Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

اثر کورکومین بر تمامیت غشا و شاخص‌های استرس اکسیداتیو بیضه و سرم موش‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید

شیما چهرئی .Ph.D[1*]، حمیدرضا مومنی .Ph.D[2]، زهرا اتابکی .M.Sc[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی اراک، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران
۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Sh-chehreii@iau-arak.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

چکیده

هدف: پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تاثیر کورکومین بر تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم و بیضه موش‌های نر تیمارشده با کادمیوم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ موش نر بالغ نژاد NMRI به چهار گروه دسته‌بندی شدند: ۱- کنترل، ۲- کادمیوم کلراید (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ۳- کورکومین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ۴- کورکومین + کادمیوم کلراید.
تیمارها به‌صورت تک‌دوز انجام شد و پس از ۲۴ ساعت اسپرم‌های اپی‌دیدیمی گروه‌های مختلف جهت بررسی تمامیت غشا مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این میزان مالون دی‌آلوئید (MDA) و همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه شده با تست توکی انجام و تفاوت میانگین‌ها در حد معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

نتایج: در این پژوهش کادمیوم کلراید باعث کاهش معنی‌دار تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. علاوه بر این کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار MDA سرم و بیضه و کاهش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه نسبت به گروه کنترل شد. در گروه کورکومین + کادمیوم کلراید، کورکومین توانست به‌طور معنی‌داری اثرات مخرب کادمیوم را بر روی این پارامترها در مقایسه با گروه کادمیوم جبران کند.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قادر است اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر روی تمامیت غشا اسپرم، پراکسیداسیون لیپید و قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: تمامیت غشا اسپرم، قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل، کادمیوم، کورکومین، مالون دی‌آلدئید

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه آلاینده‌های زیست‌محیطی، ضمن آلوده‌سازی محیط‌زیست وارد چرخه غذایی شده، آب‌ها را آلوده نموده و به‌طور مستقیم سلامت انسان‌ها را مورد تهدید قرار داده‌اند و ضمن شیوع بیماری‌های مختلف، موجب سرطان و حتی منجر به مرگ شده‌اند (۱). در عین حال در اکثر مناطق پر جمعیت، خصوصا کشورهای صنعتی، منشا اصلی آلاینده‌ها فعالیت‌های انسانی می‌باشد. این فعالیت‌ها رابطه نزدیکی با الگوهای مناسب زندگی داشته و محدود کردن آن‌ها تا حدی موجب تنزل کیفیت زندگی می‌شود. از جمله این آلاینده‌ها کادمیوم می‌باشد. از منابع طبیعی حاوی کادمیوم می‌توان به فعالیت‌های آتشفشانی، آتش‌سوزی در جنگل و انتقال ذرات خاک حاوی کادمیوم توسط باد اشاره کرد. همه این عوامل باعث افزایش میزان کادمیوم در چرخه اکولوژیکی می‌شوند (۲). تماس انسان با این آلاینده از راه‌های مختلف صورت می‌گیرد. از مهم‌ترین آن‌ها مواد غذایی مانند برنج، گندم و آب آشامیدنی است. بعضی ماهی‌ها مانند ماهی تن و صدف خوراکی می‌توانند مقادیر زیادی کادمیوم در خود ذخیره کنند (۳). از دیگر منابع حاوی کادمیوم کودهای فسفاته می‌باشد (۱). سیگار هم‌چنین یکی دیگر از منابع حاوی کادمیوم است (۴). بنابراین کادمیوم از جمله آلاینده‌های زیست محیطی است که در بافت‌های مختلف بدن انسان تجمع یافته و موجب بروز اختلال در سیستم‌های مختلف از جمله بینایی، کبد، ریه، سیستم عصبی مرکزی، سیستم کلیوی و ... می‌شود (۸، ۷، ۶، ۵). مشخص شده است که کادمیوم قادر است اثرات مخربی بر دستگاه تولید مثل ایجاد کند و منجر به ناباروری شود. از جمله کادمیوم سبب کاهش سطح تستوسترون، کاهش تعداد اسپرم و قابلیت تحرک اسپرم، کاهش وزن بیضه و اپی‌دیدیم و افزایش اسپرم‌های مرده و ناهنجار می‌شود (۹). کادمیوم از طریق آسیب میتوکندریایی موجب افزایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر Reactive oxygen species (ROS) و در نتیجه عدم توازن بین رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی طبیعی شده و باعث تولید استرس اکسیداتیو می‌شود. تجمع ROS با کاهش تعداد اسپرم و کاهش تحرک اسپرم ارتباط مستقیم دارد (۱۰). کادمیوم از طریق کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش پراکسیداسیون لیپید، کربوکسیلاسیون پروتئین منجر به القای استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۲، ۱۱) و از این طریق سبب تغییر در بافت بیضه می‌گردد (۱۵، ۱۴، ۱۳). تمامیت غشا پلاسمایی و صلاحیت عملکردی آن برای متابولیسم اسپرم، ظرفیت‌یابی، اتصال به تخمک، واکنش آکروزومی و در نهایت نفوذ به تخمک ضروری است. از این‌رو ارزیابی غشای پلاسمایی می‌تواند برای پیش‌بینی توانایی باروری اسپرم مفید باشد (۱۶). با توجه به اینکه کادمیوم اثرات خود را از طریق القای استرس اکسیداتیو اعمال می‌کند، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌خصوص نوع گیاهی آن می‌تواند راهکار مناسبی برای جبران اثرات سمی کادمیوم باشد. کورکومین ترکیب اصلی و فعال زردچوبه (۱۷) رنگدانه فنولیک زرد رنگی است که طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی و فارماکولوژیک دارد (۱۹، ۱۸). مهم‌ترین اثرات بیولوژیک آن اثرات ضد التهابی و ضد - توموری و آنتی‌اکسیدانتی است (۲۲، ۲۱، ۲۰). مطالعات زیادی در رابطه با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی کورکومین و نقش آن در حفاظت از سیستم تولید مثلی در برابر آلاینده‌های محیطی انجام شده است (۲۵، ۲۴، ۲۳). بنابراین کورکومین ممکن است یک آنتی‌اکسیدانت قوی جهت جلوگیری از ناهنجاری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو کادمیوم‌کلراید و رادیکال‌های آزاد شده در بیضه و سرم باشد. به‌همین دلیل این پژوهش با هدف بررسی اثر کورکومین بر ارزیابی تمامیت غشا پلاسمایی اسپرم و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم و بافت بیضه در موش‌های تیمارشده با کادمیوم‌کلراید انجام شده است.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی و تیمار حیوانات: در این مطالعه تجربی از ۲۴ رأس موش نر بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی ۵ ± ۳۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند و در خانه حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگه‌داری می‌شدند، استفاده شد. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. موش‌ها به ۴ گروه (n=6 در هر گروه) کنترل، کادمیوم‌کلراید (۵ میلی‌گرم بر

