جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی تغییرات استرس اکسیداتیو ناشی از تیمارهای جیوه و نیکوتین دراسپرم گاو: تعدیل توسط منگنز و آلبومین

مهران عربی (Ph.D.)[۱]، احمدعلی محمدپور (Ph.D.)[۲].

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

۲ – استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوامل مهمی که نقشی شاخص در ناباروری مردان ایفاء می‌کند، فرآیند استرس اکسیداتیو یا افزایش غیرطبیعی رادیکال‌های آزاد در محیط است که در بیشتر موارد اثرات منفی بر روند تولیدمثل افراد بر جای می‌گذارد. در پژوهش حاضر نیز تغییرات احتمالی استرس اکسیداتیو ناشی از اثرات جیوه (۶۰۰μM و۱۲۰۰μM) به عنوان یون فلزی با توزیع فراوان در محیط و نیکوتین (۰/ ۷۵μM) به عنوان یک آلکالویید مهم در دود سیگار، در محیط آزمایشگاه بر ساختار بیوشیمیایی غشاء (پراکسیداسیون چربیها، LPO)، میزان گلوتاتیون (GSH)، قدرت تحرک و واکنش آکروزومی سلول‌های اسپرم گاو در حضور و بدون حضور ترکیبات منگنز و آلبومین سرم گاو (BSA) بررسی گردید.

روش بررسی : سنجش میزان پراکسیداسیون چربی های غشاء به کمک اندازه گیری غلظت MDA تولید شده در محیط انجام شد. غلظت گلوتاتیون احیاء شده (GSH) با اندازه گیری میزانDTNB احیاء شده، و واکنش آکروزومی نیز با به کارگیری روش هضم ژلاتین مورد سنجش قرار گرفتند. درصد سلول های متحرک و غیرمتحرک به کمک میکروسکوپ فاز کنتراست و در حرارت اتاق طی مدت ۱۲۰ دقیقه و با فواصل زمانی یک ساعته، شمارش گردیدند. ارزیابی آماری به کمک نرم افزارSPSS و با استفاده از آزمون t انجام گرفت. مقدار$p<۰/۰۵$ نیز از نظرآماری معنی دار در نظرگرفته شد.

نتایج: در این پژوهش افزودن جیوه و نیکوتین موجب افزایش معنی‌داری در میزان LPO ($p<۰/۰۱$) محیط حاوی اسپرم گردید. علاوه بر این، تیمارهای جیوه و نیکوتین موجب کاهش معنی‌داری در میزان غلظت GSH، قدرت تحرک (در فواصل زمانی مختلف) و درصد واکنش‌های آکروزومی (کاهش درصد هاله‌ها) اسپرم‌های گاو گردیدند. در مقابل، کاربرد ترکیبات منگنز و آلبومین باعث معکوس‌سازی این روندها شد. در این قسمت منگنز به عنوان یون برتر و با نتایج مطلوب‌تر عمل نمود. با توجه به این نتایج آلبومین در همراهی با غلظت‌های زیاد از یون‌های فلزی واجد خاصیت پرواکسیدانی گردیده، که نتیجه آن ناتوان‌سازی هر چه بیشتر اسپرمها (افزایشLPO و کاهش GSH ($p<۰/۰۱$)، کاهش واکنش آکروزومی ($p<۰/۰۰۱$) و کاهش در میزان قدرت تحرک در فواصل زمانی مختلف) بود.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج مطالعه حاضر جیوه و نیکوتین قادر به القاء ناباروری در اسپرم می‌باشند و این دو، اثرات خود را از طریق تغییر در برخی پارامترهای بیوشیمیایی وفیزیولوژیکی اسپرم نظیر ساختار غشاء و میزان قدرت تحرک، اعمال می‌کنند. علاوه بر این آنتی‌اکسیدانها (به ویژه آلبومین) را می‌توان به عنوان تیغ دو لبه‌ای در نظر گرفت که گاه پس از کاربرد، اثرات ناخواسته و منفی از خود بروز می‌دهد.

کلید واژگان: اسپرم، جیوه، نیکوتین، منگنز، آلبومین، استرس اکسیداتیو، تحرک اسپرم، واکنش آکروزومی، گلوتاتیون، مواد آنتی‌اکسیدان.

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

پست الکترونیک: mehranarabi@hotmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

زمینه و هدف

یکی از عوامل مهم در ناباروری مردان فرآیند استرس اکسیداتیو (OS)[1] است که در بیشتر موارد، اثرات منفی بر گامتها و روند تولیدمثل افراد بر جای می‌گذارد (۱). این نوع استرس، زمانی بروز می‌کند که سرعت تولید و عرضهٔ رادیکال‌های آزاد اکسیژن[2] (ROS) بیش‌تر از سرعت دفع آن از محیط درون و برون سلول باشد. بنابراین تمامی موجودات زنده هوازی با پارادوکسی به نام اکسیژن مولکولی (O_2) روبرو هستند؛ یعنی از یک سو به اکسیژن نیاز دارند و از سوی دیگر طی روند استرس اکسیداتیو، انواع ROS نظیر رادیکال هیدروکسیل (OH) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) بر عملکرد و ساختار سلولها تأثیر منفی داشته و بقاء موجود زنده را در معرض خطر قرار می‌دهد.

امروزه کاربرد مواد آنتی‌اکسیدان[3] با هدف خنثی‌سازی ROS و کاهش اثرات منفی ناشی از OS بر سلولها و بافت‌های بدن مدنظر محققان بسیاری قرار دارد. اسپرم به علت دارا بودن مقادیر کمی از آنتی‌اکسیدانها در سیتوپلاسم خود (کاهش سیتوپلاسم در طی روند اسپرماتوژنز)، بسیار وابسته به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای مایع منی است و چنانچه به هر علتی نظیر شستشو، این بخش از مایع منی از آن جدا شود، اسپرمها بسیار مستعد آسیب‌های اکسیداتیو خواهند شد (۵-۱).

