شانس باروری آنها را به میزان ۷ برابر نسبت به مردان با مقادیر طبیعی ROS کاهش

می‌دهد. این قبیل مردان نسبت به مردان طبیعی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کمتری در پلاسمای سمینال، برخوردار هستند (۱۱).

با توجه به مطالب فوق و نقش نیکوتین در ایجاد ROS و اختلال در دستگاههای مختلف بدن و با توجه به تحقیقات گسترده در جهت بررسی اثرات نیکوتین به عنوان یک جزء مهم دود سیگار بر ساختار سلولی اسپرم در شرایط *in vitro* و نیز عدم بررسی نقش حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مدل انسانی، لذا بر آن شدیم تا اثرات نیکوتین در آسیب بر عملکردهای اسپرم و نقش آنتی‌اکسیدانها در تعدیل این اثرات در محیط *in vitro* مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روشها

تعداد ۸ نمونه مایع اسپرمی از افراد داوطلب غیرسیگاری و سالم اخذ گردید. این مردان در محدوده سنی ۲۵-۲۰ سال قرار داشته و از نظر قدرت باروری وضعیت مطلوب و مثبتی (از حیث تعداد سلول‌های اسپرم، قدرت تحرک و سایر ویژگیها) معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۵ را دارا بودند. نمونه‌های مایع اسپرمی مذکور پس از جمع‌آوری و مایع شدن در شرایط دمای اتاق به آرامی با یکدیگر مخلوط گردیده و در نهایت به سه بخش مساوی تقسیم شدند. ابتدا نمونه‌های سمینال از اسپرمها به مدت ۱۰ دقیقه (با دور ۳۰۰×g) سانتریفوژ شده تا پلاسمای سمینال از اسپرمها جدا گردد، آنگاه رسوب اسپرمی حاصله با محلول ۰/۲ مولار از بافر فسفات‌ه سالین‌دار (PBS)^۶ با pH=۷/۲ به روش قبل سانتریفوژ و مورد شستشو قرار گرفتند. پس از شستشو به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رسوب سلولی حاصله در حداقل مقدار حلال (سوسپانسیون سلولی) به لوله‌های آزمایش در این پژوهش افزوده گردید (لازم به ذکر است که هر یک

1-Catalase

2-Glutathione Peroxidase

3-Glutathione S-Transfrase

4-Lipoperoxidation

5-World Health Organization

6-Phosphate Buffered Saline

دول ۱۱- تأثیر افزودن آنتی اکسیدان‌ها بر اکسیداسیون لیپیدهای غشایی ناشی از تیمارهای نیکوتینی بر روی اسپرم
شسته شده افراد سالم بارور در محیط *in vitro*

MDA (moles/mg protein/min)				غلظت نیکوتین (mM)
گلوکاتیون (۵)	ویتامین C (۱)	ترولوکس (۰/۰۲)	فاقد آنتی اکسیدان اضافی	
۰/۳۳۲±۰/۰۱۹	۰/۱۱۷±۰/۰۲۴ ***	۰/۱۱۳±۰/۰۲۸ ***	۰/۱۴۴±۰/۰۲۶ **	محلول فاقد نیکوتین
۰/۵۰۳±۰/۰۴۳ **	۰/۳۱۴±۰/۰۲۸ b	۰/۲۶۵±۰/۰۲۶ b	۰/۳۷۷±۰/۰۳۳ b	۰/۵
۰/۵۹۱±۰/۰۲۸ ***	۰/۳۸۵±۰/۰۳۲ B	۰/۲۷۰±۰/۰۳۳ b	۰/۵۰۲±۰/۰۳۳ a	۱

- هر داده نشانگر میانگین ± انحراف استاندارد مربوط به سه مشاهده مستقل (هر کدام با سه مرتبه تکرار) است.

- تلاقی خانه‌های هیچ غلظت نیکوتین و هیچ آنتی اکسیدان، مربوط به مقدار گروه شاهد یا کنترل است.

- مقادیر P مقایسه شده با گروه کنترل عبارتند از: $P^{**} < 0.01$ ، $P^{***} < 0.001$

- مقادیر P مقایسه شده با گروه تیمار مربوط عبارتند از: $P^a < 0.05$ ، $P^b < 0.01$

غلظت‌های خاص از آنتی اکسیدان‌ها، طی یک سری آزمایشات جداگانه و با استفاده از یک طیف غلظتی از هر یک از این مواد در راستای مقابله با پراکسیداسیون سلولی در نمونه‌های اسپرمی بدون هیچ نوع تیمار (گروه شاهد با پراکسیداسیون ذاتی و خودبخودی در غشاء اسپرم) مورد انتخاب قرار گرفتند (نتایج نشان داده نشده است).