www.SID.ir

Archive of SID

کیلوگرم، شرکت سیگما آمریکا) کورکومین (۱۰۰ میلی-گرم برکیلوگرم، شرکت سیگما آمریکا) و کورکومین+ کادمیوم‌کلراید تقسیم شدند. تیمار موش‌ها با کورومین به‌روش تزریق داخل صفاقی و کادمیوم‌کلراید به‌روش تزریق زیرجلدی و هرکدام به‌صورت تک‌دوز صورت گرفت (۱۵). کورکومین ۲۴ ساعت قبل از تجویز کادمیوم کلراید به موش‌ها تزریق شد. از آب مقطر به‌عنوان حلال کادمیوم و از دی‌متیل سولفوکسید Dimethyl Sulfoxide = DMSO به‌عنوان حلال کورکومین استفاده شد. از آن‌جا که تفاوت معناداری بین نتایج گروه‌های کنترل مشاهده نشد، داده‌های گروه آب مقطر به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از تیمار با کادمیوم‌کلراید، حیوانات توسط اتر کاملا بی‌هوش شدند. بلافاصله خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام و از نمونه‌های خونی سرم تهیه شد. سرم‌ها در ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شدند. هم‌چنین طی جراحی، بیضه چپ جهت اندازه‌گیری شاخص‌های پراکسیداسیون‌لیپید از بدن خارج شد.

به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون‌لیپیدی و هم‌چنین قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل در سرم و بافت بیضه به ترتیب از سنجش مالون‌دی آلدئید و قدرت آنتی‌اکسیدانی/ احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی FRAP استفاده شد (۲۸، ۲۷، ۲۶).

ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی هم‌زمان هوخست ۳۳۳۴۲ و پروپیدیوم آیوداید: به هر یک از سوسپانسیون اسپرم گروه‌های چهارگانه، ۲/۵ میکرولیتر محلول رنگ هوخست (سیگما) اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از محلول رنگ پروپیدیوم آیوداید (سیگما) به سوسپانسیون اسپرم اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. بعد ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی لام گرم منتقل و لام توسط لامل پوشانده شد و توسط میکروسکوپ فلورسانس (Olympus,DP71,Japan) مجهز به دوربین با فیلتر مناسب و بزرگنمایی x ۱۰۰۰ به‌همراه روغن ایمرسیون، در ۵ میدان دید مختلف حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. هسته اسپرم‌های مرده توسط رنگ پریپیدیوم آیوداید قرمز رنگ شدند ولی هسته اسپرم‌های زنده توسط هوخست آبی شدند (۲۹).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید سرم: ابتدا یک محلول تیو باربیتوریک اسید (TBA, 375 w/7,E.Merk) تهیه شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم با ۶۰۰ میکرولیتر از محلول TBA مخلوط شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری جوش ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از بن‌ماری، به‌سرعت با استفاده از آب سرد خنک شده تا واکنش تشکیل رنگ تثبیت گردد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور 1000 rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی به دقت جدا شد و جذب نوری آن در ۵۳۵ نانومتر Blank که حاوی تمام ترکیبات به‌جز نمونه بود به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر T8ouv/vis Spectrometer pg (Instruments Ltd) خوانده شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی آن که عبارت است از: $1/56X10^5M^{-1}\,CM^{-1}$ محاسبه گردید و بر حسب nmol/ml بیان شد (۲۷).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون‌لیپید بافت بیضه: نمونه بافتی (۰/۱ گرم) در محلول kCl به نسبت ۱ به ۹ هموژنیزه شد. یک حجم از نمونه هموژنیزه شده با دو حجم از محلول تیوباربیتوریک‌اسید ترکیب شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و بعد از خنک شدن (به‌منظور تثبیت تشکیل رنگ) با دور 1000g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لایه فوقانی شفاف به آرامی برداشته شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با کمک دسنگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی $1/56X10^5M^{-1}\,CM^{-1}$ بر حسب مولار محاسبه و MDA بر حسب nmol/gr بافت بیان شد (۳۰).