یکی از تظاهرات مهم OS در سلول ها، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (LPO)[4] است که به عنوان پدیده‌ای فیزیولوژی در تمامی سلول‌های غنی از اسیدهای چرب غیراشباع، رخ می‌دهد و از مجموعه واکنش‌ها شامل تخریب و تشکیل مجدد پیوندهای دوگانه در اسیدهای چرب غشایی تشکیل می‌شود. روند LPO موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی، و ایجاد شکستگی در ساختار DNA اسپرم می‌شود (۱،۲،۴،۶،۷). در بیشتر موارد، این قبیل تغییرات همراه با ایجاد ناباروری در افراد خواهد بود (۱،۷،۸).

منگنز(Mn^{2+}) به‌عنوان یون فلزی کمیاب برای فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز میتوکندری و نیز فعال‌سازی آنزیم‌های هیدرولاز و کربوکسیلاز سلولی ضروری است (۹) منگنز در برخورد با برخی رادیکال‌های آزاد نظیر آنیون‌سوپراکساید ضمن تبدیل شدن به Mn^{3+} باعث حذف این رادیکال می‌گردد (۱۰). آلبومین نیز به عنوان پروتئین کوچک موجود در مایع سمینال و با عمل کلاتوری خود، یون‌های فلزی عامل پیشرفت و گسترش واکنش‌های پراکسیداسیون سلولی را جذب و حذف می‌نماید(۱۱).تحقیق Kankofer و همکاران نشان داد که وجود فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی (نوع آنزیمی)در مایع سمینال اسب موجب مهار روند تولیدROS و توقف پراکسیداسیون غشایی می‌شود(۱۲). با توجه به مطالب فوق و اهمیت القاء استرس اکسیداتیو توسط یون‌های فلزی و دیگر ترکیبات شیمیایی آلاینده محیط که موجب بسیاری از اختلالات بیوشیمیایی و عملکردی در سلول‌ها می‌گردد، هدف این مطالعه بررسی اثرات منفی احتمالی ناشی از افزودن کلرید جیوه و نیکوتین بر عملکرد اسپرم گاو، به عنوان یک مدل جانوری و میان کنش ترکیبات منگنز وآلبومین در تعدیل این اثرات در شرایط *in vitro* می‌باشد.

روش بررسی

جمع آوری و آماده سازی نمونه‌های اسپرمی: در این تحقیق، آزمایش‌ها روی اسپرم‌های انزال یافته گاو نژاد هولشتاین[5] انجام شد. بدین منظور دوازده نمونه سمینال (سیمن خالص) به کمک روش واژن مصنوعی، از مرکز اصلاح نژاد دام و تلقیح مصنوعی سازمان

1- Oxidative Stress
2- Reactive Oxygen Species
3- Antioxidants
4- Lipid Peroxidation
5- Holstein

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جهادکشاورزی، روستای کبوترآباد، شهرستان زیار از توابع شهر اصفهان تهیه گردید. نمونه‌های مذکور به سرعت و در یک فلاسک حاوی یخ، به محل آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشگاه شهرکرد منتقل شد و پس از شستشو با محلول رینگر تایرود[1] (شامل: ۰/۸g NaCl، ۰/۰۲ g KCl، ۰/۰۲g $CaCl_2$، ۰/۱ g $NaHCO_3$، ۰/۰۰۵ g NaH_2PO_4، ۰/۰۱ g $MgCl_2$، ۰/۱g گلوکز، ۰/۵g Hepes در ۱۰۰ml آب مقطر دو بار تقطیر شده) دو بار سانتریفوژ (۵۰۰g، هر بار به مدت ۵ دقیقه) گردید تا پلاسمای سمینال از اسپرم تفکیک گردد. در نهایت رسوب اسپرمی حاصله به چهار بخش مساوی تقسیم و به صورت حل شده در حداقل مقدار رینگر تایرود (سوسپانسیون سلولی) در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: به این منظور مقدار تولید ترکیبات واکنش‌دهنده با اسید تیوباربی تیوریک (TBA)[2] از جمله مالوندی آلدئید[3]، در محیط حاوی اسپرم گاو، اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل نمونه اسپرمی، محلول آبی ۱/۲٪ TBA، با یا بدون یون‌های فلزی، نیکوتین و آنتی‌اکسیدانها بود که به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از حرارت دادن مخلوط واکنش، و درانتها سانتریفوژ کردن، مقدارغلظت مجموعه TBA+MDA تشکیل شد. در محیط یا میزان جذب نوری سطحی‌ترین لایه از مخلوط واکنش، در طول موج ۵۳۲nm با کمک روش طیف سنجی نوری سنجیده شد و واحد نهایی برای آن *n moles MDA/mg protein/min*، در نظرگرفته شد (۱۳). در این پژوهش جهت نشان دادن فعالیت ویژه واکنش‌های بیوشیمیایی، واحدهای مربوطه در میزان محتوی پروتئین نمونه‌های اسپرمی (برحسب میلی‌گرم) بیان گردیدند.