آزمایش LPO بر طبق روش Buege و همکاران به انجام رسید (۱۳). در این روش از قدرت واکنش‌دهندگی TBA^۱ با MDA^۲ (به عنوان محصول نهایی عمده در انتهای روند LPO) استفاده شد. در نهایت یک ترکیب زرد رنگ از MDA TBA در لوله‌های آزمایش محتوی تیمار نیکوتینی حاصل گردید که به روش طیف سنجی نوری^۳ قابل اندازه‌گیری بود. مجموعه محصولات نهایی روند LPO موسوم به اجسام واکنش‌دهنده با TBA یا

از سه بخش نمونه‌های مایع اسپرمی در بالا، خود به عنوان یک نمونه مستقل در نظر گرفته شده‌اند). در این تحقیق از دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی مولار نیکوتین استفاده شد که درست معادل با غلظت بافتی این ماده در بیضه افراد سیگاری شدید (با مصرف بیش از ۲۰ نخ سیگار در روز) است (۱۲). نیکوتین مایع از شرکت Sigma آمریکا خریداری شده بود و به صورت محلول پایه ۱۰۰ میلی مولار در PBS (pH=۷/۲) حل شده و از آن دو غلظت مورد نظر تهیه گردید. در تیمارها، حجم ۰/۱ میلی لیتر از نیکوتین به هر لوله اضافه گردید. در گروه شاهد یا کنترل به جای نیکوتین از محلول PBS هم حجم آن استفاده شد. در تمامی آزمایشات این پژوهش زمان انکوباسیون ۳۰ دقیقه و دمای آن ۳۷ درجه سانتیگراد بود. مواد آنتی اکسیدان نیز در حلال PBS وارد شده و غلظت‌های نهایی ۱ میلی مولار از ویتامین C (اسکوربات)، ۵ میلی مولار از گلوکاتیون (GSH) و ۰/۰۲ میلی مولار از ترولوکس مورد استفاده قرار گرفت. این

1-Thiobarbituric acid
2-Malondialdehyde
3-Spectrophotometry

جدول ۲- تأثیر اضافه‌سازی آنتی‌اکسیدان‌ها بر تغییرات نسبت گلوتاتیون احیاء شده به اکسید شده (GSH/GSSG)

ناشی

از تیمارهای نیکوتینی بر اسپرمهای شسته‌شده افراد سالم و بارور در محیط *in vitro*

نسبت گلوتاتیون احیاء شده به گلوتاتیون اکسیده			آنتی‌اکسیدان (mM)
فاقد نیکوتین	۰/۵	۱	
۳/۳۵۱ (%۱۰۰)	۱/۷۰۳ (%۴۹/۱۸)	۱/۳۲۹ (%۶۰/۳۰)	فاقد آنتی‌اکسیدان اضافی
۳/۶۵۴ (%۹)	۱/۷۷۰ (%۴۷/۲۰)	۱/۴۰۳ (%۵۸/۱۰)	ویتامین C (۱)
۵/۱۵۳ (%۵۳/۷)	۲/۰۷۱ (%۳۸/۲۰)	۱/۶۱۶ (%۵۱/۸۰)	ترولوکس (۰/۰۲)

- اعداد درون پرانتزها نشان‌دهنده کم و یا زیاد شدن نسبت گلوتاتیون احیاء شده به اکسید شده بوده که نسبت به مقدار

گ ه ه

سلولهای اسپرم لیز گردیده تا یک بخش هموژن تولید گردد و سپس این بخش ابتدا با دور 1000 rpm و سپس 10000 rpm (هر نوبت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد) سانتریفوژ گردیده و مایع روئی معادل با PMS خواهد بود.

به منظور بررسی وقوع شکست‌های احتمالی در ساختار DNA سلولهای اسپرم در تیمار با نیکوتین، از روش سنجش ستاره دنباله‌دار^۱ با ژل الکتروفورز برای سلولهای واحد با رنگ‌آمیزی توسط اکریدین نارنجی^۶ استفاده گردید (۱۶).

در این روش در صورت وقوع شکست در ساختار DNA، شبکه کروماتین هسته سلول اسپرم در محیط الکتروفورز، ضمن حرکت، تغییر شکل یافته و به حالت یک ستاره دنباله‌دار (واجد سر و دم) خود را نشان می‌دهد.

هر قدر مقدار و وسعت شکستگی‌ها بیشتر باشد، طول دم ستاره دنباله‌دار نیز بیشتر خواهد بود. روش آماری مورد استفاده از نوع student t-test بوده و میانگین گروههای مختلف با یکدیگر مقایسه گردیدند.

TBARS^۱ بوده که MDA به عنوان عمده‌ترین این محصولات است. سنجش نسبت گلوتاتیون احیاء شده (GSH) به گلوتاتیون اکسیده (GSSG)^۲ با اندازه‌گیری هر یک از این دو فرم گلوتاتیون در محیط‌های حاوی تیمار نیکوتینی به روش Sedlak و همکاران انجام گرفت (۱۴). در این روش واکنش ماده DTNB^۳ با گروه‌های سولفیدریل مولکولهای گلوتاتیون محیط عمل استفاده گردید. فعالیت آنزیمی گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) بر طبق روش معروف Habig و همکاران (۱۹۷۴) مورد سنجش قرار گرفت (۱۵). جهت شروع واکنش در این روش از ماده CDNB^۴ استفاده گردید.

