Archive of SID

تأثیر نیکوتین بر اسپرم افراد نورمواسپرمیک: تعدیل توسط آنتی‌اکسیدانها

مهران عربی (Ph.D.)[1]، راویندر آناند (Ph.D.)[2].

۱-استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲-استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده جانورشناسی، دانشگاه پنجاب، چندیگر، 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 نورمواسپرمیک می‌باشد. در این پژوهش نیکوتین با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار بر روند اکسیداسیون لیپیدهای غشایی (LPO)، تعادل بین مولکولهای گلوتاتیون اکسیده (GSSG) و احیاء شده(GSH)، فعالیت آنزیم گلوتاتیونS –ترانسفراز (GST) و نیز میزان شکنندگی DNA سلولهای اسپرم در افراد نورمواسپرمیک و با در نظرگیری اثرات متقابل آنتی‌اکسیدان‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ویتامینC، گلوتاتیون (GSH) و ترولوکس(آنالوگ محلول در آب از ویتامینE) 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<۰/۰۱ و P<۰/۰۰۱) 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 ویتامینC در هنگام حضور یونهای دو ظرفیتی آهن در محیط عمل، موجب افزایش TBARS گردید. نسبت GSH به GSSG در تیمارهای نیکوتینی به میزان ٤٩/٢٠٪ و ٦٠/٣٠٪ کاهش یافت(P<۰/۰۱). فعالیت GST نیز به میزان ٣٤/٠١٪ و ٥٧/١٩٪ 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 دوتائی 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.

گل واژگان: اسپرم، نیکوتین، رادیکال آزاد، آنتی اکسیدان، گلوتاتیونS- ترانسفراز، پراکسیداسیون چربی و روش سنجش ستاره دنباله‌دار.

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

پست الکترونیک: mehranarabi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در خلال چند دهه گذشته کیفیت مایع اسپرمی[1] 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 می‌باشد. 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($C_{10}H_{14}N_2$)[2] به عنوان یک الکالوئید بسیار فرار از اجزاء مهم دود سیگار بوده و قادر به تقلید بسیاری از اثرات زیان‌آور 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 می‌باشد(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 یونیزه‌شدن نیکوتین در این شرایط، از مقدار جذب آن در دستگاه تنفسی بسیار کاسته می‌شود(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[3] تبدیل شده که از طریق ادرار دفع می‌گردد.

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

همچنین در انسان، استفاده از آگونیست‌های نیکوتین با اثر بر روی گیرنده‌های استیل کولین موجب کاهش تولید آندروژن‌ها می‌شود(۶). در حیوانات ماده نیز تأثیر مستقیم و سمی نیکوتین بر دستگاه تولید مثلی موجب کاهش تولید استرادیول و مهار تخمک‌گذاری شده است (۷). Cope در سال ۱۹۹۸، نشان داد که نیکوتین با تأثیر مستقیم بر گلبولهای سفید[4] موجود در مایع اسپرمی، سبب تولید و آزادسازی انواع رادیکالهای فعال اکسیژن یا ROS[5] شده که در نهایت باعث کاهش شدید در تحرک اسپرم‌ها[6] می‌گردد(۸).

تمامی موجودات زنده جهت بقاء خود نیازمند به اکسیژن هستند. عمده متابولیت‌های فعال اکسیژن(ROS) شامل O_2^-، OH^o و H_2O_2 بوده که قادر به حمله به بیومولکولها و تغییرات زیان‌آور در ساختار سلولی می‌باشند. ROS از جمله عوامل مهم در بروز ناباروری در مردان بوده و از دو منبع متفاوت در مایع اسپرمی تولید می‌گردد، شامل یکی سلولهای اسپرم آسیب دیده و دیگری گلبولهای سفید فعال شده می‌باشد. تولید ROS در سلولهای اسپرم سالم و فعال به عنوان یک فرایند فیزیولوژیک شناخته شده که موجب بروز واکنش اکروزومی[7] در اسپرم می‌شود. 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[8] در سلول می‌گردد. ROS با اختلال در مورفولوژی، ساختار DNA، منجر به کاهش تحرک