تعیین میزان واکنش آکروزومی: به منظور تعیین میزان درصد واکنش‌های آکروزومی انجام شده در شرایط مختلف از روش آزمایش هضم ژلاتین[4] استفاده شد (۱۴). در این روش لامها پس از شستشو با الکل به مدت دو ساعت در یخچال نگهداری شدند و سپس یک لایه نازک (۱۰۰μl) از محلول ژلاتین ۲/۵٪ روی آنان گسترش داده شد. در مرحله بعد لامها به مدت یک شب در محلول ۰/۰۵٪ گلوتارآلدئید تثبیت گردید. صبح روز بعد یک شستشوی کامل به وسیله آب مقطر جهت حذف مازاد گلوتارآلدئید روی لامها به عمل آمد و سپس به میزان ۵۰μl از نمونه‌های اسپرمی به سطح آنان اضافه گردید و در انتهای این بخش، لامها برای ۲۴ ساعت در درون یک اتاقک مرطوب با دمای ۳۹°C نگهداری شدند. پس از انقضای این مدت، لامها با رنگ کوماسی آبی[5] رنگ‌آمیزی شدند و به کمک میکروسکوپ نوری معمولی (با بزرگنمایی ۴۰۰) تعداد و درصد نقاط روشن اطراف سر اسپرمها یا هاله‌ها[6] (محل‌های هضم ژلاتین توسط آنزیم‌های آزاد شده از آکروزوم) ثبت گردید.

اندازه‌گیری میزان گروه‌های سولفیدریل غیرپروتئینی: این گروه‌ها به عنوان یک سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی در درون اسپرم، که در حدود ۹۰٪ آنان گلوتاتیون احیاء شده (GSH) است، در نمونه‌های اسپرم هوموژن شده[7] (به کمک هوموژنایزر با ۳۰۰-۲۵۰ RPM، به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه)، با یا بدون یون فلزی و نیکوتین، و نیز آنتی‌اکسیدانها (با زمان انکوباسیون ۹۰ دقیقه) و با به کارگیری DTNB به عنوان معرف به انجام رسید و واحد نهایی برای آن *μmoles-SH/mg protein/min*، در نظر گرفته شد (۱۵).

بررسی قدرت تحرک اسپرم: برای این بررسی، تعداد و درصد سلول‌های متحرک و غیرمتحرک درمحیط‌های متفاوت به کمک میکروسکوپ فازکنتراست، و در حرارت

1- Tyrode's ringer
2- Thiobarbituric acid
3- Malondialdehyde (MDA)
4- Gelatin digestion test
5- Commasie blue
6- Halos
7- Homogenated sperm samples

اتاق، به مدت ۱۲۰ دقیقه و با فواصل زمانی یک ساعت، شمارش گردیدند. در این مرحله، نوع و درجه‌بندی حرکت اسپرمها مد نظر نبود و هر اسپرم با فعالیت حرکتی مشخص در میدان دید به عنوان سلول متحرک ثبت گردید. اسپرم‌های فاقد حرکت در قبل و پس از افزودن نیکوتین و جیوه به عنوان سلول‌های غیرمتحرک (غیرفعال یا مرده) در نظر گرفته شدند (۱۶).

غلظت‌های مورد استفاده از جیوه، نیکوتین و آنتی‌اکسیدانها: در پژوهش حاضر، اثرات کلرید جیوه ($HgCl_2$) با غلظت‌های $600\mu M$ و $1200\mu M$ و نیکوتین با غلظت $0/75mM$ بر عملکرد اسپرم گاو را در میانکنش با ترکیبات منگنز ($MnCl_2$) با غلظت $0/1mM$ و آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت ۱٪ بررسی‌نمودیم.

مواد شیمیایی و آنالیز آماری: کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از کارخانهٔ Merck آلمان تهیه و خریداری شد. محلول‌های مورد استفاده به کمک PBS (در آب مقطر دو بار تقطیر) تهیه شدند.

با بهره‌گیری از نرم افزار SPSS (version 11.0)، روش آماری Student's t-test مورد استفاده قرارگرفت. به کمک این روش میانگین داده‌های گروه‌های تجربی (تیمار) با گروه شاهد (کنترل) مقایسه گردید. مقدار $p<0/05$، از نظرآماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمون آماری t-test در مورد میانگین داده‌های حاصل از آزمایش سنجش میزان LPO یا تعیین غلظت MDA بعد از یک دوره انکوباسیون ۹۰ دقیقه‌ای، نشان داد که افزودن کلرید جیوه ($600\mu M$ و ۱۲۰۰) و نیکوتین ($0/75mM$) موجب افزایش قابل توجه و معنی‌داری در میزان تولید کمپلکس TBA+MDA محیط در مقایسه با گروه شاهد (بدون جیوه، نیکوتین و آنتی‌اکسیدانها)، به ترتیب به میزان ۲۶/۷۴ ، ۳۴/۸۸ و ۲۹/۰۷٪ ($p<0/01$) گردید (جدول شمارهٔ ۱). افزودن آنتی‌اکسیدان‌های منگنز و آلبومین به محیط حاوی اسپرم گاو موجب کاهش معنی‌دار در تولید محصول مهم روند LPO یعنی MDA گردید.

نکته قابل توجه در این میان اثر آلبومین در نمونه‌های اسپرمی تیمار شده با غلظت $1200\mu M$ جیوه بود که نه تنها باعث کاهشی در میزان تولید MDA محیط نگردید؛ بلکه موجب افزایشی نسبی در مقادیر MDA محیط شد (۷/۷۶٪). در این قسمت از آزمایشها، جیوه به صورت وابسته به دوز در پیشبرد تولید MDA محیط وارد عمل گردید (جدول شمارهٔ ۱).

