اثرات آنتی اکسیدانی منگنز بر اسپرم انسانی تیمار شده در شرایط مختلف : مقایسه با روی ، نیکل ، و ترولوکس

مهران عربی

گروه زیست شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه شهرکرد- شهرکرد

چکیده

انواع مشتقات فعال اکسیژن، ROS ، بعنوان یکی از عوامل ایجاد ناباروری در مردان شناخته می شوند . تولید فزاینده ROS در سلولها منجر به پراکسیداسیون چربیها (LPO) و غیر فعال شدن سلولها بویژه اسپرمها واجد غشایی مملو از اسید های چرب غیر اشباع، می گردد .در مطالعه حاضر توان آنتی اکسیدانی منگنز در راستای غلبه بر روند LPO (القاء شده توسط کمپلکس فرو- اسکوربات و نیکوتین) در برابر روی، نیکل و ترولوکس (مشابه محلول در آب ویتامین E) مقایسه گردید. جهت مقایسه از روش اسپکتروفوتومتری سنجش غلظت مالون دی آلدئید (MDA) تولید شده در محیط استفاده شد . فعالیت گلوتاتیون S- ترانسفراز یا GST نیز با سنجش مقدار کونژوگه (مزدوج) CDNB-GSH تولید شده در محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش تورم هایپواوسموتیک نیز جهت بررسی استحکام غشاء انجام شد. روش آماری مورد استفاده آزمونt- استیودنت بود . نتایج نشان می دهد که افزودن یونهای فلزی بویژه منگنز به محیط واکنش موجب افت مقدارMDA و نیز کاهش فعالیت GST گردید. منگنز در میان دیگر یونهای فلزی (با توجه به k_i کمتر)، و پس از ترولوکس، از پتانسیل آنتی اکسیدانی بهتری برخوردار بود . کاهش فعالیت GST و نیز افزایش اسپرمهای متورم ، و نیز بهبود قدرت تحرک اسپرمها در حضور یونهای فلزی کمیاب موید فروکش سازی روند LPO در عناصر غشایی اسپرمها ست که به نوبه خود مانع از بروز ناباروری می شوند.در این راستا می توان از منگنز در بهبود شرایط عمل در انواع ART نظیر لقاح خارج رحمی و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم یا ICSI استفاده ای ویژه وبهینه نمود .

واژه های کلیدی : آنتی اکسیدان ، اسپرم ، قدرت تحرک, LPO, GST, HOST .

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

با وجود ضروری بودن اکسیژن مولکولی، مشتقات آن نظیر رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) ، آنیون و سوپراکساید ($O_2^{-\cdot}$) ، بر عملکرد و ساختار بیوشیمیایی سلولها تأثیر منفی می گذارد و بقاء موجود زنده را در معرض خطر جدی قرار می دهد . بهمین علت اکسیژن را نوعی تیغ دو لبه در نظر می گیرند . مجموعه متابولیتهای اکسیژن با نام انواع اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) بعنوان یکی از عوامل ایجاد ناباروری یا عقیمی در انسان مطرح می باشند (۳٤) . ROS در دو مسیر مخالف بر عملکرد و ساختار سلولهای اسپرم تأثیر دارد، از یکسو جهت انجام برخی روند های طبیعی اسپرم نظیر واکنش آکروزومی ضروری است، و از سوی دیگر در غلظتهای افزایش یابنده خود در محیط که موسوم به استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress, OS) است ، موجب مهار قدرت تحرک(Motility) و نیز تغییردر شکل ظاهری سلولهای اسپرم می گردد ودر نهایت منجر به عقیمی یک فرد می شود. در سایر سلولها نیز موجب بروز آسیبهای جدی در ساختار DNA ی آنان می شود (٦، ۷، ۸ و ۹). در شرایط طبیعی بمنظور جمع آوری و سپس خنثی سازی ROS ، در داخل و خارج سلول ، آنتی اکسیدانه وارد عمل می شوند. سلولهای اسپرم در طی روند اسپرماتوژنز ، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را همراه مواد آنتی اکسیدانی موجود در آن از دست داده و بدین ترتیب در مقابل روند OS حساس می گردند ، اما بعلت غوطه وری در مایع اسپرمی که محتوی آنتی اکسیدانهای فراوانی نظیر اسید اسکوربیک ، اوراتها ، تورین ، گروه های سولفیدریلی (تیولی)، کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز است، بخوبی در مقابل روند OS محافظت می گردند. در سالهای اخیر نیز ثابت شده است که در پلاسمای مایع اسپرمی مردان نابارور مقدار کمتری از انواع آنتی اکسیدانها در مقایسه با مردان بارور وجود دارد (۱۸، ۲۳ و ۳٤) . سلولهای اسپرم بعلت دارا بودن مقادیر زیادی از اسید های چرب غیر اشباع در غشاء، برای دریافت OS بسیار مستعد می باشند و بدین ترتیب واحد های چربی (در غشاء سلول و غشاء اندامکها) براحتی دچار اکسیداسیونی موسوم به پراکسیداسیون چربیها (Lipid Peroxidation, LPO) می شودکه با عملکرد آنتی اکسیدانها تعدیل و یا خنثی می گردد. روند LPO موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیتهای آنزیمی ، و ایجاد شکستگی در DNA سلولهای اسپرم شده، و لذا بعنوان یکی از عوامل مهم بروز ناباروری در مردان مطرح است(۵، ۸، ۹، ۲٤ و ۳٤).

Archive of SID

www.SID.ir

منگنز (Mn^{2+}) به عنوان یک یون فلزی کمیاب جهت تولید سوپراکساید دیسموتاز میتوکندریایی و نیز فعال سازی آنزیمهایی نظیر: هیدرولاز ها و کربوکسیلازهای سلولی لازم و ضروری است (۳۳). همچنین منگنز در برخورد با آنیون سوپراکساید ضمن تبدیل به Mn^{3+} ، موجب حذف این رادیکال آزاد از محیط عمل سلولها می گردد (۱۷). همچنین برخی محققین دیگر گزارش نموده اند که، منگنز قادر به مهار و فروکش سازی موج LPO درهر دو محیطهای *in vivo* و *in vitro* است (٤ و ۲۳). بر مبنای کشف LPO بعنوان مکانیسمی جهت ایجاد نقص در عملکرد اسپرمها ودر نهایت القاء ناباروری، استراتژی کاربرد آنتی اکسیدانها در راستای معکوس سازی و رفع صدمات وارده به این سلولها مدنظر محققان قرار گرفته است. وجود یک آنتی اکسیدان مؤثر و قوی در زمانی که سلولهای اسپرم محروم از محیط حامی خود یعنی پلاسمای مایع اسپرمی اند ، بسیار کارساز و حائز اهمیت بوده و منجر به بقاء آنان خواهد شد (۷، ۱۸ و ۳۳).