1-Semen
2-Nicotine
3-Cotinine

4-Leukocyte
5-Reactive Oxygen Species
6-Motility
7-Acrosome reaction
8-Oxidative stress

www.SID.ir

Archive of SID

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 آنتی‌آکسیدانی مهم در این رابطه شامل: آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر کاتالاز[1]، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)[2] و گلوتاتیون S- ترانسفراز(GST)[3] و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (شامل دو گروه محلول در آب و محلول در چربی) نظیر: آلبومین، اسکوربات، گروههای سولفیدریل و ویتامینE می‌باشد. 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 سمینال بوده و چنانچه در طی شستشو این بخش از مایع اسپرمی از اسپرمها جدا گردد، اسپرمها بسیار مستعد اکسیداسیون لیپیدهای غشایی (LPO)[4] و تغییر در ساختار غشاء سلولها خواهند شد. از جمله پیامدهای آسیب‌رسان LPO در سلول تخریب غشاء، غیر فعال‌شدن آنزیمهای متصل به غشاء نظیر ATP_{ases}، غیرفعال‌شدن آنزیم‌های سیتوپلاسمی مانند گلوکز ٦- 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 (۱۰-۹). 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 محدودهٔ 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)[5] را دارا بودند. نمونه‌های مایع اسپرمی مذکور پس از جمع‌آوری و مایع‌شدن 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 g×۳۰۰) سانتریفوژ شده تا پلاسمای سمینال از اسپرمها جدا گردد، آنگاه رسوب اسپرمی حاصله با محلول ۰/۲ مولار از بافر فسفاته سالین‌دار (PBS)[6] با pH=۷/۲ به روش قبل سانتریفوژ و مورد شستشو قرار گرفتند. پس از شستشو به میزان ۰/۱میلی‌لیتر 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

www.SID.ir

Archive of SID

دول۱۱-تأثیر افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها بر اکسیداسیون لیپیدهای غشایی ناشی از تیمارهای نیکوتینی بر روی اسپرم شسته‌شده افراد سالم بارور در محیط *in vitro*

غلظت نیکوتین (*mM*)	MDA (*moles/mg* protein*/min)*			
	فاقد آنتی‌اکسیدان اضافی	ترولوکس (۰/۰۲)	ویتامین C (۱)	گلوتاتیون (۵)
محلول فاقد نیکوتین	۰/۱٤٤±۰/۰۲٦ **	۰/۱۱۳±۰/۰۲۸ ***	۰/۱۱۷±۰/۰۲٤ ***	۰/۳۳۲±۰/۰۱۹
۰/۵	۰/۳۷۷±۰/۰۳۳ b	۰/۲٦٥±۰/۰۲٦ b	۰/۳۱٤±۰/۰۲۸ b	۰/٥۰۳±۰/۰٤۳ **
۱	۰/٥۰۲±۰/۰۳۳ a	۰/۲۷۰±۰/۰۳۳ b	۰/۳۸٥±۰/۰۳۲ B	۰/٥۹۱±۰/۰۲۸ ***

-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 آنتی‌اکسیدان، مربوط به مقدار گروه شاهد یا کنترل است.
-مقادیر P مقایسه شده با گروه کنترل عبارتند از: $P^{***}<۰/۰۰۱$ ، $P^{**}<۰/۰۱$
-مقادیر P مقایسه شده با گروه تیمار مربوط عبارتند از: $^{b}P<۰/۰۱$ ، $^{a}P<۰/۰۵$

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 میلی‌مولار 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 میلی‌مولار درPBS (pH=۷/۲) حل شده و از آن دو غلظت مورد نظر تهیه گردید. در تیمارها، حجم ۰/۱ میلی‌لیتر 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 آنتی‌اکسیدان نیز در حلال PBS وارد شده و غلظت‌های نهایی ۱ میلی‌مولار از ویتامین C (اسکوربات)، ۵ میلی‌مولار از گلوتاتیون (GSH) و ۰/۰۲ میلی‌مولار از ترولوکس مورد استفاده قرار گرفت. این غلظت‌های خاص از آنتی‌اکسیدان‌ها، 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[1] با MDA[2] (به عنوان محصول نهایی عمده در انتهای روند LPO) استفاده شد. در نهایت یک ترکیب زرد رنگ از MDA در لوله‌های آزمایش محتوی تیمار نیکوتینی حاصل گردید که به روش طیف سنجی نوری[3] قابل اندازه‌گیری بود. مجموعه محصولات نهایی روند LPO موسوم به اجسام واکنش‌دهنده با TBA یا