جدول شمارهٔ ۲ مقادیر ثبت شده مربوط به تاثیر جیوه و نیکوتین بر میزان گروه‌های تیولی (GSH) موجود در محیط‌های حاوی اسپرم‌های گاو (با زمان انکوباسیون ۹۰ دقیقه) را نشان می‌دهد. از نظر آماری مشخص گردید که پس از کاربرد جیوه و نیکوتین، کاهش معنی‌داری در غلظت GSH محیط‌های حاوی اسپرم گاو پدید آمد که این کاهش به ترتیب به میزان ۲۲/۷۹٪،

جدول ۱- مقایسه میزان MDA تولید شده (پراکسیداسیون چربی ها) در نمونه های اسپرم گاو تیمار شده با جیوه و نیکوتین با یا بدون منگنز و آلبومین (BSA)

گروهها / آنتی‌اکسیدانها	*n moles MDA/mg protein/min* M ±SD			
	شاهد	کلرید جیوه ۶۰۰ μM	کلرید جیوه ۱۲۰۰ μM	نیکوتین ۰/۷۵ mM
بدون آنتی‌اکسیدان	۰/۰۸۶±۰/۰۰۵۰	*۰/۱۰۹±۰/۰۰۴۵	*۰/۱۱۶±۰/۰۰۵۰	*۰/۱۱۱±۰/۰۰۴۹
منگنز ۰/۱ mM	۰/۰۸۷±۰/۰۰۴۸	۰/۰۹۳±۰/۰۰۵۱	۰/۰۹۷±۰/۰۰۵۲	۰/۰۹۵±۰/۰۰۵۱
BSA ۱٪	۰/۰۸۶±۰/۰۰۵۱	۰/۰۹۵±۰/۰۰۵۳	*۰/۱۲۵±۰/۰۰۴۷	۰/۰۹۸±۰/۰۰۴۵

* مقادیرp مقایسه شده با گروه شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان، جیوه و نیکوتین): $p<0/01$.

هر داده نشانگر M±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر کدام با سه مرتبه تکرار) است.

جدول ۲- میزان گروه های سولفیدریلی غیر پروتئینی (GSH) در نمونه های اسپرم گاو تیمار شده با جیوه و نیکوتین با یا بدون منگنز و آلبومین (BSA).

گروهها / آنتی‌اکسیدانها	*µmoles –SH/mg protein/min* M±SD			
	شاهد	کلرید جیوه ۶۰۰ *µM*	کلرید جیوه ۱۲۰۰ *µM*	نیکوتین ۰/۷۵ *mM*
بدون آنتی اکسیدان	۵/۳۱±۰/۲۱۷	*۴/۱۰±۰/۳۰۲	**۳/۵۲±۰/۲۱۹	**۳/۸۴±۰/۲۸۷
منگنز ۰/۱ *mM*	۵/۳۷±۰/۲۱۰	**۴/۸۷±۰/۲۱۹	*۴/۳۴±۰/۲۴۷	*۴/۴۸±۰/۲۲۷
BSA ۱٪	۵/۲۹±۰/۲۱۴	۴/۵۲±۰/۲۱۱	**۳/۰۹±۰/۲۲۱	*۴/۴۶±۰/۲۳۳

مقادیرp مقایسه شده با گروه شاهد (بدون آنتی‌اکسیدان، جیوه و نیکوتین): p<۰/۰۱ **و p<۰/۰۵ *.

هر داده نشانگر M±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر کدام با سه مرتبه تکرار) است.

۳۳/۷۱٪ و ۲۷/۶۹٪ بود. در این قسمت میزان کاهش GSH توسط نیکوتین در حد فاصل کاهش ایجاد شده توسط دو غلظت متفاوت از جیوه قرار داشت. در بررسی نتایج مندرج در جدول شمارهٔ ۲ نیز مشخص گردید که کاربرد آلبومین در نمونه‌های اسپرمی تیمار شده با غلظت ۱۲۰۰ *µM* جیوه، میزان کاهش غلظت GSH محیط تشدید شد (۱۲/۲۲٪) (جدول شمارهٔ ۲).

در جدول شمارهٔ ۳، نتایج تاثیر جیوه و نیکوتین بر میزان قدرت تحرک اسپرم گاو در محدوده زمانی ۱۲۰-۰ دقیقه به نمایش درآمده است. بر اساس این داده‌ها مشخص گردید که پس از طی زمان ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون، کاهش معنی‌داری در قدرت تحرک اسپرم‌های گروه شاهد به میزان ۱۰/۳۵٪ (p<۰/۰۱) پدیدار شد و این میزان کاهش در تیمارهای جیوه و

جدول ۳-نشان دهنده اثر کلرید جیوه (۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار) و نیکوتین (۰/۷۵ میلی مولار) بر درصد سلول‌های متحرک اسپرم گاو با یا بدون حضور منگنز و آلبومین

درصد اسپرم های متحرک / گروه تیمار	زمان انکوباسیون (دقیقه) M±SD			
	۰	۳۰	۹۰	۱۲۰
بدون آنتی اکسیدان، جیوه و نیکوتین	۸۷±۰/۹	۸۵±۱/۳	* ۸۱±۱/۵	** ۷۸±۱
کلرید جیوه ۶۰۰ *µM*	۸۷ ±۱/۳	۸۴±۱/۴	* ۸۰±۱/۹	** ۷۶±۰/۹
کلرید جیوه ۶۰۰ *µM* +Mn	۸۷±۰/۹	۸۶±۱/۵	۸۳±۲	* ۷۹±۱/۹
کلرید جیوه ۶۰۰ *µM* +BSA	۸۷±۱/۹	۸۵±۲/۲	* ۷۹±۳	** ۷۸±۱/۷
کلرید جیوه ۱۲۰۰ *µM*	۸۶ ± ۳	* ۸۱±۲/۱	* ۷۹±۱/۹	** ۷۳ ±۲
کلرید جیوه ۱۲۰۰ *µM* +Mn	۸۶±۲	۸۴±۱/۳	* ۸۱±۳/۱	** ۷۵±۱/۹
کلرید جیوه ۱۲۰۰ *µM* +BSA	۸۶±۳	* ۸۲±۲/۲	** ۷۵±۱/۷	*** ۷۱±۲
نیکوتین ۰/۷۵ *mM*	۸۷ ± ۲	* ۸۲±۱/۶	* ۷۹±۳	** ۷۵±۲/۸
نیکوتین ۰/۷۵ mM +Mn	۸۷ ± ۲	۸۵±۳	* ۸۱±۲/۴	** ۷۶±۲
نیکوتین ۰/۷۵ mM +BSA	۸۷ ± ۱/۹	۸۶±۱/۴	* ۸۲±۳	۷۹±۴