این سنجش بر روی اسپرمهای لیز شده انجام گرفت که در طی مراحل مختلف سانتریفوژ، در نهایت بخشی از اجزاء سیتوپلاسمی موسوم به PMS^۵ جدا و جهت سنجش فعالیت GST مورد استفاده قرار گرفت. PMS در واقع بخشی از فراکسیون‌های سلولی در محدوده میتوکندری‌ها که غنی از GST بوده و بیشترین فعالیت این آنزیم را دارا می‌باشند، برای حصول آن ابتدا

1-Thio Barbituric Acid Reactive Substance

2-Oxidize Glutathione

3-5,5-Dithio-Bis-2-nitrobenzoic acid

4-1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene

5-Post-Mitochondrial Supernatant

6-Comet assay

7-Acridine orange

جدول ۳- تأثیر افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها و تغییرات فعالیت گلوتاتیون S ترانسفراز ناشی از تیمارهای نیکوتینی بر روی اسپرم شسته‌شده افراد سالم و بارور محیط *in vitro*

GST (μ moles CDNB-GSH conjugates/mg protein/min)			آنتی‌اکسیدان (mM)
فاقد نیکوتین	(۰/۵)	(۱)	
۰/۵۹۱±۰/۰۶۱	۰/۷۹۲±۰/۰۶۳ *	۰/۹۲۹±۰/۰۸۳ **	فاقد آنتی‌اکسیدان
۰/۵۵۷±۰/۰۶۹	۰/۶۴۲±۰/۰۶۵	۰/۷۵۲±۰/۰۶۱	ویتامین C (۱)
۰/۵۰۷±۰/۰۹۱	۰/۵۲۵±۰/۰۷۳ a	۰/۵۶۶±۰/۰۶۷ b	ترولوکس (۰/۰۲)

–هر داده نشانگر میانگین \pm انحراف استاندارد مربوط به سه مشاهده مستقل (هر کدام با سه مرتبه تکرار) است.

–مقادیر P مقایسه شده با گروه کنترل عبارتند از: $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ **

–مقادیر P مقایسه شده با گروه تیمار مربوطه عبارتند از: $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ^a

نتایج

هنگام افزودن ترولوکس (۰/۰۲ میلی‌مولار) به محیط عمل مشاهده گردید که به ترتیب به میزان ۴۷/۴۰٪ و ۵۴/۳۰٪ (معنی‌دار در سطح ۹۹٪ یا $P < 0.01$) برای تیمارهای نیکوتینی بود. آنتی‌اکسیدان سوم یعنی گلوتاتیون (۵ میلی‌مولار) نیز موجب کاهش در سطوح TBARS و کاهش روند LPO در محیط عمل به میزان ۲۵/۱۰٪ و ۱۵٪ (به ترتیب معنی‌دار در سطح $P < 0.01$ و $P < 0.05$) گردید. در یک آزمایش فرعی مربوط به LPO مشخص گردید چنانچه یونهای دو ظرفیتی آهن (Fe^{2+}) به محیط واجد اسپرم اضافه گردد، موجب افزایش معنی‌داری در میزان TBARS (۵۹/۳۳٪) گردیده و هنگامی که آنتی‌اکسیدانها به این محیط افزوده گردند ترولوکس و گلوتاتیون موجب کاهش TBARS شده، اما ویتامین C در طی یک عمل سینرژی با یونهای آهن، موجب افزایش هرچه بیشتر در سطوح TBARS محیط آزمایش (۸۹/۱۶٪) نسبت به گروه کنترل گردید (نتایج نشان داده نشده است).

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (LPO): در طی آزمایش اکسیداسیون لیپیدهای غشایی یا LPO (جدول ۱) مشخص شد که تیمارهای نیکوتینی (به ترتیب ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) موجب افزایش سطوح TBARS (در این قسمت مقادیر TBARS مساوی با مقادیر MDA تولید شده در نظر گرفته شده است) به میزان ۵۱/۵۰٪ و ۷۸٪ (به ترتیب در سطوح معنی‌دار $P < 0.01$ و $P < 0.001$) در محیط واجد اسپرم نسبت به گروه کنترل گردیدند. افزایش در میزان اکسیداسیون سلولی با افزایش در رنگ زرد تولید شده در جریان آزمایش همراه بود. سطوح افزایش یافته TBARS با افزودن آنتی‌اکسیدانها به محیط عمل دچار کاهش چشمگیری گردید. هنگامی که ۱mM ویتامین C به محیط عمل اضافه گردید، کاهش معنی‌داری در سطوح TBARS به میزان ۳۷/۶۰٪ و ۳۵٪ نسبت به گروههای تیمار یافته با نیکوتین ($P < 0.01$) پدیدار گردید. کاهش بیشتری در سطوح TBARS به



شکل ۱- نمای اسپرم پس از قرار گرفتن در میدان الکتروفورزی به روش ستاره دنباله‌دار برای بررسی وقوع شکستگی‌های احتمالی در ساختار DNA سلول

-نقاط روشن کروی نشان‌دهنده مجموعه کروماتین هسته اسپرم سلولهای سالم می‌باشد.