اندازه‌گیری میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بافت بیضه به‌روش احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی FRAP: این روش بر اساس توانایی سرم یا عصاره بافتی در احیا یون‌های Fe^{3+} (فریک) به Fe^{2+} (فرو) در حضور ماده‌ای به نام TPTZ استوار است. اندازه‌گیری FRAP به‌عنوان یک تست مستقیم برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل در نظر گرفته می‌شود به‌همین منظور منحنی استاندارد سولفات آهن رسم شد و سپس فرمول

www.SID.ir

Archive of SID

رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد به‌دست آمد که برای سنجش FRAP سرم و بافت بیضه گروه‌های مختلف استفاده شد.

FRAP سرم: بعد از تهیه معرف FRAP، ۱۰۰ میکرولیتر سرم به‌علاوه ۱۰۰ میکرولیتر محلول استاندارد سولفات آهن در کووت‌ها ریخته سپس مقدار ۱۸۰۰ میکرولیتر از معرف FRAP به کووت‌ها اضافه و پس از ۴ دقیقه جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد و سپس با استفاده از معادله رگرسیون حاصل در منحنی استاندارد میزان FRAP سرم محاسبه و بر حسب nmol/l بیان شد.

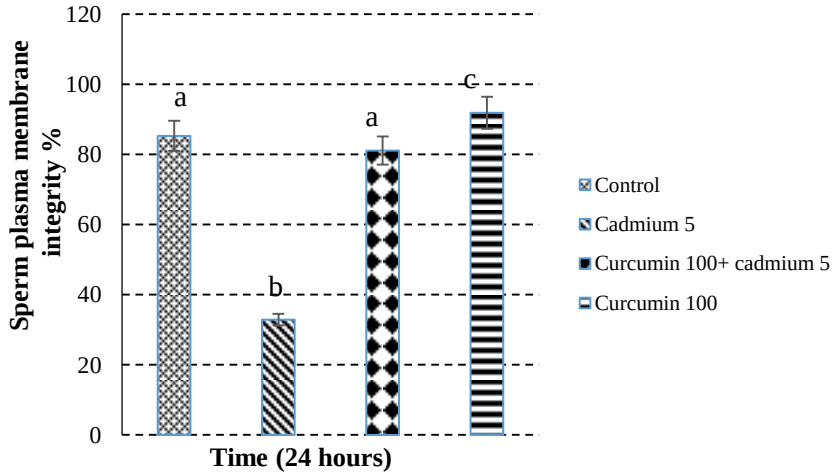
FRAP بافت: ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بافتی در کووت ریخته و سپس مقدار ml ۳ از معرف آماده FRAP به کووت‌ها اضافه و پس از ۴ دقیقه جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد سپس با استفاده از معادله رگرسیون حاصل در منحنی استاندارد میزان FRAP نمونه‌های بافتی بر حسب nmol/gr به‌دست آمد.

آنالیز آماری

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شد. داده‌ها به‌روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی (Turkey's Test) استفاده شد. $p<۰/۰۵$ به‌عنوان مرز معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

درصد تمامیت غشا پلاسمایی اسپرم در گروه تیمار شده با کادمیوم‌کلراید (۵ mg/kg به‌مدت ۲۴ ساعت) نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کاهش یافت. کاربرد مشترک کورکومین (۱۰۰mg/kg) و کادمیوم-کلراید (۵ mg/kg) توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) تا حد گروه کنترل جبران کند. کاربرد کورکومین به‌مدت ۲۴ ساعت موجب افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) درصد تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کنترل شد (نمودار ۱) (شکل ۱).

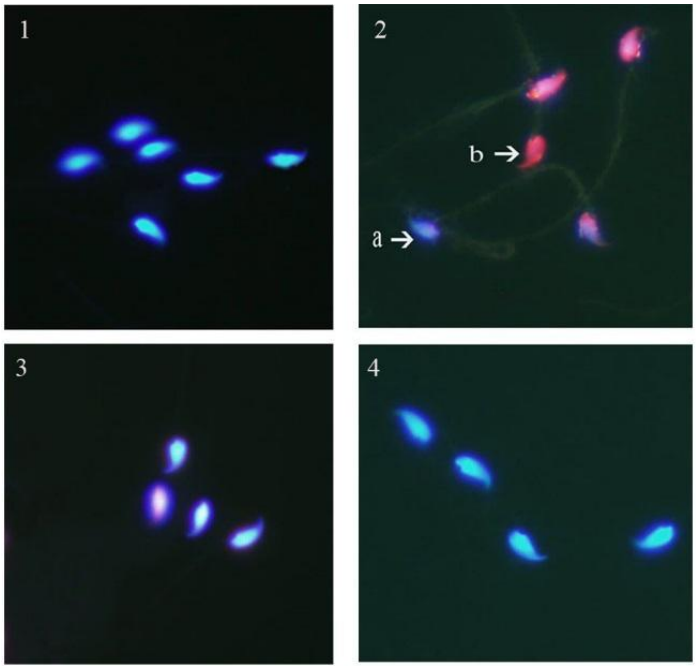


نمودار ۱: ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم موش در گروه تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید.

گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید: ۵mg/kg، کورکومین: ۱۰۰mg/kg، مدت تیمار: ۲٤ ساعت. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، n=٦ برای هر گروه $p<۰/۰۵$). مقادیر تیمارها به‌صورت mg/kg می‌باشند.

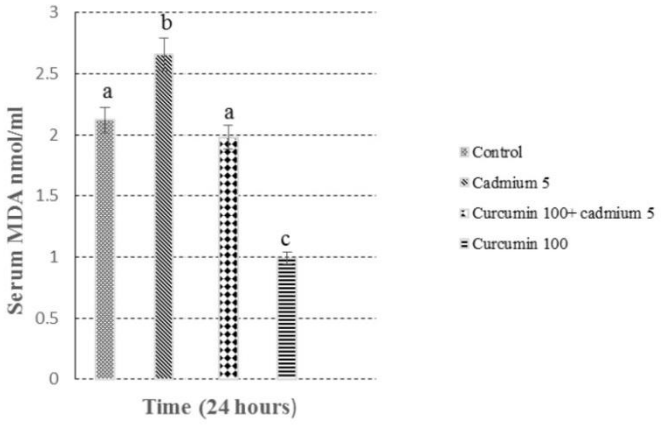
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید.۱) اسپرم‌های گروه کنترل ۲) اسپرم‌های گروه کادمیوم کلراید (۵mg/kg) ۳) اسپرم‌های گروه کورکومین (۱۰۰ mg/kg) + کادمیوم کلراید (۵mg/kg) ٤) اسپرم‌های گروه کورکومین (۱۰۰ mg/kg). a- اسپرم زنده با غشای پلاسمایی سالم، فقط رنگ هوخست را جذب کرده و هسته آبی شده b- اسپرم مرده با غشای پلاسمایی آسیب دیده، علاوه بر هوخست رنگ پروپیدیوم آیوداید را نیز جذب کرده، در نتیجه هسته قرمز شده است. بزرگنمایی×۱۰۰۰

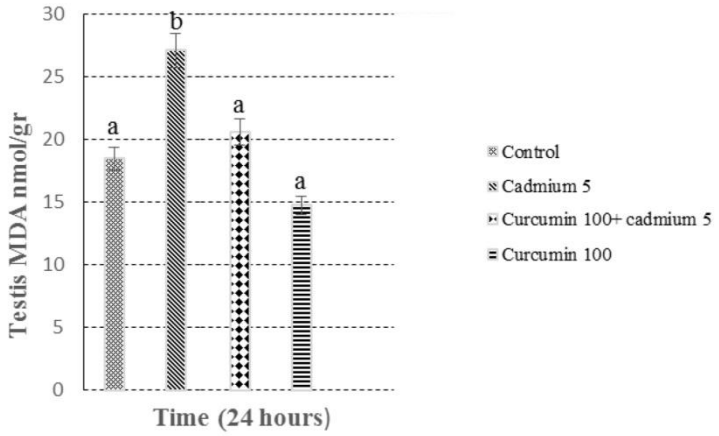
میزان MDA سرم و بافت بیضه در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید با غلظت ۵ mg/kg نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی داری ($p<۰/۰۰۱$) افزایش یافت (نمودار ۳ و ۲).



نمودار ۲: ارزیابی پراکسیداسیون لیپید سرم موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط سنجش مالون دی آلدئید (MDA). گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید ۵ mg/kg، کورکومین: ۱۰۰ mg/kg، کاربرد مشترک کورکومین ۱۰۰ mg/kg+ کادمیوم کلراید ۵ mg/kg. مدت تیمار ٢٤ ساعت. مقادیر به‌صورت میانگین I انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n =٦ برای هر گروه ($p<۰/۰۵$). مقادیر تیمارها به‌صورت mg/kg می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳: ارزیابی پراکسیداسیون لیپید بافت بیضه موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط سنجش مالون دی آلدئید (MDA).

گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید ۵ mg/kg، کورکومین ۱۰۰ mg/kg، کاربرد مشترک کادمیوم کلراید ۵ mg/kg+ کورکومین ۱۰۰ mg/kg- مدت تیمار ۲٤ ساعت. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ٦ برای هر گروه p< ۰/۰۵) مقادیر تیمارها به‌صورت mg/kg می‌باشند.

کاربرد مشترک کورکومین (۱۰۰ mg/kg) و کادمیوم (5mg/kg) به‌طور معنی‌داری میزان MDA سرم (p<۰/۰۰۱) بیضه (p<۰/۰۱) را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم‌کلراید تقریبا تا حد گروه کنترل جبران کرد (نمودار ۳ و ۲).