1-Thiobarbituric acid
2-Malondialdehyde
3-Spectrophotometry

www.SID.ir

Archive of SID

حجدول ۲- تأثیر اضافه‌سازی آنتی‌اکسیدان‌ها بر تغییرات نسبت گلوتاتیون احیاءشده به اکسید شده (GSH/GSSG) ناشی

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

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

-اعداد درون پرانتزها نشان‌دهندهٔ کم و یا زیادشدن نسبت گلوتاتیون احیاءشده به اکسید شده بوده که نسبت به مقدار گ ه ه

TBARS[1] بوده که MDA به عنوان عمده‌ترین این محصولات است. سنجش نسبت گلوتاتیون احیاء شده (GSH) به گلوتاتیون اکسیده (GSSG)[2] 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 از واکنش ماده DTNB[3] 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[4] استفاده گردید.

این سنجش بر روی اسپرمهای لیزشده انجام گرفت که در طی مراحل مختلف سانتریفوژ، در نهایت بخشی از اجزاء سیتوپلاسمی موسوم به PMS[5] جدا و جهت سنجش فعالیت GST مورد استفاده قرار گرفت. PMS در واقع بخشی از فراکسیون‌های سلولی در محدودهٔ میتوکندری‌ها که غنی از GST بوده و بیشترین فعالیت این آنزیم را دارا می‌باشند، برای حصول آن ابتدا سلولهای اسپرم لیز گردیده تا یک بخش هموژن تولید گردد و سپس این بخش ابتدا با دور *rpm* ۱۰۰۰ و سپس *rpm* ۱۰۰۰۰ (هر نوبت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ 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[6] با ژل الکتروفورز برای سلولهای واحد با رنگ‌آمیزی توسط اکریدین نارنجی[7] 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.

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳- تأثیر افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها و تغییرات فعالیت گلوتاتیون S ترانسفراز ناشی از تیمارهای نیکوتینی بر روی اسپرم شسته‌شده افراد سالم و بارور محیط *in vitro*

آنتی اکسیدان (*mM*)	GST (µ *moles* CDNB-GSH conjugates*/mg* protein*/min)*		
	(۱)	(۰/۵)	فاقد نیکوتین
فاقد آنتی‌اکسیدان	۰/۹۲۹±۰/۰۸۳ **	۰/۷۹۲±۰/۰۶۳ *	۰/۵۹۱±۰/۰۶۱
ویتامین C (۱)	۰/۷۵۲±۰/۰۶۱	۰/٦٤۲±۰/۰٦٥	۰/۵۵۷±۰/۰٦۹
ترولوکس (۰/۰۲)	۰/۵٦٦±۰/۰٦۷ b	۰/۵۲۵±۰/۰۷۳ a	۰/۵۰۷±۰/۰۹۱