مقادیرpمقایسه‌شده با گروه شاهد(بدون آنتی‌اکسیدان،جیوه ونیکوتین، در زمان صفر انکوباسیون): p<۰/۰۰۱ ***، p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۵ *

هر داده نشانگر Mean±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر کدام با سه مرتبه تکرار) است.

جدول ۴- نشان دهنده اثر جیوه (Hg) و نیکوتین بر درصد واکنش‌های آکروزومی (درصد هاله ها) سلول های اسپرم گاو با یا بدون منگنز (Mn) و آلبومین (BSA)

گروهها / آنتی‌اکسیدانها	درصد هاله‌ها (% Halos)			
	شاهد	کلرید جیوه ۶۰۰ μM	کلرید جیوه ۱۲۰۰ μM	نیکوتین ۰/۷۵ mM
بدون آنتی اکسیدان	۹۱±۱/۹	**۸۵±۱/۸	۸۱±۲	**۸۳±۱/۷
منگنز ۰/۱ mM	۹۱±۱/۷	۸۸±۱/۹	****۸۶±۱/۵	****۸۸±۱/۹
BSA ۱٪	۹۲±۱/۵	**۸٤±۲	***۷۸±۱/٦	*۸٦±۱/۳

مقادیرp مقایسه شده با گروه شاهد (بدون جیوه، نیکوتین و آنتی اکسیدان): ۰۰۱ / ۰>p*** ، ۰۱/ ۰>p **، ۰۵/ ۰>p *

مقایسه شده با گروه تیمار جیوه یا نیکوتین مربوطه: ۰۵/ ۰>p ****

هر داده نشانگر Mean±SD مربوط به سه مشاهده مستقل (هر کدام با سه مرتبه تکرار) است.

نیکوتین نیز تداوم یافته و بیشتر گردید. در این مجموعه از آزمایشها، منگنز در مقایسه با آلبومین از توان آنتی‌اکسیدانی بهتری در جهت افزایش میزان قدرت تحرک اسپرمها در گروه‌های تیماری و نیز شاهد برخوردار بود. مشابه با موارد قبلی، در این قسمت نیز کاربرد آلبومین در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۱۲۰۰ μM از جیوه نتایج معکوس به دنبال داشت و منجر به کاهش بیشتر (در ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از شروع انکوباسیون) قدرت تحرک اسپرمها گردید.

در آزمایش سنجش میزان فعالیت آکروزومی اسپرم‌های گاو در شرایط مختلف مشخص گردید که تیمارهای جیوه (۶۰۰μM و۱۲۰۰μm) و نیکوتین (۰/۷۵mM) موجب کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های واجد واکنش آکروزومی گردیدند (جدول شمارهٔ ٤). این میزان کاهش در تیمار با جیوه ۱۲۰۰μM بیشتر از سایر تیمارها بود (۱۰/۹۸٪، ۰۰۱/۰>p). منگنز از قدرت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به آلبومین برخوردار بود. در این قسمت نیز آلبومین رفتار بیوشیمیایی مشابه‌ای را ارائه داد و در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۱۲۰۰ μM از جیوه، موجب کاهش بیشتری در تعداد اسپرم‌های با آکروزوم تخلیه شده، گردید (جدول شمارهٔ ٤).

بحث

پژوهش‌های اخیر نشان داده است که اثرات منفی ROS وLPO بر ساختار اسپرم، به عنوان یک عامل مهم در بروز ناباروری در انسان در نظر گرفته شده، و از میان آنها می‌توان به اختلالات وسیع غشاء، کاهش قدرت تحرک، اختلالات آکروزومی اسپرمها، که موجب تضعیف اتصال اسپرم به تخمک و انجام لقاح اشاره نمود (۱۸-۱٦، ٦،٤،۳،۱). از آن جایی که اسپرم طی اسپرماتوژنز حجم عمده‌ای از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد؛ لذا در مقایسه با سلول‌های سوماتیک از ذخیره و توان آنتی‌اکسیدانی کمتری برخوردار هستند و چنانچه پلاسمای سمینال (محیط بقاء زیست اسپرمها) که حاوی انواع زیادی از آنتی‌اکسیدان هاست، به نحوی از آنان جدا گردد شرایط بسیار خطرناک و نامطلوبی را برای این سلولها فراهم خواهد آورد که اولین پیامد آن هجوم ROS موجود در محیط به آنان خواهد بود (۱۸، ۱۷).

در پژوهش حاضر اثرات غلظت‌های ٦۰۰μM و ۱۲۰۰μM جیوه و ۰/۷۵mM نیکوتین بر روی اسپرم‌های گاو و میان کنش آن با ترکیبات منگنز و آلبومین مورد بررسی قرارگرفت.