در پژوهش حاضر سعی بر آن بوده تا اثرات آنتی اکسیدانی منگنز(۰/۱ میلی مولار) را در شرایط و محیطهای متفاوت از نظروجود عوامل اکسید کننده نظیر نیکوتین ، کمپلکس فرو (Fe^{2+}) و اسکوربات (ویتامین C) ، مورد ارزیابی قرار کیرد، و این توان در برخی از جنبه ها با عملکرد دیگر یونهای فلزی نظیر نیکل (Ni^{2+})، روی(Zn^{2+}) و نیز ترولوکس (مشابه محلول در آب ویتامین E) (در غلظتهای متفاوت، ۱۰۰-۱۰ میکرومولار) مقایسه گردد .

میزان فعالیت گلوتاتیون S- ترانسفراز (Glutathione S-Transferas, GST) نیز بعنوان یک آنتی اکسیدان آنزیمی موجود در درون و برون سلولهای اسپرم ، در شرایط فوق مورد سنجش قرار گرفت. در انتهای پژوهش، از آزمایشهای ارزیابی قدرت تحرک اسپرمها و نیز تورم هایپواوسموتیک (Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST) (HOS) جهت بررسی میزان استحکام غشاء سلولهای اسپرم استفاده گردید.

مواد و روشها

نمونه های اسپرم انسان: نمونه های مورد استفاده از افراد سالم و غیر سیگاری (در محدوده سنی ۲۸-۲۳ سال) ساکن در شهرستان شهرکرد، به صورت داوطلبانه، اخذ و جمع آوری گردید . نمونه های اسپرمی پس از گذشت ۳۰ - ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، از حالت لخته ای خارج و آبکی گردیده و سپس نمونه های منطبق با معیارهای سازمان بهداشت جهانی از نظر تعداد سلول، قدرت تحرک، مورفولوژی و سایر

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصه های یک نمونه سالم و کامل، انتخاب شدند.

آماده سازی محلولها و نمونه های اسپرمی : حلال موجود در تمامی محلولهای مورد استفاده این پژوهش بافر فسفاته سالین دار یا PBS (۰/۲ مولار با pH برابر۷/۲) بود. نمونه های اسپرمی با محلولPBS شست و شو و با چند ضربه پیستون هوموژنایزر، بصورت همگن و یکدست درآمد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از نمونه های اسپرمی به درون هر یک از لوله های آزمایش مورد نظر افزوده شد. مقدار آنتی اکسیدانهای مورد استفاده و محرکLPO در مخلوط واکنش نیز ۰/۱ میلی لیتر بود.

اندازه گیری میزان LPO : بر اساس روش Ohkawa وهمکارانش (۲۹) انجام گرفت. بطور خلاصه، در این روش زمان انکوباسیون نمونه ها ٦۰ دقیقه و در پایان میزان تولید اجسام واکنش دهنده با اسید تیوباربیتوریک از جمله مالون دی آلدئید اندازه گیری شد که این ماده حدود ۵۰ درصد مقدار اسید تیوباربیتوریک را به خود اختصاص می دهد . غلظت کمپلکس مالون دی آلدئید + اسید تیوباربیتوریک، در طول موج ۵۳۲ نانومتر قابل اندازه گیری است . مخلوط واکنش شامل نمونه اسپرمی، سولفات دودسیل سدیم ، اسید استیک خالص ، محلول آبی ۱/۲ درصد اسید تیوباربیتوریک ، با یا بدون یونهای فلزی بود. پس از حرارت دادن مخلوط واکنش ، به آن ۳ میلی لیتر از مخلوط ان- بوتانول + پیریدین افزوده شد، که پس از سانتریفوژ، میزان جذب نوری سطحی ترین لایه مخلوط واکنش با اسپکتروفوتومتر سنجیده شد.

اندازه گیری فعالیت GST : بر اساس روش Habigو همکارانش انجام گرفت (۲۲) .در این سنجش نمونه های اسپرمی ابتدا با هموژنایزر کاملاً خرد و همگن می شود. سپس با چند بار سانتریفوژ شدن (در دمای ٤ درجه سانتی گراد) بخشی بنام (Post-Mitochondrial Supernatant,PMS) غنی از GST ، جدا گردید . در این روش ازCDNB بعنوان یک ماده الکتروفیل در مخلوط، جهت واکنش با گروه سولفیدریلی گلوتاتیون ، استفاده شد . پس از شروع واکنش ، میزان فعالیت GST (مقدار کمپلکسCDNB-GSH تولید شده) طی ۵ دقیقه و در طول موج ۳٤۰ نانومتر اندازه گیری شد .

سنجش قدرت تحرک اسپرم : جهت بررسی میزان قدرت تحرک اسپرمها ، تعداد و درصد سلولهای متحرک وغیرمتحرک آن درمحیطهای متفاوت به کمک میکروسکوپ فازمتضاد ، و در حرارت اتاق ($۳۰ \pm ۲^{o}C$) ، بمدت سه ساعت و با فواصل زمانی یک ساعت ، شمارش شد(۳۵).

Archive of SID

www.SID.ir

تورم هایپواوسموتیک (HOST) : بر اساس روش Jeyendran و همکارانش انجام گرفت (۲٦). در این روش از یک محیط هایپواوسموتیک (شامل محلولهای ۱۵۰ میلی اوسمولار از فروکتوز و سیترات سدیم) جهت ارزیابی میزان استحکام غشاء سلولهای اسپرم در گروه های شاهد و تیمار استفاده شد . پس ازیک ساعت انکوباسیون ، ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی را بر روی لام قرار داده و به کمک میکروسکوپ فاز متضاد، تعداد و درصد اسپرمهای متورم (با پیچش در ناحیهٔ دمها) یعنی اسپرمهای طبیعی با غشاء سالم و فعال ، ثبت شد.

روش آماری و مواد شیمیایی : در هر آزمایش ، میانگین گروه های تیمار یافته با گروه شاهد به کمک روش Student's t-test و توسط نرم افزارSPSS (VERSION 11.0) مقایسه گردید . داده های حاصل از این پژوهش بصورت سه تکرار مستقل سه تایی می باشند . مواد شیمیایی مورد استفاده از کارخانهٔ Merck آلمان تهیه گردید .