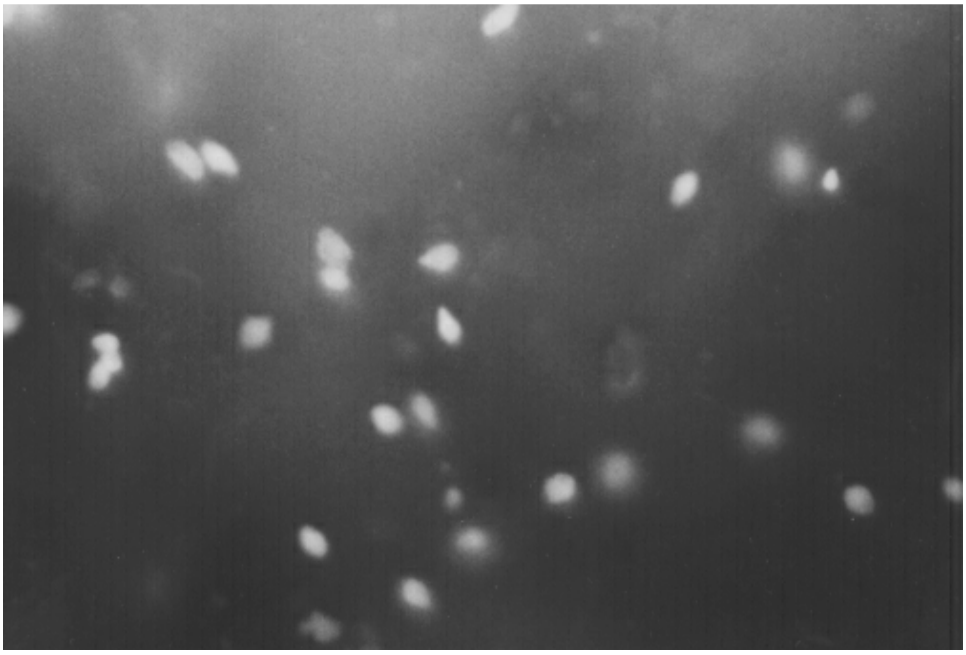
-هرداده نشانگر میانگین ± انحراف استاندارد مربوط به سه مشاهده مستقل (هرکدام با سه مرتبه تکرار) است.
-مقادیر P مقایسه شده با گروه کنترل عبارتند از: $^{**}P<۰/۰۱$ ، $^{*}P<۰/۰۵$
-مقادیر P مقایسه شده با گروه تیمار مربوطه عبارتند از: $^{b}P<۰/۰۱$ ، $^{a}P<۰/۰۵$

نتایج

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (LPO): در طی آزمایش اکسیداسیون لیپیدهای غشایی یا LPO (جدول ۱) مشخص شد که تیمارهای نیکوتینی (به ترتیب ۰/۵ و۱ 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 $P<۰/۰۱$ و$P<۰/۰۰۱$) 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 ۱*mM* ویتامین C به محیط عمل اضافه گردید، کاهش معنی‌داری در سطوح TBARS به میزان ۳۷/٦۰٪ و ۳۵٪ نسبت به گروههای تیمار یافته با نیکوتین ($P<۰/۰۱$) پدیدار گردید. کاهش بیشتری در سطوح TBARS به هنگام افزودن ترولوکس (۰/۰۲میلی‌مولار) به محیط عمل مشاهده گردید که به ترتیب به میزان ۴۷/۴۰٪ و ۵۴/۳۰٪ (معنی‌دار در سطح ۹۹٪ یا $P<۰/۰۱$) 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 سطوح $P<۰/۰۱$ و $P<۰/۰۵$) 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 (۸۹/۱٦٪) نسبت به گروه کنترل گردید (نتایج نشان داده نشده است).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- نمای اسپرم پس از قرارگرفتن در میدان الکتروفورزی به روش ستاره دنباله‌دار برای بررسی وقوع شکست‌های احتمالی در ساختار DNA سلول

-نقاط روشن کروی نشان‌دهندهٔ مجموعهٔ کروماتین هستهٔ اسپرم سلولهای سالم می‌باشد.
-نقاط روشن کشیده و غیرکروی نشان‌دهندهٔ مجموعه کروماتین هسته سلولهای اسپرم آسیب دیده می‌باشد.

سنجش نسبت گلوتاتیون 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 (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) باعث کاهش در میزان این نسبت می‌گردد (درصد تغییرات در جدول۲ آورده شده است)، اما در مقابل، به کارگیری آنتی‌اکسیدان‌ها یعنی ترولوکس و ویتامین C (از کاربرد گلوتاتیون 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 گلوتاتیون احیاء (GSSG) گردید(جدول ۲).