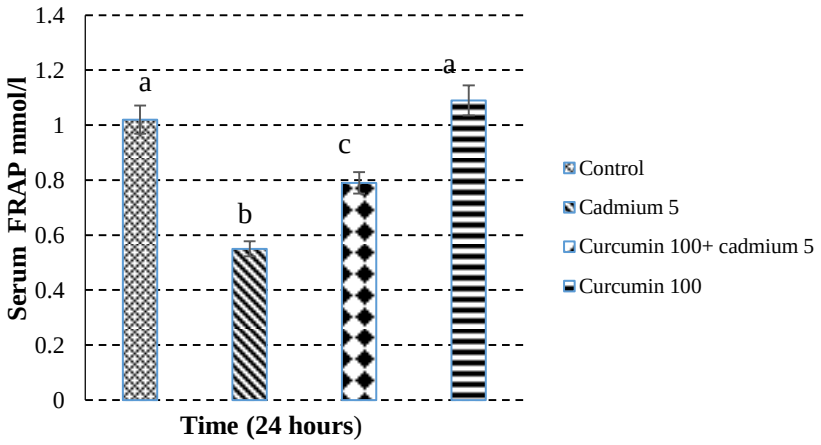
همان‌طور که در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است در گروه تیمار شده با کورکومین (۱۰۰ mg/kg) به‌تنهایی به‌مدت ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) در میزان MDA سرم نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (نمودار ۲) و هم‌چنین موجب کاهش میزان MDA بیضه نسبت به گروه کنترل گردید اما تفاوت معنی‌دار نبود (نمودار ۳).

میزان قدرت آنتی اکسیدانتی کل سرم و کل بیضه در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۵ mg/kg به‌مدت ۲۴ ساعت) نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) کاهش یافت. کاربرد مشترک کورکومین (۱۰۰ mg/kg)+کادمیوم کلراید (۵ mg/kg) به‌طور معنی‌داری توانست میزان قدرت آنتی اکسیدانتی کل سرم (p<۰/۰۵) و کل بیضه (p<۰/۰۰۱) را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید به‌طور معنی‌داری تا حد گروه کنترل جبران کند.

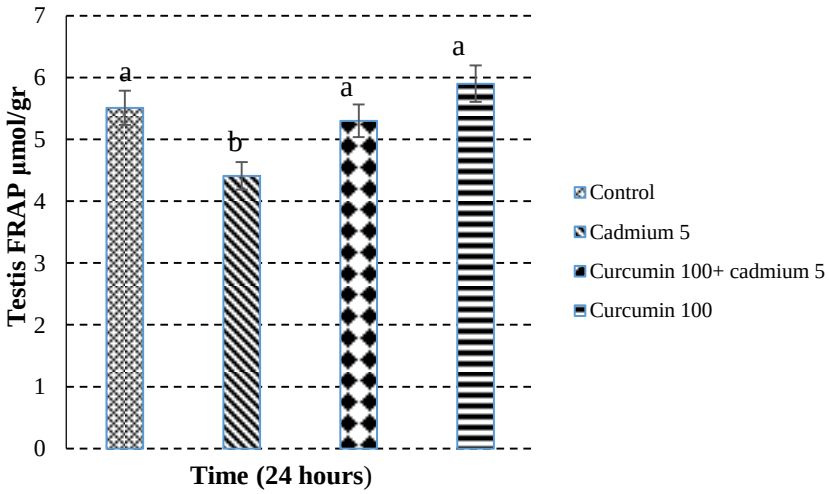
کاربرد کورکومین به‌تنهایی به‌مدت ۲۴ ساعت موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه نسبت به گروه کنترل گردید. اما تفاوت معنی‌دار نبود (نمودار ۴ و ۵).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ٤: ارزیابی میزان قدرت آنتی اکسیدانتی کل سرم موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید به‌روش FRAP.
گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید: ٥mg/kg، کورکومین: ١٠٠mg/kg، مدت تیمار: ٢٤ ساعت. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدگیر می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n=٦ برای هر گروه p<٠/٠٥). مقادیر تیمارها به‌صورت mg/kg می‌باشند.



نمودار ٥: ارزیابی میزان قدرت آنتی اکسیدانتی کل بیضه موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید به‌روش FRAP.
گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید ٥mg/kg، کورکومین: ١٠٠mg/kg، مدت تیمار: ٢٤ ساعت. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n=٦ برای هر گروه P<٠/٠٥). مقادیر تیمارها به‌صورت mg/kg می‌باشند.

بحث

تمامیت غشا پلاسمایی و صلاحیت عملکردی آن برای پیش‌بینی توانایی باروری اسپرم مفید است (١٨).

تست‌های ارزیابی غشای پلاسمایی اسپرم متعددند که اخیرا استفاده از رنگ‌های حیاتی فلورسنت توسعه یافته است از جمله استفاده همزمان از پروپیدیوم آیوداید و هوخست ٣٣٣٤٥. پروپیدیوم آیوداید یک رنگ فلورسنت

www.SID.ir

Archive of SID

قرمز مخصوص DNA است که قادر به نفوذ در غشای پلاسمایی سالم نیست و تنها از طریق غشای پلاسمایی آسیب‌دیده به اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، از این‌رو می‌تواند به‌صورت هم‌زمان با رنگ‌های فلورسنت قابل نفوذ به غشای پلاسمایی سالم از جمله رنگ فلورسنت هوخست که معرف اسپرم‌های زنده هستند برای تمایز هم‌زمان اسپرم‌های زنده از مرده استفاده شود.