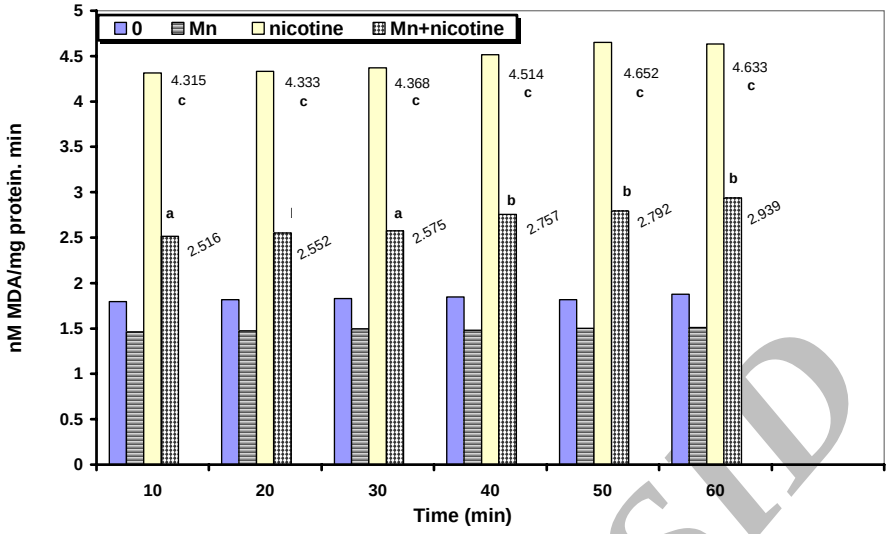
نتایج

سنجشLPO (تیمار با نیکوتین و یا کمپلکس آهن- اسکوربات) در حضورمنگنز : شکل ۱ نشان دهندهٔ منگنز (۰/۱ میلی مولار) در مقابله با گسترش روند LPO در نمونه های اسپرم انسانی با یا بدون تیمار نیکوتینی (۰/۵ میلی مولار) و در فواصل زمانی مختلف (٦۰-۱۰ دقیقه) است. دراین شکل مشخص شده است که نیکوتین بصورت وابسته به زمان موجب گسترش روند LPO شده، وافزایش معنی دار غلظت MDA در محیط مؤید آن است ، و در ٦۰ دقیقه پس از شروع انکوباسیون این میزان افزایش نسبت به گروه شاهد (بدون نیکوتین و منگنز) حدود ۱۵۰٪ ($p<۰/۰۰۱$) بود. پس از افزودن منگنز (۰/۱ میلی لیتر) کاهش معنی داری در تیمارهای نیکوتین، در فواصل زمانی مختلف، پدیدار گردید، بطوریکه در انکوباسیون میزان کاهش غلظت MDA محیط نسبت به گروه شاهد مربوطه در حدود ۹٤٪ ($p<۰/۰۰۱$) بود (شکل ۱) .

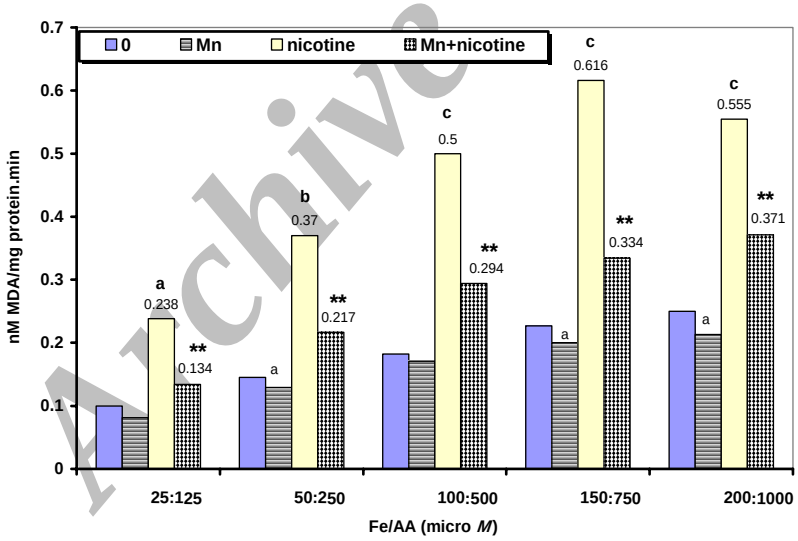
داده های موجود در شکل ۲ مربوط به اثر منگنز بر تغییرات ناشی از نیکوتین بر اسپرم انسان در حضور غلظتهای مختلف محرکLPO (آهن+ اسکوربات ، با نسبت ۵ : ۱) بوده و بیانگر این مطلب است که نیکوتین بطور معنی داری موجب تشدید روندLPO القاء شده توسط محرک در نمونه های اسپرمی شده و نیز افزودن منگنز باعث کاهش معنی دار تولید MDA محیط ($p<۰/۰۱$) در تمامی غلظتهای محرک گردید (شکل ۲) .

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ – نمودار افزایش منگنز (۰/۱ m*M*) در مقابله با پراکسیداسیون چربیها در نمونه های اسپرم انسانی با یا بدون تیمار نیکوتینی (۰/۵ میلی مولار)، در فواصل زمانی مختلف ($p< 0.05$ ، b) $p< 0.01$ (c) $p< 0.001$).



شکل ۲ – **نمودار افزایش منگنز (۰/۱ m*M*) در مقابله با پراکسیداسیون چربیها در نمونه های اسپرم انسانی با یا بدون تیمار نیکوتینی (۰/۵ m*M*)، در حضور غلظتهای مختلف از محرک LPO (نسبت ۵ : ۱)** . ($p< 0.05$ ، b) $p<$ (c) $p< 0.001.0.01$) (**) $p< 0.01$