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیونS -ترانسفراز (GST): در این آزمایش افزودن تیمارهای نیکوتینی(۰/۵و۱ 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 ۳٤/۰۱٪ و ۵۷/۱۹٪ (به ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۱) 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<۰/۰۵) 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 (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) موجب آسیب و ایجاد شکستگی

www.SID.ir

Archive of SID

در DNA (بـه ترتیـب در ۵ و ۱۰٪) اسـپرمهای مـورد بررسی می‌گردد. کـاربرد مـوادآنتی‌اکسـیدان نتوانسـت تغییر معنی‌داری را در شمارش سـلولهای آسـیب دیـده ایجـاد نمایـد. بـا کمـک رنـگ‌آمیـزی اکریـدین نـارنجی مشخص گردید که تقریباً تمامی شکستگی‌هـای موجـود در DNA اسپرمها از نوع دو رشته‌ای یا (DSDB)[1] بـود. شکل۱ نشـان‌دهنـده اسـپرمها در تیمـار نیکـوتینی (یـک میلی‌مولار) بوده که در آن نقاط روشن کروی، مجموعه کروماتین هسته سلولهای اسپرم سـالم و نقـاط روشـن کشیده و غیر کروی، مجموعه کروماتین هسته سلولهای اسپرمی است که دچـار آسـیب و شکسـتگی شـده و بـه شـکل یـک سـتاره دنبالـه‌دار دارای سـر و دم مشـخص گردیده‌اند.

بحث

در بدن موجودات زنده، اکسیژن بـه عنـوان یـک تیـغ دو لبه عمل می‌نماید. از یک طرف زندگی بدون آن غیرممکن بوده و از طرف دیگر بدن ما به طور مستمر در معـرض مسمومیت با آن قرار دارد، مسـمومیت از آن جهـت کـه رادیکالهای آزاد مشتق از آن (ROS) خطرآفرین بـوده و نظم فیزیولوژیـک بـدن را مختـل مـی‌سـازند. تشـخیص استرس اکسیداتیو سـلولی در پلاسـمای سـمینال افـراد نابارور، نشان می‌دهد که ROS قادر به ایفـاء یـک نقـش مهم در پاتوفیزیولوژی ناباروری در مـردان اسـت(۱۷). مطالعات Kobayashi و همکـاران در سـال ۲۰۰۱ نشـان داد که یک کاهش مستمر در تعداد سلولهای اسپرم زنده و فعـال در ارتبـاط بـا افـزایش مقـدار ROS در محـیط وجود دارد(۱۸). همان طور که در بخش مقدمه ذکر شد، یکی از بارزترین شواهد صدمات سلولی ناشـی از عمـل ROS پدیدهٔ LPO بوده و سلولهای اسپرم بـه دلیـل دارا بـودن مقـادیر زیـاد اسـیدهای چـرب اشـباع نشـده در ساختار غشایی خود، بسیار مستعد آسیب توسـط LPO هستند(۹). بارزترین اثر LPO در سلولها، ایجـاد اخـتلال در نظم و کار غشاء سـلولها اسـت، بطوریکـه رونـدهای انتقال یون‌ها و مواد گوناگون و نیز شیب‌های غلظتی در دو طرف غشاء همراه با انتقال پیامبرهـای شـیمیایی بـه واسطهٔ گیرنـده‌هـای غشـایی دسـتخوش تغییـر شـده و مختل می‌گردد(۱۹).