نتایج نشان داد که درصد تمامیت غشا پلاسمایی اسپرم در گروه تیمار شده با کادمیوم‌کلراید نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های تیمار شده با کادمیوم با دوز ۵ mg/kg به‌مدت ۳۵، ۲۵ و ۱۵روز صورت گرفت، مشخص شد که افزایش پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم القا شده به‌وسیله کادمیوم باعث افزایش ناهنجاری‌های اسپرم‌ها و تغییر ویژگی‌های طبیعی غشا و هم‌چنین از دست رفتن باروری بالقوه اسپرم‌ها می‌شود (۳۱).

کادمیوم‌کلراید با القای استرس اکسیداتیو (۱۱) ممکن است سبب پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب به تمامیت غشا شود. اگرچه غلظت فیزیولوژیکی ROS برای بلوغ اسپرم، ظرفیت‌یابی و نفوذ به تخمک ضروری است (۳۲). اما غلظت بالای آن با توجه به حساسیت اسپرم سبب پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۳۳). میزان آسیب‌پذیری با ROS تحت تاثیر سیستم حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد و میزان مواد قابل پراکسیداسیون مثل اسیدهای چرب غیراشباع و غلظت اسید چرب قرار دارد (۳۵، ۳۴). کادمیوم با تولید نیتریک اکساید و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) از قبیل رادیکال‌های هیدروکسیل، رادیکال‌های آنیون سوپرا اکسید و هیدروژن پراکسید در نهایت باعث افزایش سطح پراکسیداسیون لیپید (MDA) در بیضه می‌شود. کادمیوم همچنین اثرات شدیدی بر روی فعالیت آنزیم‌ها دارد و موجب ایجاد اختلال در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌شود (۳۶).

از طرفی اسپرم بالغ دارای سیستم آنتی‌اکسیدانتی ضعیفی است که احتمالا به‌علت محدود بودن سیتوپلاستم آن است و از طرف دیگر اسیدهای چرب غیر اشباع ۴۵ درصد کل اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهد (۳۷). یکی از اسیدهای چرب غیر اشباع عمده decosahexanoic acid است که سوبسترای اصلی برای پراکسیداسیون لیپیدی است (۳۸). سمیت کادمیوم می‌تواند به‌وسیله واکنش با گروه تیول گلوتاتیون مدافع داخل سلولی بزرگ باعث استرس اکسیداتیو شود (۳۹). کادمیوم باعث از بین رفتن توانایی غشای پلاسمایی می‌شود (۱۱). همچنین اسپرم به‌دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع فراوان در سطح غشای پلاسمایی و به‌دلیل کمبود آنزیم‌های محافظتی در سیتوپلاسم، در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد (۴۰).

استرس اکسیداتیو باعث آسیب غشای پلاسمایی شده و احتمالاً در فعالیت اسپرم تاثیرگذار است (۴۱) و کادمیوم با القای استرس اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپید غشا می‌شود (۴۲).

نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های MDA و FRAP نشان داد که کادمیوم‌کلراید موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید و کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل می‌شود.

Abarikwu و همکاران (۴۳) نشان دادند که در رت‌های نر نژاد ویستار تحت تأثیر کورکومین با دوز ۱۰۰mg/kg برای چهار هفته، کورکومین تولید اسپرم، تعداد اسپرم، سطح تستوسترون پلاسما، سطح گلوتاتیون و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپرا اکسید دیسموتاز در بیضه رت را افزایش می‌دهد. همچنین کورکومین با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی روی بیان سیتوکین‌های التهابی اثر می‌گذارد.

هم‌چنین ما در این پژوهش نشان دادیم که کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی می‌تواند کاهش تمامیت غشا پلاسمایی را در گروه تیمار شده با کورکومین+ کادمیوم‌کلراید به‌طور معنی‌داری جبران کند. علاوه بر این کاربرد کورکومین به تنهایی موجب افزایش تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کنترل شد.

کورکومین با جلوگیری از تخلیه گلوتاتیون سلولی و حتی افزایش میزان آن و افزایش آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی درونی (۱۱) از جمله افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مانع پراکسیداسیون لیپیدی شده و از تولید ROS جلوگیری می‌کند (۳۳).

بنابراین کورکومین می‌تواند از تغییرات اکسیداتیو غشای اسپرم به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانتی ذاتی خود جلوگیری کند (۳۹). اثرات حفاظت سلولی کورکومین وابسته به خواص آنتی اکسیدانتی و حذف رادیکال‌های آزاد آن می‌باشد که سبب جلوگیری از هرگونه ناهنجاری در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت نرمال غشا

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود و بنابراین توانایی باروری حفظ می‌شود. نتایج MDA و FRAP اثر آنتی اکسیدانتی کورکومین را تایید کرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش به کارگیری کادمیوم کلراید موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید و همچنین کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل در سرم و بافت بیضه موش‌ها شد و کورکومین در گروه کورکومین+کادمیوم کلراید باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید و همچنین افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بافت بیضه نسبت به گروه کادمیوم کلراید شد. کادمیوم کلراید تمامیت غشا اسپرم موش را کاهش داد و کورکومین در گروه کورکومین+کادمیوم کلراید باعث جبران پارامتر مذکور گردید.