-نقاط روشن کشیده و غیرکروی نشان‌دهنده مجموعه کروماتین هسته سلولهای اسپرم آسیب دیده می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوکوتاتیون S-ترانسفراز (GST): در این آزمایش افزودن تیمارهای نیکوتینی (۱ و ۵ میلی‌مولار) فعالیت GST را به عنوان اولین آنزیم تدافعی در مقابله با فرآیند اکسیداسیون سلولی (از مولکولهای GST به عنوان سوبسترا، استفاده می‌نماید) به طور معنی‌داری به میزان ۳۴/۰۱٪ و ۵۷/۱۹٪ (به ترتیب $P < 0.05$ و $P < 0.01$) افزایش می‌دهد. از سوی دیگر افزودن آنتی‌اکسیدانها موجب کاهش در فعالیت این آنزیم می‌گردد. در این بین ترولوکس موجب کاهش معنی‌دار به میزان ۳۳/۷۱٪ و ۳۹/۰۷٪ ($P < 0.05$) در تیمارهای نیکوتینی گردید (جدول ۳).

تشخیص شکستگی در DNA اسپرمها: در این قسمت جهت تشخیص و تعیین میزان شکستگی در DNA اسپرمها از روش سنجش ستاره دنباله‌دار استفاده گردید و در طی آن معلوم شد که تیمارهای نیکوتینی (۱ و ۵ میلی‌مولار) موجب آسیب و ایجاد شکستگی

سنجش نسبت گلوکوتاتیون احیاء شده به اکسیده (GSH/GSSG): این نسبت دارای رابطه‌ای معکوس با استرس اکسیداسیون سلولی بوده و کاهش آن به منزله افزایش حضور رادیکالهای آزاد در محیط و گسترش روند LPO می‌باشد و بالعکس. در این قسمت نشان داده شده که تیمارهای نیکوتینی (۱ و ۵ میلی‌مولار) باعث کاهش در میزان این نسبت می‌گردد (درصد تغییرات در جدول ۲ آورده شده است)، اما در مقابل، به کارگیری آنتی‌اکسیدانها یعنی ترولوکس و ویتامین C (از کاربرد گلوکوتاتیون به علت جلوگیری از بروز اشتباه در اندازه‌گیری GSH در محیط، خودداری شد) موجب افزایش مقدار این نسبت می‌گردد. نکته جالب توجه آن که پس از افزودن ترولوکس به گروه کنترل، موجب حفظ و افزایش مولکولهای گلوکوتاتیون احیاء (GSSG) گردید (جدول ۲).

در DNA (به ترتیب در ۵ و ۱۰٪) اسپرمهای مورد بررسی می‌گردد. کاربرد موادآنتی‌اکسیدان نتوانست تغییر معنی‌داری را در شمارش سلولهای آسیب دیده ایجاد نماید. با کمک رنگ‌آمیزی اکریدین نارنجی مشخص گردید که تقریباً تمامی شکستگی‌های موجود در DNA اسپرمها از نوع دو رشته‌ای یا (DSDB) بود. شکل ۱ نشان‌دهنده اسپرمها در تیمار نیکوتینی (یک میلی‌مولار) بوده که در آن نقاط روشن کروی، مجموعه کروماتین هسته سلولهای اسپرم سالم و نقاط روشن کشیده و غیر کروی، مجموعه کروماتین هسته سلولهای اسپرمی است که دچار آسیب و شکستگی شده و به شکل یک ستاره دنباله‌دار دارای سر و دم مشخص گردیده‌اند.

بحث

در بدن موجودات زنده، اکسیژن به عنوان یک تیغ دو لبه عمل می‌نماید. از یک طرف زندگی بدون آن غیرممکن بوده و از طرف دیگر بدن ما به طور مستمر در معرض مسمومیت با آن قرار دارد، مسمومیت از آن جهت که رادیکالهای آزاد مشتق از آن (ROS) خطرآفرین بوده و نظم فیزیولوژیک بدن را مختل می‌سازند. تشخیص استرس اکسیداتیو سلولی در پلاسمای سمینال افراد نابارور، نشان می‌دهد که ROS قادر به ایفاء یک نقش مهم در پاتوفیزیولوژی ناباروری در مردان است (۱۷). مطالعات Kobayashi و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که یک کاهش مستمر در تعداد سلولهای اسپرم زنده و فعال در ارتباط با افزایش مقدار ROS در محیط وجود دارد (۱۸). همان طور که در بخش مقدمه ذکر شد، یکی از بارزترین شواهد صدمات سلولی ناشی از عمل ROS پدیده LPO بوده و سلولهای اسپرم به دلیل دارا بودن مقادیر زیاد اسیدهای چرب اشباع نشده در ساختار غشایی خود، بسیار مستعد آسیب توسط LPO