در سال ۱۹۹۸ Cope، نشان داد کـه نیکـوتین بـه عنـوان یک ترکیب فعـال و مهـم در دود سـیگار قـادر اسـت تـا سطوح ROS را در پلاسمای مایع سـمینال افـزایش داده و بدین ترتیب ناباروری را القاء نماید(۸). در این مطالعـه مقـدار MDA تولیـد شـده پـس از گذشـت نـیم سـاعت، (معادل با TBARS) در محیط حاوی اسپرم انسـان، بـه میزان معنی‌دار و وابسته به غلظت، افزایش یافت. MDA بـه عنـوان یکـی از عمـده‌تـرین محصـولات نهـایی اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در طـی رونـد LPO در سیستم‌های زیستی، مطرح بوده و حـدود ۵۰٪ کل TBARS را تشکیل می‌دهد و به واسطه واکنش‌دهـی زیـاد آن بـا TBA، بـه راحتـی مـی‌تـوان، وسـعت و گسـتردگی رونـد LPO را مشـخص نمـود. مولکولهـای MDA با نفوذ بـه درون سـاختار غشـاء سـلول موجـب عدم تقارن در توزیع اجزاء لیپیدی غشاء شـده و عـلاوه بر این با ایجاد پیوندهای محکم با DNA سلول، موجـب بـروز صـدمات و شکسـتگی‌هـایی در ایـن کرومـوزوم مـی‌شـود(۲۰-۱۹). وجـود رابطـه معکـوس بـین غلظـت MDA محیط و میزان چسبندگی اسپرم به سلول تخمک توسـط Aitken و همکـارانش در سـال ۱۹۹۲ بـه اثبـات رسیده است(۲۱). نتایج حاصل از مطالعه اخیـر نشـانگر قدرت و توانایی نیکوتین در جهت معرفـی رادیکـال‌هـای آزاد مشتق از اکسیژن در محیط واجد اسپرمهای انسان است کـه توسـط ترکیـب زرد رنـگ TBA MDA قابـل اثبات است. همانطوریکه پیش از این ذکـر شـد، نیکـوتین دارای قابلیت عبور از غشاء سلولها بوده، بنابراین قـادر

1-Double-Stranded DNA Breaks

www.SID.ir

Archive of SID

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[1] ثابت کردند، اما توضیحی در مورد آن که نیکوتین از چه طریق سبب تولید و رهاسازی ROS در محیط عمل شده، ارایه 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(۲٤). 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 Pekarsky 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 کارآیی غشاء اسپرم در ارتباط و میان کنش با سلول تخمک بوده که منجر به عدم باروری خواهد گردید.

مواد آنتی اکسیدان غیر آنزیمی نظیر ویتامین C، گلوتاتیون و آنالوگ محلول در آب ویتامین E (ترولوکس) به عنوان دومین سد دفاعی در مقابل عوامل اکسیدکننده نظیر ROS، پس از اولین خط دفاعی یعنی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی عمل می‌کنند و از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد[2]، باعث جمع‌آوری و حذف آنها از محیط عمل سلول‌ها می‌گردند. در پژوهش حاضر از غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار برای ویتامینC، 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[3] 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(۲٦).

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 ۰/۲mM 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 سطوحTBARS محیط می‌گردد و واکنش آنتی‌اکسیدان‌ها نیز در جهت کاهش این روند بود، اما در این قسمت ویتامین C نه تنها نقش مهاری 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

1-Luminescence

2-Free radical trapping agents
3-Chromanol

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. یون‌های دو ظرفیتی آهن در طی واکنش موسوم به واکنش Fenton موجب تبدیل آب اکسیژنه محیط به رادیکال آزاد هایدروکسیل (OH^o) 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 گلوتاتیون احیاء به اکسید[1] 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 گلوتاتیون احیاء به مصرف رسیده و به گلوتاتیون اکسید تبدیل می‌شود. با توجه به نقش نیکوتین در تولید ROS می‌توان تصور نمود که ROS تولید شده توسط نیکوتین با کاهش گلوتاتیون 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 گلوتاتیون 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. گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) به عنوان یکی از اولین سدهای مقابله با اکسیداسیون سلولی نقش مهمی را در جهت حذف 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

1-Glutathione redox ratio

www.SID.ir

Archive of SID

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 مقدمات بروز این شکست‌ها را فراهم نمودند. کاربرد رنگ اکریدین نارنجی نیز نشان داد که بیشتر این شکست‌ها از نوع دو زنجیره‌ای بوده و در نتیجه رنگ فلوئورسانس سبز در DNA اسپرم حاصل می‌گردید. در مردان نابارور هردو شکست‌های 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 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 سیگنال رسانی نیکوتین به درون سلول‌های اسپرم و نیز تشخیص کمپلکس‌های احتمالی نیکوتین با اجزاء پلاسمای 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 فنآوری جمهوری اسلامی ایران به جهت پشتیبانی مالی از تحقیق حاضر که در کشور هند انجام گرفت تشکر و قدردانی می‌گردد.

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 cotnine 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 Iuminal-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 sufhydryl proteins in mice. Biol Repod. 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 glutathion 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.

www.SID.ir