به نظر می‌رسد که کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قادر است اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر اکسیداسیون لیپید و قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه و تمامیت غشا اسپرم مهار نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اراک موضوع قرارداد شماره ۹۳/۲۸۰۵ مورخ ۱۳۹۳/۰۴/۰۲ انجام شده است که بدین‌وسیله از مسئولین مربوطه تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Bernard A. Cadmium and its adverse effects on human health. Indian J med res. 2008; 128: 557-64.

2. wiasberg M, joseph p, Hale B, Beyersmann D.Molecular and Cellular of Cadmium carcinogenesis. Toxicology. 2003; 192(2-3): 117-95.

3. Eck P.C, Wilson L. Cadmium toxicology. Alice-Phonix Arizona 85021 Usa, 2005.

4. Bhattacharyya mlt. cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanism and relationship to human exposures. Toxicology and applied pharmacology. 2009; 238: 258-265.

5. Gonic KH. C. Nephrotoxicity of cadmium and Lead. J Med Res. 2008; 128: 335-352.

6. Paniague-Costro M, Escalona-cafdoso C, Mmadrigal-Bujaide E, Martinez – Galaero E, et al. protection against cadmium-induced Teratogenicity in vitro by glycine. Toxical in Vitro. 2008; 22(5): 75-79.

7. Gulisano M, Pacini S, Punzi T, Morocci G, et al. Cadmium modulets proliferation and differentiation of human Neuroblast. J of neuroscience research. 2009; 87: 228-237.

8. Godt J, scheidig F, Grosse-fiestrup C, Esche v, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J occp med Toxical. 2006; 1: 22.

9. Momeni HR, Chehreii Sh, Atabaki Z, Eskandari N. Study of the effect of curcumin on sperm parameters dysfunction induced by cadmium in mice. Pajouhandeh. 2015; 20(2); 54-62.

10. Arabi M. Cadmium as an etiology of sperm dysfunction in Holstein bulls. Iranian journal of reterinary research. 2006; 7(3): 29-36.

11. Ognjanovie BI, markovic SD, Ethordevic NZ, Trbojevic Is, et al. Cadmium induced Lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q (10) and vitamin E. Reprod Toxicol. 2010; 29: 191-7.

12. Cristiano C, Spizzi, Vanusa Manfredini, Fabiana E, Barcellos da silva, Erico M.M, et al. Soares, Francielli W. Santos . y-oryzanol Protects Against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. Food and chemical Texicology. 2013; 55: 526-532.

13. Ong C.N, Shen H.M. Chia SE. Biomarkers for male productive health hazards: are they available. toxical let. 2002; 134(1-3): 17-30.

14. Prasenjit Manna, Mahua Sinha, paramesc, sil.Ccadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. Reproductive toxicology. 2008; 26(3-4): 282-291.

www.SID.ir

Archive of SID

rats. Food and chemical toxicology. 2012; 50: 3243-3250.

16. Brito L, Barth A, Bilodeau – Goeseels S, Panich P, et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rat. Theriogenology. 2003; 60(8): 1539-1551.

17. Yum SS, kim sp, kang my, Nam Sh. Inhibitory effect of curcumin on liver injury in a murine model of exdotoxemic shock. Biotechnol. 2010; 23: 209-14.

18. EL-wakf am, Elhabiby EM, El-Kholy wm, Abd El-Ghany E. Use of turmeric and curcumin to alleviate adverse reproductive outcomes of water nitrate pollution in male rats. Nat Sci. 2011; 9(7): 229-39.

19. Hbeyyo, ozbek E, cekmen M, simsek A, otunctemur A, somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin induced oxidative injury in rat testis: mitogen–activate protein kinase and nuclear factor-kappa B Signaling pathways. Hum reprod. 2009; 24(7): 1717-25.

20. Anand p, Thomas S, Kunnumakkara. Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. Biochemical pharmacology. 2008; 76(11): 1590-1611.

21. FAO, curcumin chemical and Technical assessmen F (CTA) First dra ft prepard by Ivan stankovic, chemical and Technical assessment. 2004.

22. Wen-Guang YU, Gang UX, Gui-Jie Ren, Xia XU, et al. Preventive action of curcumin in experimental acute pancreatitis in mouse. Indian j Med Res. 2011; 134: 717-24.

23. Aktas C, Kantar M, Erboga M, Ozturk S. Anti apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testes. Toxical Ind Health. 2012; 28(2): 122-30.

24. Momeni H.R, Eskandari N, effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. Iranian journal of Reproductive Medicine. 2012; 10.

25. Singh, preeti, Deora, Kanchan, Sankhla, Vandana, Mogra, Priya. curcumin rendered protection against cadmium chloride induced

15. Wenxiang wang, yan sun, jin Liu, Jieying wang, et al. Protective effect of theaflavin on cadmium-induced testicular toxicity in male testicular damage in swiss albino mice. Journal of cell and molecular biology. 2012; 10: 32-38.