هستند (۹). بارزترین اثر LPO در سلولها، ایجاد اختلال در نظم و کار غشاء سلولها است، بطوریکه روندهای انتقال یون‌ها و مواد گوناگون و نیز شیب‌های غلظتی در دو طرف غشاء همراه با انتقال پیامبرهای شیمیایی به واسطه گیرنده‌های غشایی دستخوش تغییر شده و مختل می‌گردد (۱۹).

در سال ۱۹۹۸ Cope، نشان داد که نیکوتین به عنوان یک ترکیب فعال و مهم در دود سیگار قادر است تا سطوح ROS را در پلاسمای مایع سمینال افزایش داده و بدین ترتیب ناباروری را القاء نماید (۸). در این مطالعه مقدار MDA تولید شده پس از گذشت نیم ساعت، (معادل با TBARS) در محیط حاوی اسپرم انسان، به میزان معنی‌دار و وابسته به غلظت، افزایش یافت. MDA به عنوان یکی از عمده‌ترین محصولات نهایی اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در طی روند LPO در سیستم‌های زیستی، مطرح بوده و حدود ۵۰٪ کل TBARS را تشکیل می‌دهد و به واسطه واکنش‌دهی زیاد آن با TBA، به راحتی می‌توان، وسعت و گستردگی روند LPO را مشخص نمود. مولکولهای MDA با نفوذ به درون ساختار غشاء سلول موجب عدم تقارن در توزیع اجزاء لیپیدی غشاء شده و علاوه بر این با ایجاد پیوندهای محکم با DNA سلول، موجب بروز صدمات و شکستگی‌هایی در این کروموزوم می‌شود (۲۰-۱۹). وجود رابطه معکوس بین غلظت MDA محیط و میزان چسبندگی اسپرم به سلول تخمک توسط Aitken و همکارانش در سال ۱۹۹۲ به اثبات رسیده است (۲۱). نتایج حاصل از مطالعه اخیر نشانگر قدرت و توانایی نیکوتین در جهت معرفی رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن در محیط واجد اسپرمهای انسان است که توسط ترکیب زرد رنگ MDA TBA قابل اثبات است. همانطوریکه پیش از این ذکر شد، نیکوتین دارای قابلیت عبور از غشاء سلولها بوده، بنابراین قادر

است با اجزاء غشاء نیز واکنش متقابل داده و به نوعی باعث تولید و یا رهاسازی ROS در این ساختار گردد. غشاء اسپرم حاوی آنزیمی موسوم به NADPH-اکسیداز بوده که به هنگام فعالیت بیش از حد، مقادیر زیادی از ROS را به محیط عرضه کرده و موجب اکسیداسیون سلولی خواهد گردید (۲۲). بنابراین تصور می‌شود که نوعی ارتباط بین نیکوتین و این آنزیم در جهت تولید ROS و القاء پدیده LPO در غشاء اسپرم وجود دارد. در مطالعه‌ای روی سلولهای پانکراس انسان مشخص گردید که افزودن نیکوتین به محیط کشت این سلولها موجب افزایش در مقدار TBARS و نیز ROS می‌گردد (۲۳). به نظر این محققان نیکوتین به صورت مستقیم بر غشاء سلول اثر نموده و تولید ROS را سبب می‌شود. در آزمایش مذکور حضور ROS در محیط به روش لومی‌نسانس^۱ ثابت کردند، اما توضیحی در مورد آن که نیکوتین از چه طریق سبب تولید و رهاسازی ROS در محیط عمل شده، ارائه نشده است. نیکوتین دارای اثرات زیان‌آوری در غلظتهای یک میلی‌مولار و بیشتر بر مشخصه‌های حرکتی اسپرم بوده و این در حالی است که غلظت ۰/۱ میلی‌مولار آن فاقد هرگونه اثر مخربی بر عملکرد اسپرم است (۲۴). همچنین در رابطه با اثرات مخرب نیکوتین بر غشاء سلولهای جنسی و تأثیر آن بر فرآیند لقاح و اتصال سلولهای اسپرم و تخمک، در سال ۱۹۹۵ Pekarisky و همکاران نشان دادند که میزان اتصال و نفوذ اسپرم به درون تخمک فاقد لایه زونا هامستر با افزایش در غلظت نیکوتین از ۰/۱ به ۱۰ میلی‌مولار، کاهش شدید و معنی‌دار را نشان می‌دهد (۲۵). موارد فوق و نتایج مطالعه اخیر نشان می‌دهد که نیکوتین قادر به تغییر ساختار غشاء اسپرم بوده که نتیجه آن عدم کارایی غشاء اسپرم در ارتباط و میان کنش با سلول تخمک بوده که منجر به عدم باروری خواهد گردید.