جیوه یک یون فلزی بسیار فعال و لیپوفیل است به طوری که بخار آن به سرعت از راه ریه‌ها و مخاط

دهان جذب خون می‌شود. این عنصر پس از جذب در بدن از غشاء سلولها عبور می‌نماید ودر بافت‌های بدن انباشته می‌گردد(۱۹). گزارش‌های زیادی از اثرات سمی جیوه برعملکرد سلول‌های جانوری موجود است. جیوه موجب القاء تولید ROS درون سلول، آسیب به لوله‌های منی‌ساز بیضه، القاء و آپوپتوز در سلولها می‌شود (۲۳-۲۰). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که جیوه به صورت وابسته به زمان، قادر به القاء و پیشبرد معنی‌دار روند LPO در نمونه‌های اسپرم گاو است، که این اثر با افزایش غلظت MDA محیط به اثبات رسید.

در مورد مکانیسم و محل اثر جیوه در غشاء سلولها، در گزارشی عنوان شد که جیوه در بافت‌های کبدی و کلیوی موشها موجب گسترش روند LPO می‌شود و این اثر خود را از طریق پراکسیداسیون فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اتانول آمین موجود در غشاء این سلولها به انجام رسانیده که خود مؤید حساسیت زیاد این دو فسفولیپید نسبت به جیوه است (۲٤). همچنین براساس یافته‌های اخیر تحقیقات جیوه علاوه بر چسبیدن به گروه‌های سولفیدریلی (تیولی) پروتئینها، به مجموعه‌ای از نقاط ویژه در مجموعه‌های فسفولیپیدی غشاء سلولها نیز متصل شده و موجب کاهش سیالیت غشاء می‌شود (۲۵). در یکی از جدیدترین پژوهشها توسط Marchi و همکاران مشخص شد که جیوه از طریق فعال‌سازی فسفولیپاز A_2 موجود در غشاء لیزوزوم‌های سلولها موجب ناپایداری و تخریب ساختار غشاء این اندامک درون سلولی می‌شود (۲٦).

از سوی دیگر در سایر پژوهشها به تولید مستقیم ROS توسط تاثیر جیوه بر بافت‌های بدن جانوران اشاره دارد که موجب پیشبرد روند LPO در سلول‌های آنان می‌شود (۲۹-۲۷).

نتایج قبلی در مورد تاثیر یون‌های فلزی جیوه و مس بر سلول‌های آبشش ماهی کپور معمولی نیز نشان می‌دهد که جیوه به صورت وابسته به غلظت، موجب القاء پراکسیداسیون سلولی و افزایش تولید MDA در سوسپانسیون‌های سلولی می‌شود (۵). بر طبق یک قاعده کلی، یون‌های فلزی به کمک عمل واسطه‌ای خود قادر به تولید رادیکال پر قدرت $^{\cdot}OH$(به عنوان محرک اصلی شروع روند LPO) از دیگر انواع ROS بوده که با نام معادله هابر- ویس معروف است و به صورت زیر به انجام می‌رسد (۳۰):

$$^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{یون فلزی}} O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

از سویی دیگر، نیکوتین به عنوان ماده‌ای فعال در دود سیگار منجر به افزایش سطح ROS پلاسمای سیمن می‌شود، بدین ترتیب درجاتی از اختلال در قدرت باروری اسپرم را القاء می‌کند (۳۱). در پژوهش حاضر نیز پس از افزودن نیکوتین، میزان LPO محیط پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون به صورت معنی‌دار افزایش یافت که این موید افزایش میزان ROS در محیط حاوی اسپرم‌های گاو بود و منجر به بروز پراکسیداسیون گردید. در مطالعه‌ای روی سلول‌های پانکراس در انسان مشخص گردید که افزودن نیکوتین به محیط کشت این سلولها موجب افزایش میزان ROS محیط و به دنبال آن افزایش روند LPO می‌گردد (۳۲).

MDA نیز به عنوان یکی از محصولات نهایی روند LPO به راحتی با نفوذ به ساختار بیوشیمیایی غشاء سلولها موجب عدم تقارن در ساختار لیپیدی آن شده و به این ترتیب موجب کاهش سیالیت غشاء می‌شود. کاهش سیالیت غشاء موجب کاهش قدرت تحرک اسپرم و نیز عدم کارایی اسپرم اتصال به تخمک و عمل لقاح می‌گردد (۳۳).

GSH به عنوان تری‌پپتیدی مهم در درون انواع سلول‌های موجودات زنده با حداکثر غلظت $۱۰mM$ وجود دارد. با توجه به وجود گروه تیول در ساختار GSH و واکنش خنثی کنندگی این ترکیب با رادیکال‌های

آزاد محیط، در صورت بروز هرگونه اختلال در تولید و ذخیره GSH، شاهد گسترش هرچه بیشتر روند LPO خواهیم بود (۳٤). کاهش میزان GSH در تیمارهای مختلف با جیوه به اثبات رسیده است (۳۵). نتایج آزمایش‌های حاضر نشان داد که تیمارهای جیوه و نیکوتین موجب کاهش قابل ملاحظه و معنی‌داری در میزان GSH نمونه‌های اسپرم گاو گردید. طی مطالعه‌ای دیگر نیز مشخص گردید که GSH توسط میانکنش مستقیم با عناصر فلزی نظیر جیوه (اتصال یک یون جیوه به روش کوئووالانسی با دو مولکول GSH)، سبب خنثی‌سازی و سپس دور سازی آنان از محیط زیست سلولها شده و بدین ترتیب ضمن کاهش غلظت GSH سلول، از سمیت جیوه در درون سلولها نیز کاسته می‌شود (۳٦). از سوی دیگر با توجه به القاء LPO توسط جیوه و نیکوتین که به طور یقین از مسیر تولید ROS عبور نموده، کاهش میزان GSH محیط در ارتباط با اثر قوی آنتی‌اکسیدانی این ترکیب بوده که ضمن خنثی‌سازی ROS محیط، به گلوتاتیون اکسید شده تبدیل شده است.