Archive of SID

www.SID.ir

در جدول۱ قدرت آنتی اکسیدانی منگنز با نیکل، روی، و ترولوکس مقایسه شده است، و بر طبق آن در مقابله با پراکسیداسیون القاء شده توسط محرکLPO ، منگنز در تمامی غلظتها (۱۰۰-۱۰ میکرومولار) نسبت به دو یون فلزی دیگر یعنی نیکل و روی از اثرآنتی اکسیدانی بهتری برخوردار است ، اما اثر آنتی اکسیدانی ترولوکس از هر سه یون فلزی نامبرده بیشتر می باشد. پس از منگنز بترتیب روی و نیکل از نظر قدرت آنتی اکسیدانی قرار دارند (جدول ۱) . علاوه بر این، در محاسبه ای دیگر (روش محاسبه و فرمولهای مربوطه ذکر نشده اند) و با بهره گیری از پلات دیکسون بعنوان نوعی نمایش سینیتیکی، میزان قدرت مهارکنندگی این مواد در مقابله با پراکسیداسیون القاء شده مورد ارزیابی قرار گرفته و از این طریق مقدار ثابت مهار کنندگی (Inhibitor constant,Ki) آنتی اکسیدانهای مربوطه نیز محاسبه گردید. در این بین ، عاملی که از نظر عددی واجد k_i کمتری باشد، واجد قدرت آنتی اکسیدانی بیشتری نیز بوده، و با این وصف مقادیر k_i محاسبه شده مربوط به این آنتی اکسیدانها بدین قرار است :

$k_{i\ Trolox} = 0.465\ mM$, $k_{i\ Mn^{2+}} = 0.645\ mM$, $k_{i\ Zn^{2+}} = 2.136\ mM$, $k_{i\ Ni^{2+}} = 2.218\ mM$،

نتیجه حاصله مؤید توان بالای آنتی اکسیدانی منگنز (پس از ترولوکس) در مقایسه با روی و نیکل است .

سنجش فعالیت GST : در این پژوهش میزان فعالیت گلوتاتیون S- ترانسفراز یا GST (یک آنتی اکسیدان آنزیمی داخل و خارج سلولهای اسپرم) در حضور منگنز و تحت تیمار نیکوتین و با استفاده از غلظتهای مختلف گلوتاتیون بعنوان سوبسترای آنزیم (از ۱۰ تا ۵۰ میکرومولار) بررسی شد و معلوم گردید که افزودن منگنز موجب کندی عمل و در نهایت مهار فعالیت آنتی اکسیدانی GST می شود .در مقابل نیز تیمار نیکوتینی بطور معنی دار و قابل توجهی ($p<۰/۰۰۱$) ، موجب افزایش فعالیت این آنزیم می گردد (جدول ۲) . از طرف دیگر، بر اساس داده های موجود در جدول ۲، پارامتر های سینیتیکی ثابت تعادل (k_m) و سرعت ماکزیمم واکنش آنزیمی (V_{max}) مربوط به فعالیت GST (با رسم نمودار Lineweaver-Burk) در قبل و پس از افزودن منگنز، محاسبه و مشخص شد که نوع مهار اعمال شده از سوی منگنز بر فعالیت GST از نوع مهار غیر رقابتی است. مقدارعددی پارامترهای سینیتیکی مربوطه در جدول ۳ درج شده است.

قدرت تحرک اسپرمها : در شکل ۳ ، درصد قدرت تحرک اسپرم انسان در ساعات مختلف انکوباسیون با نیکوتین ۰/۵ mM و دربر هم

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ : مقایسه اثر افزودن غلظتهای مختلف یونهای فلزی و ترولوکس در مقابله با پراکسیداسیون چربیها در نمونه های اسپرم انسانی تیمار شده با محرکLPO (آهن+ اسکوربات ، با نسبت μM ۷۵۰ : ۱۵۰) .

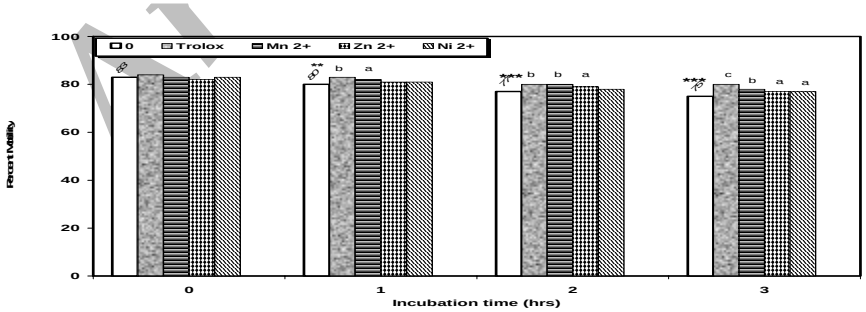
	یون فلزی			ویتامین
غلظت (μM)	Mn^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	ترولوکس
۱۰	^{a} ۰ /۲٤۲ ± ۰/۰۱۰	۰/۲۹۱ ± ۰/۰۲۷	^{a} ۰/۲۵۳ ± ۰/۰۱۵	^{b} ۰/۲۲۰ ± ۰/۰۱۲
۲۵	^{a} ۰/۲۳۳± ۰/۰۱٤	۰/۲۸۵ ± ۰/۰۱٦	^{a} ۰/۲۵۰ ± ۰/۰۱۱	^{b} ۰/۲۰٦ ± ۰/۰۱٤
۵۰	^{a} ۰/۲۳۲ ± ۰/۰۱۲	۰/۲۷۷ ± ۰/۰۲۲	^{a} ۰/۲٤۲ ± ۰/۰۰۹	^{b} ۰/۲۰۵ ± ۰/۰۰۹
۷۵	^{b} ۰/۲۲۷ ± ۰/۰۰۹	۰/۲۸۱ ± ۰/۰۱۵	^{a} ۰/۲۳۸ ± ۰/۰۱۲	^{b} ۰/۲۰۷ ± ۰/۰۱٤
۱۰۰	^{b} ۰/۲۱۳ ± ۰/۰۱۳	^{a} ۰/۲٤۲ ± ۰/۰۲۵	^{a} ۰/۲۳۵ ± ۰/۰۱۳	^{b} ۰/۲۰۲ ± ۰/۰۱۲
مقدار گروه شاهد مثبت (واجد محرکLPO) ، بدون تیمار نیکوتین و بدون آنتی اکسیدان = ۰/۰۱۸ ± ۰/۳۱۵				

هر داده به صورت Mean ± SD با سه تکرار مستقل (سه تایی) نمایش داده شده است .مقادیر درون جدول بر حسب nM MDA/mg protein/min هستند .مقایسه شده با گروه شاهد مثبت : $^{a}p<0.05$, $^{b}p<0.01$.

جدول ۲ : اثر افزودن منگنز (۰/۱ mM) بر فعالیت GST در نمونه های اسپرم انسانی با یا بدون تیمار نیکوتینی (۰/ ۵ mM)، در حضور غلظتهای مختلف از سوبسترا (گلوتاتیون احیاء شده) .