مواد آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی نظیر ویتامین C، گلوکاتینون و آنالوگ محلول در آب و ویتامین E (ترولوکس) به عنوان دومین سد دفاعی در مقابل عوامل آنتی‌اکسیدکننده نظیر ROS، پس از اولین خط دفاعی یعنی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی عمل می‌کنند و از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد^۲، باعث جمع‌آوری و حذف آنها از محیط عمل سلول‌ها می‌گردند. در پژوهش حاضر از غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار برای ویتامین C، ۵ میلی‌مولار برای GSH و ۰/۰۲ میلی‌مولار برای ترولوکس استفاده شد. در این بین ترولوکس به عنوان آنتی‌اکسیدان برتر و قادر به پائین آوردن سطوح TBARS در محیط عمل اسپرم بود. ترولوکس به عنوان یک آنتی‌اکسیدان کرومانولی^۳ توانایی به بدام انداختن دو رادیکال آزاد در نزدیکی ناحیه قطبی و آبدوست خود را دارد و قادر به نفوذ به درون ساختار لیپیدی غشاء سلول بوده و رادیکالهای آزاد را از درون غشاء جدا و از محیط دور می‌سازد (۲۶).

بدین ترتیب نقش ترولوکس به عنوان یک آنتی‌اکسیدان محلول در آب و نیز تا حدودی دارای قدرت ورود به لایه‌های لیپیدی غشاء آشکار گشته و احتمالاً نتایج بهتر آن در این مطالعه نیز ناشی از این پتانسیل دوگانه آن باشد.

همانطور که قبلاً اشاره شد در بخشی از این پژوهش برای تعیین LPO از سولفات فروس $0/2\text{mM}$ به عنوان منبع یون‌های دو ظرفیتی آهن (Fe^{2+}) استفاده شد تا اثر آن بر روند LPO مشخص گردد. نتایج حاصل نشان داد که افزودن یون‌های آهن باعث افزایش سطوح TBARS محیط می‌گردد و واکنش آنتی‌اکسیدان‌ها نیز در جهت کاهش این روند بود، اما در این قسمت ویتامین C نه تنها نقش مهمی خود را ایفاء ننمود بلکه در طی یک عمل سینرژیک با یون‌های آهن، موجب افزایش هر چه بیشتر میزان MAD و یا TBARS محیط آزمایش

2-Free radical trapping agents

3-Chromanol

1-Luminescence

گردید. یون‌های دو ظرفیتی آهن در طی واکنش موسوم به واکنش Fenton موجب تبدیل آب اکسیژنه محیط به رادیکال آزاد هایدروکسیل (OH^\bullet) شده، که محصولی بسیار فعال و واکنش‌دهنده بوده و به سرعت به ساختار لیپیدی غشاء حمله کرده و روند LPO آغاز می‌گردد. ویتامین C به عنوان یک عامل احیاءکننده موجب رهاسازی یون‌های فلزی نظیر آهن و مس از ساختار غشاء سلول شده و بدین ترتیب مواد اولیه مورد نیاز واکنش Fenton را تأمین و سبب تشدید اکسیداسیون سلولی خواهد شد (۲۷). نسبت گلوپروتئین احیاء به اکسید^۱ دارای نسبت عکس با استرس اکسیداتیو دانست. در مطالعه حاضر مشخص گردید که تیمارهای نیکوتینی قادر به کاهش این نسبت بوده و مقادیر زیادی از مولکولهای گلوپروتئین احیاء به مصرف رسیده و به گلوپروتئین اکسید تبدیل می‌شود. با توجه به نقش نیکوتین در تولید ROS می‌توان تصور نمود که ROS تولید شده توسط نیکوتین با کاهش گلوپروتئین احیاء موجب اکسیداسیون سلولی شده است. Mammoto و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که ROS از طریق اکسیداسیون گروههای سولفیدریل موجود در اسپرم موش، موجب کاهش قدرت اتصال اسپرم به تخمک گردید. بخش فعال و مهم در مولکول گلوپروتئین احیاء نیز، گروه سولفیدریل بوده که قادر به ایجاد واکنش با رادیکال‌های آزاد محیطی و حذف آنها است (۲۸). در اریتروسیت‌های انسان استرس اکسیداتیو موجب کاهش و یا حذف مولکولهای GSH شده و در مقابل، افزایش سطوح GSSG در محیط را به دنبال دارد (۲۹). بنابراین سنجش و بررسی این نسبت کمک زیادی در تفسیر اثرات یک ماده شیمیایی و یا یک داروی پیشنهادی در بافت‌های بدن جانوران خواهد نمود. گلوپروتئین S- ترانسفراز (GST) به عنوان یکی از اولین سدهای مقابله با اکسیداسیون سلولی نقش مهمی را در جهت حذف