قدرت تحرک پیشروندهٔ اسپرمها به عنوان عامل تعیین‌کننده و موثر در باروری افراد مطرح می‌شود و متضمن لقاح موفقیت‌آمیز خواهد بود. طی این پژوهش مشخص شد که تیمارهای جیوه و نیکوتین موجب کاهش درصد اسپرم‌های متحرک در محیط گردد و براساس نتایج قبلی قدرت تحرک اسپرمها به هنگام افزایش رادیکال‌های آزاد و محصولات میانی و یا نهایی روند LPO درمحیط آزمایش، به صورت معنی‌داری کاهش یافته و در واقع به دنبال اختلال در فرایندهای تبادل یونی غشاء وآنزیم‌های دخیل در آن، از میزان فعالیت و تحرک این سلولها کاسته می‌شود (۳۷). از سوی دیگر، انواع ROS موجب مهار آنزیم‌های درون سلولی نیز می‌گردد، بدین ترتیب اسپرمها از منابع آنزیمی دخیل در تأمین ATP مورد نیاز جهت قدرت تحرک محروم می‌گردند (۳،۱٦،۳۷،۳۸). تغییرات ناشی از پراکسیداسیون اجزاء غشاء اسپرمها منجر به کاهش فعالیت آنزیم Na^+/K^+-ATPase (به عنوان یک پمپ یونی دخیل در حرکت) و در نهایت افت شدید در قدرت تحرک این اسپرمها می‌شود (۳۸). در پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۰ نیز مشخص گردید که یون‌های فلزی سمی از طریق ایجاد اختلال در سازمان‌دهی اجزاء غشاء میتوکندری‌های اسپرم، باعث کاهش معنی‌داری در قدرت تحرک آنان می‌شوند (۳۹).

واکنش آکروزومی (آزاد شدن آنزیم‌های هیدرولیتیک از کیسه آکروزومی اسپرم) کامل و طبیعی جهت نفوذ اسپرم به درون لایه‌های محافظ تخمک و به دنبال آن عمل لقاح لازم و ضروری است. بر اساس نتایج پژوهش، تیمارهای جیوه و نیکوتین موجب کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های واجد واکنش آکروزومی گردیدند. بر اساس نتایج سایر پژوهشها، نقایص عملکردی ناشی از تاثیرROS وLPO بر اسپرمها موجب کاهش قدرت تحرک و انجام واکنش آکروزومی ناقص در آنان شده که نتیجه آن عدم موفقیت اسپرم در اتصال به تخمک و عمل لقاح است(۱۷).

براساس این نتایج می‌توان به بروز تغییرات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء اسپرمها اشاره نمود که منجر به ارائه یک واکنش آکروزومی غیرطبیعی شده است. از آن جایی که وجود یک غشاء سالم و طبیعی جهت انجام واکنش آکروزومی ضروری است، لذا هرگونه ایجاد آسیب در ساختار بیوشیمیایی غشاء، منجر به کاهش قدرت باروری اسپرمها و اختلال در روند باروری فرد خواهد شد. در پژوهش حاضر، منگنز به میزان بیشتری در جهت بهبود وضعیت غشاء اسپرمها و واکنش آکروزومی آنان در مقایسه با آلبومین عمل نمود.

کاربرد آنتی‌اکسیدانها به عنوان مواد دور کننده رادیکال‌های آزاد از محیط اطراف سلولها موجب

فروکش‌سازی روند LPO و دیگر اثرات منفی آنان شده و بدین ترتیب ساختار بیوشیمیایی سلولها و فیزیولوژی آنان محفوظ خواهند ماند. در پژوهش حاضرنیز مشخص گردید که کاربرد غلظت‌های مشخص از منگنز و آلبومین موجب کاهش و مهار روند LPO، افزایش میزان GSH در محیط، و ایجاد بهبود در قدرت تحرک اسپرمها می‌شود. در این میان منگنز به عنوان آنتی‌اکسیدان بهتر و با نتایج مطلوب‌تر نسبت به آلبومین عمل نمود.

نتیجه‌گیری

در بررسی به عمل آمده در پژوهش حاضر مشخص شد که آلبومین علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، واجد نوعی خاصیت پرواکسیدانی نیز می‌باشد. در خصوص توجیه این خاصیت آلبومین که در مواجهه با غلظت‌های زیاد از یون‌های فلزی از خود نشان می‌دهد، می‌توان عنوان کرد که گروه تیولی موجود در ساختار آلبومین موجب اوتواکسیداسیون یون‌های فلزی شده و این روند در نهایت موجب عرضه یون‌های سوپراکسید به محیط شده، که خود عامل تشدید کننده پراکسیداسیون سلولی خواهد بود. بنابراین کاربرد آنتی‌اکسیدانها به مثابه یک تیغ دو لبه است که در یک محدوده بسیار ظریف از تغییرات غلظت، ضمن تغییرماهیت، مبدل به عوامل خطرآفرین برای بسیاری از سلولها خواهند شد (۴۰).

تشکر و قدردانی

مؤلفین بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری سرکار خانم دکتر نها افتخاری (در آنالیز آماری) و از کمک‌های جناب آقای سید رسول صیدایی (در اجرای آزمایشها) کارشناس محترم آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه شهرکرد، اعلام می‌دارند.

References

1- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproducetion. Fertil Steril.2003;79:829-843.

۲- عربی مهران، راویندر آناند. تاثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپرمیک: تعدیل توسط آنتی‌اکسیدانها. فصلنامه باروری و ناباروری،سال سوم،شماره یازدهم، تابستان۱۳۸۱،صفحات۲۲-۱۱.