	بدون تیمار		تیمار نیکوتینی	
غلظت **GSH** (mM)	بدون Mn^{2+}	با Mn^{2+}	بدون Mn^{2+}	با Mn^{2+}
۱۰	۰/۱٦۲ ± ۰/۰۲۱	۰ /۱۲۸ ± ۰/۰۲۷	۰/۱۹٤ ± ۰/۰۱۳	۰/۱۷۵ ± ۰/۰۱۷
۲۰	۰/۲۸۰ ± ۰/۰۱۸	^{a} ۰/۲۲۳ ± ۰/۰۱۲	^{b} ۰/۳٤۱ ± ۰/۰۱٦	۰/۳۲۵ ± ۰/۰۰۹
۳۰	۰/٤۰۰ ± ۰/۰۱۵	^{b} ۰/۲۹۰ ± ۰/۰۰۹	^{b} ۰/٤٦۵ ± ۰/۰۳۱	۰/٤۰۰ ± ۰/۰۳۷
٤۰	۰/٤۳۵ ± ۰/۰۲۸	^{b} ۰ /۳۵۵ ± ۰/۰۱۲	^{b} ۰/۵۱۳ ± ۰/۰۲۹	^{a} ۰ /٤۸۱ ± ۰/۰۲٤
۵۰	۰/۵۱۳ ± ۰/۰۱۳	^{b} ۰/٤۱۹ ± ۰/۰۲۳	^{b} ۰/۵۸۸ ± ۰/۰٤۸	^{b} ۰/٤۰٦ ± ۰/۰۳۵

هر داده به صورت Mean ± SD با سه تکرار مستقل سه تایی نمایش داده شده است . مقادیر درون جدول بر حسب CDNB-GSH μM conjugates /mg protein .min هستند . ($p< 0.05$) ^{a} ، ($p < 0.01$) ^{b} و($p< 0.001$) ^{c} : مقایسه شده با گروه شاهد (بدون منگنز و بدون نیکوتین) مربوطه .



شکل ۳ – نمودار میزان قدرت تحرک سلولهای اسپرم انسان در زمانهای مختلف انکوباسیون با نیکوتین (۰/ ۵ mM) و در بر هم کنش آن با غلظت ۰/۱ mM آنتی اکسیدانها .مقایسه شده با تیمارنیکوتین مربوطه ($p< 0.05$: a) ، $p<$ b) ($p< 0.01$) . ($p< 0.001$ c) مقایسه شده با زمان صفر انکوباسیون و فاقد آنتی اکسیدان) شاهد $p<$ (**) $p< 0.001$, : (*) $p< 0.05$ (***) $p< 0.01$, .

www.SID.ir

جدول ۳ : به اثر مهار کنندگی منگنز (۰/۱ m*M*) بر روی فعالیت GST ، با یا بدون تیمار نیکوتین (۰/ ۵ m*M*) و پارامتر های سینیتیکی مربوط آن .

		k_m (μM)	V_{max} [μM CDNB-GSH conjugates / mg protein .min]
بدون نیکوتین	بدون منگنز	٤٤/٤٤	۰/۹۱۰
	واجد منگنز	٤٤/٤٤	۰/۷۳۰
واجد نیکوتین	بدون منگنز	٤٤/٤٤	۱/۰۸۷
	واجد منگنز	٤٤/٤٤	۰/۹۵۲

جدول ۴ : درصد سلولهای اسپرم انسانی واجد تورم هایپواوسموتیک در ناحیهٔ دمها ، با یا بدون تیمار نیکوتینی (mM ۰/۵)، و در حضور آنتی اکسیدانها .

	زمان انکوباسیون (ساعت)	
آنتی اکسیدان ها (۰/۱mM)	۰	۱
۰	٪۶۳ ± ۰/۹	** ٪ ۵۶ ± ۰/۸
Trolox	٪ ٦٤ ± ۰/۸	b ٪ ٦۱ ± ۰/٦
Mn^{2+}	٪ ٦٤ ± ۰/۹	b ٪ ٦۰ ± ۰/۹
Zn^{2+}	٪ ٦۳ ± ۱	a ٪ ۵۸ ±۰/٦
Ni^{2+}	٪ ٦۲ ± ۰/۸	٪ ۵۷ ± ۰/۵

مقایسه شده با زمان صفرانکوباسیون وفاقد آنتی اکسیدان (شاهد) : ۰/۰۱ >p ** .

مقایسه شده با تیمار نیکوتین (بدون آنتی اکسیدان) در آخر یک ساعت : ۰/۰۱ >p [b] ، ۰/۰۵ >p [a]

هر داده بصورت Mean ± SD با سه تکرار مستقل (سه تایی) نمایش داده شده است .

کنش با غلظت m*M* ۰/۱ آنتی اکسیدانهای ترولوکس، منگنز، روی ، و نیکل نشان داده است .در این آزمایش مشخص گردید که نیکوتین بطور معنی داری در زمانهای مختلف انکوباسیون موجب کاهش تحرک اسپرمها شده، بطوریکه درطولانی ترین زمان انکوباسیون میزان تحرک اسپرمها از ۰/۸± ۸۳ زمان شروع به ۰/۸ ± ۷۵ درصد (p<۰/۰۰۱) تقلیل یافت.

نتایج حاصل از افزودن آنتی اکسیدانها نیز در همسویی با نتایج موجود در بخش LPO بوده، بدین صورت منگنز پس از ترولوکس و بالا تر از روی و نیکل موجب بهبود وضعیت تحرک اسپرمها درمحیطهای واجد نیکوتین گردیده و این اثر مثبت در ساعت دوم از انکوباسیون مشهودتر بود (شکل ۳) .

Archive of SID

www.SID.ir

تورم هایپواوسموتیک : آنالیز آماری داده های موجود در جدول ٤ نشان می دهد که نیکوتین بعنوان عامل مخرب غشاء اسپرم عمل نموده و در اینجا کاهش میزان درصد اسپرمهای متورم (با دمهای پیچیده) (۱۱/۱۲ ٪ ، $p<۰/۰۱$) نشان دهنده بروز تغییرات منفی ومخرب در استحکام غشاء این سلولهاست. افزودن آنتی اکسیدانها به محیطهای حاوی نیکوتین، مانع از بروز کاهش تعداد سلولهای اسپرم متورم گردید .در این بخش از پژوهش نیز کاربرد منگنز نتیجهٔ بهتری نسبت به اثر روی و نیکل داشت و یک ساعت پس از انکوباسیون موجب افزایش تعداد اسپرمهای متورم از ۵۶ ±۰/۸ به ۶۰ ±۰/۹ درصد ($p<۰/۰۱$) گردید. از نظر قدرت آنتی اکسیدانی ، ترولوکس بالاتر و روی و نیکل بترتیب پایین تر از منگنز قرار دارند (جدول ٤) .