1-Glutathione redox ratio

رادیکال‌های آزاد از محیط ایفاء می‌نماید. این نقش به کمک سوبسترای آن یعنی GSH امکان‌پذیر خواهد بود. GST علاوه بر حضور در درون اسپرم، به صورت چسبیده بر سطح خارجی غشاء اسپرم نیز مورد شناسایی قرار گرفته است (۳۰). در مطالعه حاضر نشان داده شد به دنبال افزایش نیکوتین به نمونه‌های مایع اسپرمی به صورت وابسته به غلظت نیکوتین موجب افزایش فعالیت GST می‌گردد. این امر نشان دهنده دخالت وسیع مجموعه‌های دفاعی وابسته به GSH در درون و برون اسپرم است. از آنجا که کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کندی فعالیت GST گردید، لذا می‌توان عنوان نمود که آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف ROS محیط پیرامون آنزیم GST موجب کاهش فعالیت آن شده و در نتیجه در میزان سوبسترای GSH این آنزیم صرفه‌جویی گردیده که در واقع همان افزایش ضریب حفاظتی سلول است. بدین ترتیب در شرایط استرس اکسیداتیو، فعالیت GST نیز افزایش معنی‌داری را نشان خواهد داد (۳۱). لذا با توجه به این امر تولید ROS توسط تیمارهای نیکوتینی قریب به یقین خواهد بود.

سلولهای اسپرم واجد دو مکانیسم تدافعی در مقابل هجوم عوامل خارجی به ساختار DNA خود هستند، یکی قالب محکم و مقاوم پروتامینی که در طی بلوغ اسپرم به آنان افزوده می‌شود و دیگری آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمای سمینال است، در حالت طبیعی بسته‌بندی محکم و لوپ‌های موجود در ساختار DNA مانع از ایجاد آسیب‌های جدی توسط رادیکال‌های آزاد محیطی می‌شوند اما در حالت جداسازی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از مایع اسپرمی (برای مثال شستشوی مایع اسپرمی) این سپر دفاعی، تضعیف می‌گردد. Hughes و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که در افراد بارور میزان شکستگی‌ها و صدمات موجود در DNA نسبت به افراد طبیعی بیشتر بوده و به تابش اشعه‌های قدرتمندی چون اشعه گاما بیشتر نیز حساس

آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط بوده است. در مجموع کاربرد نیکوتین به عنوان ماده‌ای مهم در دود سیگار، موجب القاء اکسیداسیون شدید در ساختار اسپرم شد که از نتایج آن تخریب غشاء سلولی و نیز بروز شکستگی در DNA این سلول‌ها بوده که به مقدار زیادی در ناباروری دخیل هستند. این نتایج زیان‌آور در صورت استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان‌ها قابل تعدیل و یا حتی برگشت به حالت اولیه نیز خواهند بود.

تعیین دقیق مسیر سیگنال‌رسانی نیکوتین به درون سلول‌های اسپرم و نیز تشخیص کمپلکس‌های احتمالی نیکوتین با اجزاء پلاسما سمینال که قادر به تأثیر بر ساختار این سلول‌ها هستند از جمله مواردی است که می‌توان در پژوهش‌های آینده مد نظر قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری جمهوری اسلامی ایران به جهت پشتیبانی مالی از تحقیق حاضر که در کشور هند انجام گرفت تشکر و قدردانی می‌گردد.

هستند (۳۱). در پژوهش حاضر به کمک روش ستاره دنباله‌دار نشان داده شد که تیمارهای نیکوتینی در یک روند وابسته به غلظت، موجب القاء شکستگی‌هایی در DNA اسپرم گردید. این شکستگی‌ها را می‌توان به طور مستقیم به حضور ROS ناشی از افزایش نیکوتین نسبت داد که با ایجاد اکسیداسیون موضعی مقدماتی بروز این شکستگی‌ها را فراهم نمودند. کاربرد رنگ اکریدین نارنجی نیز نشان داد که بیشتر این شکستگی‌ها از نوع دو زنجیره‌ای بوده و در نتیجه رنگ فلوروسانس سبز در DNA اسپرم حاصل می‌گردد. در مردان نابارور هردو شکستگی‌های DNA و سطوح ROS افزایش معنی‌داری را نشان داده است (۳۲). کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در آزمایش حاضر تا حدی از میزان شکستگی‌ها کاسته و تعداد سایر سلول‌های طبیعی بدن را افزایش داد ولی این تغییرات از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. حذف ROS از محیط، اولین و اصلی‌ترین علت در کاهش میزان آسیب‌های DNA سلول‌های اسپرم در هنگام افزودن