26. Sanocka, kurpism, Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod Biology Endocrinal. 2004; 2: 12-19.

27. Turki, Ameen (M. B. Ch. B. C), Majeed Moayed, Naji. Measurment of serum malondialdehyde (MDA) levels as marker of Lipid peroxidation in neonatal sepsis. Thi-Qar Medical Journal (TQMJ). 2011; 5(2): 9-17.

28. Katalinica V, Modunb D, Musicb 1, Bohan M, Gender. differences in antioxidant capacity of rat tissues defermined by Z, ZV-azzinobis (3 ethylbenzothiazoline sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. Comparative Biochemistry and physiology, partc. 2005; 140(1): 47-52.

29. Sutradhar B.C, Park J, Hong G, Choi S.H, et al. Effects of trypsinization on viability of equine chondrocytes in cell culture. Pakistan veterinary journal. 2010; 30(4): 232-238.

30. Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Rafiei Alavi E, et al. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. Blank well verlag GmbH. Andrologia. 2009; 41: 335-340.

31. Ren XM, Wang GG, Xu Da, Luo K, et al. The Protection of Selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. Food and chemical toxicology. 2012; 50: 3221-3229.

32. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis ss. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian J Exp Biol. 2010; 48(5): 425-435.

33. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Sakine F, Atessahind A. Kulak size R, et al. The Effect of antioxidant on post-thawed angora goat (capra hircus ancryrensis) sperm parameters, Lipid peroxidation and antioxidant activates. Small Ruminant Res. 2010; 89: 24-30.

www.SID.ir

34. Ollero M, Gil Guzman E, Lopez Mc, Sharma Rk, et al.Ccharacterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum reprod. 2001; 16(9): 1912-21.

35. Bielski B.H, Arudi R.L, Sutherland M.W. A study of the reactivity of Ho2/O2 – with unsaturated fatty acids. Journal of biological chemistry. 1983; 258(8): 4759-4761.

36. Ognjanovic B, Markovic N, Trbojevic I. Cadmium–induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reproductive Toxicology. 2010; 29(2): 191-197.

37. castellanos P, Mateo R, Reglero NM, Esteso MC, et al. In vitro effects of lead on fatty acid composition, oxidative stress biomarkers and quality of ram spermatozoa toxicol environ chem. 2008; 90: 1163-75.

38. Jones R, Mann T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous Phospholipids. Journal of reproduction and fertility. 1977; 50: 261-268.

39. Salama AF, El-Bahr SM. Effect of curcumin on cadmium-induced oxidative testicular damage in rats. J Med Res Ins. 2007; 28(2): 167-73.

40. Zoran B, Vidmar G, Meden-vrtovec H.Sseminal reactive oxygen species as predictors of fertilization embryo quality pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intra cytoplasmic sperm injection. International journal of and rology. 2003; 26: 279-285.

41. Aitken RJ, De Iulis GN Sharma R.K, Alvarez JG, et al. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. Reprod Bjomed on line. 2007; 14: 727-33.

42. Hammadeh M.E, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, et al. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. Reproductive biomedicine online. 2006; 13: 696-706.

43. Sharma Pk. Physiology of male gametogenesis. Clinical reproductive medicine and surgery. 2007; 4: 73-83.

44. Abarikwu S, Akiri O, Durojaiye M, Alabi A. Combines administration of curcumin and gallic acid inhibits gallicacid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output antioxidant defenses and inflamentory responsive genes. Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2014; 143: 49-60.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2018; 9(1)

Original Article

Effect of curcumin on plasma membrane integrity and stress oxidative and serum in mice treated with cadmium chloride factors testis

Chehreii SH, Ph.D.1* , Momeni HR, Ph.D.[2] , Atabaki Z, M.Sc.[2]

1. Department of biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
2. Department of Biology, Faculty of science, Arak University, Arak, Iran

* Email corresponding author: Sh-chehreii@iau-arak.ac.ir

Received: 28 Aug. 2017 Accepted: 25 Feb. 2018

Abstract

Aim: The current research was done to investigate the sperm plasma membrane integrity, oxidative stress factors of sperm and testis in male mice treated with cadmium.

Material and Methods: 24 adult NMRI mice were divided into four groups: 1. Control group 2. Treated with cadmium chloride (5 mg/kg) 3. Treated with Curcumin (100 mg/kg) 4. Treated with curcumin + cadmium chloride. The treatments were performed as a single dose and after 24 hours, epididymal spermatozoa of different groups were used to evaluate the plasma membrane integrity. In addition, the amount of malondialdehyde (MDA) and the anti-oxidant activity of serum and testis were evaluated. Data were analyzed using ANOVA test followed by Turkey's test ($p<0.05$).

Results: findings showed that cadmium chloride caused a significant decrement in plasma membrane integrity compared to the control groups. In addition, cadmium chloride induced a significant increment of MDA in serum and testis and a significant decrement in total antioxidant activity of serum and testis as compared to the group. In curcumin + cadmium chloride- treated group, curcumin could significantly compensate the toxic effect of cadmium on these parameters compared to the cadmium-treated group.

Conclusion: it seems that curcumin as a potent antioxidant is able to ameliorate the adverse effects of cadmium chloride on sperm plasma membrane integrity, lipid oxidation and total antioxidant activity of serum and testis.

Keywords: cadmium, curcumin, malondialdehyde, plasma membrane integrity, total antioxidant activity.

www.SID.ir