بحث و نتیجه گیری

از آنجائیکه سلولهای اسپرم در طی مرحله اسپرماتوژنز حجم زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می دهند (کمبود سیستمهای آنتی اکسیدانی)، بنابراین در مقایسه با سلولهای سوماتیکی حساسیت بیشتری نسبت به افزایش میزان ROS محیط، دارند. اولین پیامد هجومROS به ساختار های غشایی، بروز پراکسیداسیون سلولی در درون غشاء سلول و اندامکها است (٦، ۱۸، ۲٤ و ۳٤) .

کاربرد آنتی اکسیدانها بعنوان عوامل دور کننده مواد سمی و نیز رادیکالهای آزاد از محیط پیرامون سلولها موجب مهار روند LPO شده و نتیجه آن حفظ ساختار بیوشیمیایی سلولها ست (۲، ۹ و ۳٤) . بهمین دلیل، استراتژی کاربرد آنتی اکسیدانها در راستای معکوس سازی و رفع صدمات وارده به سلولهای اسپرم مدنظر بسیاری از محققان قرار گرفته است. منگنز بعنوان یک یون فلزی مهم و کمیاب و نیز یک آنتی اکسیدان، بطور مستقیم و با اتصال به آنیون سوپراکساید ضمن تبدیل به Mn^{3+}، موجب حذف این رادیکال و یا دیگر رادیکالهای آزاد نظیر پراکسیل ، از محیط درون و برون سلولها ی اسپرم می گردد و یا بطور غیر مستقیم و بعنوان کوآنزیم، با شرکت در ساختار آنزیم سوپراکساید دیسموتاز موجبات حذف و خنثی سازی این آنیون را فراهم می سازد (۱٤، ۱۷، ۲۳ و ۳۳). در پژوهش حاضر، توان آنتی اکسیدانی منگنز در محیط های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. در نخستین مرحله از این آزمایش ها، توان منگنز در برخورد با شرایط پراکسیداسیون سلولی ناشی از کاربرد نیکوتین به تنهایی و یا در همراهی با محرک LPO سنجیده شد و مشخص گردید که منگنز در

Archive of SID

www.SID.ir

مواجهه با شرایط نامطلوب ایجاد شده، بخوبی وارد عمل گردیده و موجب مهار روند LPO و کاهش اثرات جانبی آن شد. در سال ۱۹۹٤ ، گروهی از محققین عنوان نمودند که افزودن یک آنتی اکسیدان به اسپرمهای حاصل از سانتریفوژ مایع اسپرمی، موجب کاهش صدمات سلولی ناشی از اجراء این روش بر آنان می گردد . در راس این صدمات پراکسیداسیون چربیها (LPO) قرار دارد که خود ناشی از افزایش غیر طبیعی میزان ROS در محیط است (۳). مشخص شده است که اثرات ROS در بدن انسان در بروز حالات پاتولوژیک بطور اعم، و در ایجاد عقیمی بطور اخص، دخالت مستقیم دارد (۳۸). در ادامه آزمایشها ، مقایسه ای بین توان آنتی اکسیدانی منگنز با روی، نیکل و ترولوکس، در شرایط پراکسیداسیون بعمل آمد ، که پس از محاسبهٔ k_i مربوط به هر یک، مشخص گردید که منگنز با k_i کمتر از روی و نیکل (ولی بیشتر از ترولوکس) بعنوان آنتی اکسیدان در پس از ترولوکس و قبل از دو یون فلزی دیگر قرار می گیرد. ترولوکس با فرمول ساختمانی ٦ - هیدروکسی تترا متیل کرومان-۲- اسید کربوکسیلیک ، آنالوگ (مشابه) محلول در آب آلفا- توکوفرول (ATP) یا ویتامین E بوده ، لذا واجد خاصیت لیپوفیلی همراه با خاصیت هیدروفیلی است و بدین ترتیب با قدرتی مضاعف در دو فاز چربی و آبی در درون و برون غشاء سلولها عمل نموده و به خنثی سازی رادیکالهای آزاد و سپس جمع آوری آنان می پردازد (۱۲). در سال ۱۹۹۵ در یک آزمایش نشان داده شد که کاربرد ترولوکس در نمونه های اسپرم بز تیمار یافته با محرک LPO موجب کاهش معنی داری (٦۲ ٪) در تولید محصولات نهاییLPO می شود (۱۳). با توجه به توان بالای ترولوکس در مقابله با شرایط پراکسیداسیون، می توان این ویتامین را بعنوان یک مقیاس و یا اشل مناسب در نظر گرفت و سپس توان آنتی اکسیدانهای دیگری نظیر منگنز را با آن مقایسه نمودند. در مورد روی نیز پژوهشهای انجام شده نشان می دهد که این عنصر قادر به مهار روند LPO، از طریق خنثی نمودن هیدروپراکسیدهای لیپیدی، در سلولهای کبدی و نیز اریتروسایتها، می باشد (۲۰). ترشحات غده پروستات واجد مقدار زیادی عنصر روی بوده که نقش مهمی در حفاظت از اسپرمها بر عهده دارد. همچنین روی بوسیله جایگزین کردن آهن (III) با آهن (II) ، مانع از ورود آهن در چرخه تولید ROS یا واکنشهای فنتون می شود (۲۳، ۳۰ و۳۲). در این میان نیز، نیکل با بیشترین مقدارki ضعیف ترین آنتی اکسیدان است.

گلوتاتیون S- ترانسفراز یا GST بعنوان یک آنتی اکسیدان آنزیمی، موجود در داخل و خارج

Archive of SID

www.SID.ir

سلولهای اسپرم، با استفاده از GSH یا گلوتاتیون احیاء شده بعنوان سوبسترا ، موجب خنثی شدن آنان می شود (۲٦). در بسیاری از بافتهای بدن با افزایش میزان ROS ، میزان فعالیتGST نیز افزایش معنی داری را نشان می دهد (۲۱ و۳۷). در آزمایشهای ما نیز پس از کاربرد نیکوتین، افزایش معنی داری در میزان فعالیت GST (در تمام غلظتهای سوبسترا)($p<۰/۰۰۱$) دیده شد. در ادامه، افزودن منگنز بعنوان یک آنتی اکسیدان قوی موجب کاهش معنی داری در میزان فعالیت GST گردید. در پژوهش حاضر، بر اساس محاسبهٔ پارامتر های سینیتیکی برهم کنش منگنز در محیطهای متفاوت (ثابت ماندن مقدار k_m) مشخص گردید که منگنز بصورت غیر رقابتی موجب مهار فعالیت GST ، در تیمار نیکوتینی شده است .