3- Arabi M., Sanyal S.N., Kanwar U., Anand, R.J.K. The Effect of antioxidants on nicotine and caffeine induced changes in human sperm-An in vitro Study. In: Male fertility and lipid metabolism. Editors. De Vriese S.R., ChristopheA.B.),Chapter16,Published by AOCS Press, USA.2003;pp:250-267.

4- Arabi M. Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia.2004;36(5):305-310.

5- Arabi M. Analysis of impact of metal ion contamination on Carp (Cyprinus carpio L). Biol Trace Elem Res. 2004;100(3):229-246.

6- Aitken R.J., Clarkson J.S., Fisher S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod.1989;40:183-197.

7- Iwasaki A., Gagnon A. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril.1992;57:409-416.

8- Agarwal A., Allamaneni S.S., Nallella K.P., George A. T., Mascha E. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. Fertil Steril.2005;84 (1):228-231.

9- Sikka S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci. 1996;1:78-86.

10- Depuydt C.E., Bosmans E., Zalata A., Schoonjans F., Comhaire F. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. J Androl.1996; 17:699-707.

11- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radical in biology and medicine. 2nd Edition, Published by Clarendon Press, Oxford.1989;pp:372-390.

12- Kankofer M., Kolm G., Aurich J., Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and peroxidation intensity in stallion semen

27-NathK.A.,Croatt A.J.,LikelyS.,Behrens T.W., Warden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. Kidney Int.1996;50:1032-1043.

28- Ariza M.E., Bijur G.N., Williams M.V. Lead and mercury metagenesis: Role of H2O2, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. Environ Mol Mutagen.1998;31: 352-361.

29- Halliwel B., Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 1984;219:1-14.

30-Cope G.F. The in vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. Hum Reprod.1998;13:777-778.

31- Wetscher G.J., Bagchi M., Bagchi D., Perdikis G., HinderP.R.,GlaserK.,Hinder R. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. Free Radic Biol Med.1995;18:877-882.

32- Yuli I., Wilbrandt W., Shinitzky M. Glucose transport through cell membrane of modified lipid fluidity. Biochemistry.1981;20:4250-4257.

33- Meister A., Anderson M.E. Glutathione. Ann Rev Biochem.1983;52:711-760.

34- Elia A.C., Galarini R., Taticchi M.I., Dorr A.J., Mantilacci L. Antioxidant responses and bioaccumulation in Ictalurus melas under mercury exposure. Ecotoxicol Environ Saf.2003;55:162-167.

35- Hultberg B., Anderson A., Isaksson A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. Toxicology.2001;156: 93-100.

36- Lissak A., Wiener-Megnazi Z., Reznick A.Z., Shnizer S., Ishai D., Grach B., Lahav-Baratz S., Shiloh H., Koifman M., Dirnfeld M. Oxidative stress indices in seminal plasma, as measured by the thermocheminesce-nce assay, correlate with sperm parameters. Fertil Steril. 2004;81(suppl.1):792-797.

37- Bilodeau J.F., Blanchette S., Cormier N., Sirard M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyrunate, metal chelators and bovine liver or oviduvtal fluid catalase. Theriogenology.2002;57(3):1105-1122.

38- Woo A.L., James P.F., Lingrel J.B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K-ATPase. J Biol Chem.2000;275:20693-20699.

39- Au D.W., Chiang M.W., Wu R.S. Effects of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. Arch Environ Cont Toxicol. 2000;38(4):455-463.

40-Tien M., Bucher J.R., Aust S.D. Thiol-dependent lipid peroxidation. Biochem. Biophys Res Commun.1982; 107(1):279-285.

during storage at 5 degrees C. Theriogenology.2005; 63(5):1354-1365.

13- Aitken R.J., Harkiss D., Bukingham D. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. J Reprod Fertil.1993;98:257-265.

14- Fiscor G., Ginsberg L.C., Oldford G.M., Snoke R.E., Becker R.W. Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. Fertil Steril. 1983;30:543-552.

15- Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and non- protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968;25:192-205.

16- Verma A., Kanwar K.C. Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. Andrologia.1998;23:325-29.

17- Sharma R.K., Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. J Urol.1996;48:835-850.

18- Crinnion W.J. Environmental medicine, part three, Long-term effects of chronic low dose mercury exposure. Altern Rev Med.2000;5:209-223.

19- Schurz F., Sabater-Vilar M., Fink-Gremmels J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role metal-binding proteins. Mutagenesis. 2000;15(6):525-530.

20- Rao M.V., Sharma P.S. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. Reprod Toxicol.2001;15:705-712.

21- Araragi S., Kondoh M., Kawase M., Saito S., Higashimoto M., Sato M. Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. Toxicology.2003;184:1-9.

22-SenerG., Sehirli A.O., Ayanoglu-Dulger G. Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. Pharmacol Toxicol. 2003;93:290-296.

23- Shinada M., Takizawa Y., Muto H. Effect of mercuric chloride on phospholipid peroxidation in rat. Nippon Koshu Eisei Zasshi.1990;37(12): 1010-1014.

24- Delnomdedieu M., Allis J.W. Interaction of inorganic mercury salts with model and red cell membrane: importance of lipid-binding sites. Chem Biol Interact. 1993; 88:71-87.

25- Marchi B., Burlando B., Moore M.N., Viarengo A. Mercury and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on $[Ca2+]_i$ dependent phosphorlipase A2activation. Aquat Toxicol.2004;66:197-204.

26- Lund B.A., Miler D.M., Woods J.S. Mercury-induced H2O2 formation and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria.Biochem Pharmacol.1991;42:181-187.