References

- 1-Kulikauskas B., Blaustain D., Ablin R.J. Cigarette smoking and its possible effects on sperm. *Fertil Steril.* 1985; 44: 526- 8.
- 2-Kavitharaj N.K., Vijaymmal P.L. Nicotine administration induced changes in the gonadal function in male rats. *Pharmacol.* 1999; 58: 2- 7.
- 3-Gorrod J.W., Wahren J. Nicotine and related alkaloids: absorption, distribution, metabolism and excretion. Published by Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo. 1993.
- 4-Racowsky C., Kaufman M.L. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured *in vitro*: analysis by light microscopy. *Fertil Steril.* 1992; 58: 8759- 5.
- 5-Weisberg E. Smoking and reproductive health. *Clin Reprod Fertil.* 1985; 3: 175- 86.
- 6-Kasson B.G., Hsueh A.J. Nicotinic cholinergic agonists inhibit androgen biosynthesis by cultural rat testicular cells. *Endocrinol.* 117: 1874- 80.
- 7-Blackburn C.W., Peterson C.A., Hales H.A, et al. Nicotine but not cotinine, has a direct toxic effect on ovarian function in the immature gonadotropin-stimulated rats. *Reprod Toxicol.* 1996; 814: 325- 31.
- 8-Cope G.F. The *in vitro* effects of nicotine and cotinine on sperm motility . *Hum Reprod.* 1998; 13: 777- 8.
- 9-Sharma R.K., Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urol.* 1996; 48(6): 835- 50.
- 10-Aitken R.J. Free radicals, Lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7:65-70.
- 11-Fraga C.G., Motchnik P.A., Wyrobek A.J., et al. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative to sperm DNA. *Mut Res.* 1996; 35: 199-203.
- 12-Reddy A., Sood A., Rust P.F., et al. The effects of nicotine on *in vitro* sperm motion characteristics. *J Assist Reprod Genet.* 1995; 12: 317- 23.
- 13-Buege J.A., Steven A.V. Methods in enzymology (biomembranes; part C: biological

- oxidants), Published by Academic Press. 1978; 302- 10.
- 14-Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein bound and non-protein bound sulphydryl groups in tissues with Ell man's reagent. Anal Biochem. 1968; 25: 192- 205.
- 15-Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby S. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974; 219: 7130- 9.
- 16-Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988; 175: 184- 91.
- 17-Pasqualotto F.F., Sharma R.K., Nelson D.R., et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril. 2000; 73: 459- 64.
- 18-Kobayashi H., Gil-Guzman E., Mahran A.M., et al. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminal-dependent chemiluminescence assay. J Androl. 2001; 22: 568- 74.
- 19-Ernster L. Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications, in: Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants. Published by CRC Press, Boca Raton. 1993; 1-38.
- 20-Yuli I., Wilbrandt W., Shinitzky M. Glucose transport through cell membrane of modified lipid fluidity. Biochemistry. 1981; 20: 4250- 7.
- 21-Aitken R.J., Buckingham D., West K., Wu F.C., et al. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to high level of reactive oxygen species on human spermatozoa. J Reprod Fertil. 1992; 98: 257- 65.
- 22-Aitken R.j., Clarkson J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil. 1987; 81: 459- 69.
- 23-Wetscher G.J., Bagchi M., Bagchi D., et al. Free radical production in nicotine-treated pancreatic tissue. Free Radic Biol Med. 1995; 18: 877- 82.
- 24-Reddy A., Sood A., Rust P.F., et al. The effects of nicotine on *in vitro* sperm motion characteristics. J Assist Reprod Genet. 1995; 12: 217- 23.
- 25-Pekarsky A., Varn E., Mathur R.S., et al. Effects of nicotine on sperm attachment and penetration of zona-free hamster eggs. Arch Andro. 1995; 34: 77- 82.
- 26-Barclay L.R.C., Vinqvist M.R. Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge type. Free Radic Biol Med. 1994; 16: 779- 88.
- 27-Gutteridge J.M.C. Antioxidants, nutritional supplements and life – threatening diseases. Br J Biomed Sci. 1994; 51:288- 95.
- 28-Mammoto A., Masumoto N., Tahra M., et al. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. Biol Reprod. 1996; 55: 1063- 8.
- 29-Nemeth I., Orvos H., Boda D. Blood glutathione redoxstatus in gestational hypertension. Free Radic Biol Med. 2001; 715-21.
- 30-Gopalakrishnan B., Aravinda S., Pawsh C.H., et al. Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. Biochem J. 1998; 329: 231- 41.
- 31-Hughes C.M., lewis S.E.M., Mekelvey-Martin V.J., et al. A comparison of baseline and infertile men, using a modified comet assay. Mol Hum Reprod. 1996; 2: 613- 9.
- 32-Barroso G., Morshedi M., Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod. 2000; 15: 1338- 44.