در پژوهشی دیگر بر روی سلولهای اسپرم عنوان گردید که غیر فعال شدن GST منجر به پیشبرد روند پراکسیداسیون سلولی، مهار قدرت تحرک، و در نهایت مهار اتصال اسپرم به تخمک می شود (۲۱). به دنبال گزارش دیگری در سال ۲۰۰۰ مشخص گردید که میزان فعالیتGST سلولهای ژرمینال در محیطهای حاوی پراکسید هیدروژن بطور معنی داری افزایش یافته و در صورت استفاده از مهار کننده این آنزیم، میزان تولید محصولات LPO نیز به شدت افزایش می یابد (۳۱).

قدرت تحرک پیشروندهٔ اسپرمها بعنوان یک عامل تعیین کننده و مؤثر در باروری مردان مطرح بوده و متضمن لقاح مناسب و کامل است. در گزارشهای متعددی عنوان گردیده که قدرت تحرک اسپرمها در صورت افزایش رادیکالهای آزاد و محصولات نهایی روند LPO درمحیط ، بطور معنی داری کاهش می یابد. در واقع این کاهش به دنبال بروز اختلال درفرایندهای تبادل یونی غشاء و آنزیمهای دخیل درآن است (۱، ۱۹ و ۳٤). از سوی دیگر، رادیکالهای آزاد بویژه انواع ROS موجب مهار آنزیمهای درون سلولی گردیده و بدین ترتیب اسپرمها از منابع آنزیمی دخیل در تامین ATP مورد نیاز جهت تحرک و فعالیت محروم می گردند (۷، ۱۵، ۱٦ و ۳٤).

در پژوهش حاضر، به دنبال کاهش میزان تحرک اسپرمها پس از تیمار با نیکوتین ، افزودن آنتی اکسیدانها به محیط موجب بهبود و اصلاح این وضعیت شد . در این مورد نیز توان آنتی اکسیدانی منگنز بیش از روی و نیکل (و کمتر از ترولوکس) است. منگنز با دور کردن رادیکالهای آزاد محیط ، موجب بهبود و اصلاح قدرت تحرک اسپرمها می گردد. منگنز از مسیر دیگری موجب افزایش میزان قدرت تحرک اسپرمها می شود . بدین ترتیب که این عنصر بعنوان یک محرک قوی

Archive of SID

www.SID.ir

در فعال سازی آنزیم آدنیلیل (آدنیلات) سیکلاز (از آنزیمهای مهم دخیل در تحرک اسپرم) موجود در غشاء این سلولها وارد عمل می گردد (۲۸). پژوهشی در سال ۱۹۸۸ نیز عنوان نمود که ، انکوباسیون توام اسپرمها با آب اکسیژنه (از انواع ROS) موجب مهار عمل آنزیم Na^+-K^+- ATPase (از جمله آنزیمهای دخیل در تحرک آنان) می شود (۲۷). در مجموع رابطه ای معکوس و منفی قوی بین میزان ROS موجود در مایع منی و میزان قدرت تحرک اسپرمها وجود دارد (۱۱و ۲۵). کاربرد آنتی اکسیدانها همیشه همراه با بهبود قدرت تحرک اسپرمها نبوده بطوری که افزودن مجموعهٔ آنتی اکسیدانی اسکوربات و آلفا توکوفرول منجر به اصلاح و ترمیم قدرت تحرک تقلیل یافته اسپرمها در محیط حاوی لوکوسایتهای فعال شده (باترشح ROS)، نمی گردد (۱۵).

به دنبال آزمایش LPO و در تأئید نتایج حاصل از آن ، آزمایش تورم هایپواوسموتیک بمنظور ارزیابی میزان استحکام غشاء انجام شد که در طی آن اسپرمهای سالم و فعال در محیط هایپواوسموتیک دچار تورم شده و این تغییر بصورت پیچش در ناحیهٔ دمهای آنان ظاهر می گردد (۲٦). پس از افزودن نیکوتین به محیط اسپرمهای انسانی در طی یک ساعت ، کاهش معنی داری (۱۱/۱۲ ٪ ، $p<۰/۰۱$) درتعداد سلولهای متورم شده با دمهای پیچ خورده به وقوع پیوست که این پدیده به منزله بروز اشکال در ساختار و استحکام غشاء سلولهای اسپرم پس از بروز پراکسیداسیون سلولی است. روندLPO با افزایش پیوند های دوگانه در غشاء سلولها، موجب آسیب و ناپایداری آنها شده و بدین ترتیب ضمن برهم ریختن ساختار غشاء ها، موجب غیر فعال شدن آنان نیز می گردد (۱، ۱۹، ۳۱ و ۳٤). یک رابطه مثبت قوی بین میزان درصد سلولهای اسپرم متحرک و فعال با میزان درصد سلولهای متورم در محیط هایپواوسموتیک وجود دارد (۲٦). در این بخش نیز منگنز در مواجهه با شرایط پراکسیداسیون تحمیل شده از سوی نیکوتین واجد توان آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به یونهای فلزی دیگر بود . استحکام طبیعی غشاء نه تنها برای متابولیسم طبیعی اسپرمها بلکه جهت اتصال موفق اسپرم به تخمک، واکنش اکروزومی کامل و طبیعی و نیز فرایند ظرفیت یابی سلولهای اسپرم، لازم و ضروری است (۳٦). لذا می بایست استراتژی کاربرد مواد آنتی اکسیدان در جهت بهبود هر چه بیشتر وضعیت استحکام غشاء اسپرمها بعنوان یک امر ضروری ، مورد نظر پژوهشگران این حوزه کاری قرار گیرد .

بطور خلاصه می توان گفت که کاربرد و استفاده بموقع از مواد آنتی اکسیدان (آنزیمی و یا غیر

Archive of SID

www.SID.ir

آنزیمی ، ویتامینها و یا یونهای فلزی کمیاب نظیر : منگنز) در پژوهشهای مرتبط با تولید مثل بسیار ضروری می باشد، و در این راستا می توان از منگنز در بهبودی شرایط محیط عمل، در محیطهای مایع ویژه نگهداری اسپرمها، در انواع تکنولوژیهای کمک کننده به تولید مثل یا ART نظیرلقاح خارج رحمی و یا تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، استفاده ای ویژه وبهینه نمود.

تشکر و قدردانی :

از زحمات و مساعدت جناب آقای دکتر بهزاد شارقی رئیس محترم دانشکده علوم ، همکاری سرکار خانم دکتر نها افتخاری در آنالیزهای آماری ، و نیز از همکاری همیشگی جناب آقای سید رسول صیدایی (کارشناس محترم آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی دانشگاه شهرکرد) تشکر و قدردانی می گردد.

منابع :

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

2-Aitken , R.J. 1997, Molecular mechanisms regulating sperm function. Mol. Hum. Reprod. **3**:169-173 .

3-Aitken, R.J. and Fisher, H. 1994, Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioassays **16**: 259-268.

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

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

6-Arabi, M. 2004, Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia **36:** 305-310 .

7-Arabi, M. and Anand, R.J.K. 2002, Effect of nicotine on normospermic men: modulation by antioxidants . Med. J. Reprod. Infertil. (Iran) **3** (11):11-22 .

Archive of SID

www.SID.ir

8-Arabi, M., Anand, R.J.K. and Kanwar, U. 2001, Analysis of the impact of caffeine on membrane integrity, redox ratio and GST in human ejaculated sperm: effectiveness of antioxidants. Proc. Int. Cong. Androl.; Vol. of Short Commun.: 365-369.

9-Arabi, M., Sanyal, S.N., Kanwar, U. and Anand, R.J.K. 2003, The Effect of antioxidants on nicotine and caffeine induced changes in human sperm -An in vitro Study. *In:* Male fertility and lipid metabolism, (eds.:De Vriese, S.R., and Christophe, A.B.).Chapter 16, AOCS Press, USA, pp. 250-267 .

10-Baker, H.W., Brindle, J., Irvin, D.S. and Aitken, R.J. 1996 , Protective effects of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leucocytes. Fertil. Steril. **65**: 411- 419.

11-Barclay, L.R.C. and Vinqvist, M.R. 1994, Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. Free Radic. Biol. Med. **16** (6): 779-788.

12-Baumber, J., Ball , B.A., Gravance, C.G., Medina , V. and Davies-Morel , M.C. 2000 , The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity,mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J. Androl. **21**: 895-902.

13-Brzezinska-Slebodzinska, E., Slebodzinska, A.b., Pietras, B. and Wieczorek, G. 1995, Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma .Biol. Trace. Elem.. Res. **47:** 69-74.

14-Coassin, M. ,Ursini, F. and Bindoli, A. 1992 , Antioxidant effect of manganese. Arch. Biochem. Biophys. **299**: 330-333.

15-De Lamirande, E. and Gagnon, C. 1992 b, Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J. Androl. **13**: 379-386.

16-De Lamirande, E. and Gagnon, C. 1992a, Reactive oxygen species and human spermatozoa. I . Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. J. Androl. **13**: 368 -373.

Archive of SID

www.SID.ir

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

18-Donnelly, E.T., Neil, M. and Lewis, E.M. 1999, Antioxidant supplementation in vitro does improve human sperm motility. Fertil. Steril. **72**(3) 4: 84-495.

19-Engel, S., Schreiner, T. and Petzoldt, R.1999, Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. Andrologia **31**: 17-22.

20-Girotti, A.W., Thomas, J.P. and Jordan, J.E. 1985, Inhibitory effect of zinc (II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. J. Free Radic. Biol. Med. **1**: 395-401.

21-Gopalakrishnan, B. and Shaha, C. 1998, Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. FEBS Lette. **422:** 296-300.

22-Habig ,W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. 1974, Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. **219**: 7130-7139.

23-Hida , H. , Coudray , C. ,Calop , J. and Favier , A. 1995 , Effect of antioxidants on adriamycin-induced microsomal lipid peroxidation . Biol. Trace Elem. Res. **47:** 111-116.

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

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

26-Jeyendran, R.S,Vanderven, H.H. , Perez-Pelaez , M. , Carbo , B.G. and Zameveld , L.J.D. 1984 , Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. **70**: 219-228 .

27-Kako, K., Kato , M. , Matsuoks, T. and Mustapha, A. 1988, Depression of membrane-bound Na^+-K^+-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. Am. J. Physiol. **254**: 330-337.

28-Laponite, S., Ahmad, I., Buhr, M.M. and Sirad, M.A. 1996, Modulation of post-thaw motility, survival, calcium uptake and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese . J. Diary Sci. **79**: 2163-2169.

Archive of SID

www.SID.ir

29-Lewis, S.E.M., Sterling, E.S., Young , I.S. and Thompson ,W. 1997 , Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertil. Steril. **67**(1)**:** 42-147.

30-Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979, Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction . Anal. Biochem. **95**: 351-358.

31-Powis, G. 1989, Free radical formation by anti-tumor quinines. J. Free Radic. Biol. Med. **6** (1): 63-101 .

32-Rao, A.V. and Shaha, C. 2000, Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. Free Radic. Biol. Med. **29** (10):1015-1027.

33-Sansone, G., Martino, M. and Abrescica, P. 1991, Binding of free and protein associated zinc to rat spermatozoa . Comp. Biochem. Physiol. **99** *C* :113-117 .

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

35-Sikka, S.C. 1996, Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front. Biosci. **1:** *E* 78–*E* 86.

36-Verma, A. and Kanwar, K.C. 1998, Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. Andrologia **23**: 325-329.

37-Yanagimachi, R. 1998, Mammalian fertilazation. *In*: The physiology of reproduction (eds. Knobil, E. and Neil , J.D.) Vol. 2, 2nd edition, Raven Press, New York , pp. 189-318.

38-Zhao, T. ,Singhal , S.S. , Piper , J.T. , Cheng , J. , Pandya , U. , Clark-Wronski , J. Awasthi , S. and Awasthi Y.C. 1999, The role of human glutathione S-transferase hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protein against oxidative stress .Arch. Biochem. Biophys. **367** (2): 216-224.

39-Zini, A., de Lamirande, E. and Gagnon, C. 1993, Reactive oxygen species in semen of infertile patients: level of superoxide dismutase and catalase like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int. J. Androl. **16**: 180-188.

Archive of SID

www.SID.ir