المپیك
فصلنامه
سال بیست و یکم شماره ۱ (پیاپی ۶۱) بهار ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۷
تاریخ تصویب: ۹۱/۹/۱۶

تأثیر تعاملی سرب، تمرینات استقامتی و مکمل آنتی‌اکسیدانتی بر برخی پارامترهای تولید مثل

❖ **عقیل کوثری**؛ دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران*
❖ ❖ **ولی‌الله دبیدی روشن**؛ دانشیار دانشگاه مازندران
❖ ❖ ❖ **اباصلت حسین‌زاده کلاگر** ؛ دانشیار دانشگاه مازندران

چکیده: هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تعاملی سرب، دویدن استقامتی و مکمل ضداکسایشی کورکومین بر برخی پارامترهای تولیدمثلی در موش‌های صحرایی بود. شصت سرموش صحرایی نر به طور تصادفی به شش گروه دسته‌بندی شدند: ۱. پایه، ۲. شم(حلال کورکومین)، ۳. تمرین + سرب، ٤. کورکومین + سرب، ۵. سرب، ٦. تمرین + کورکومین + سرب (هر گروه شامل ده سرموش). برنامهٔ تمرینی گروه‌های ۳ و ٦ شامل دویدن پیشرونده روی نوارگردان بدون شیب به مدت هشت هفته و هر هفته پنج جلسه با سرعت ۱۵-۲۲ متر در دقیقه و به مدت ۲۵-٦٤ دقیقه بود. به‌علاوه، مکمل کورکومین سه روز در هفته و مجموعاً هشت هفته به مقدار ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به گروه‌های ٤ و ٦ و حلال کورکومین به گروه ۲ و سرب نیز به مقدار ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم به تمام گروه‌ها (به غیر از گروه‌های ۱ و ۲) به صورت زیر صفاقی تزریق شد. پس از ارزیابی تحرک‌پذیری و نیمرخ مورفولوژیایی اسپرم، همچنین مالون دی‌آلدهید (MDA) بافت‌های بیضه و اپیدیدیوم با روش‌های استاندارد مشخص شد میانگین پراکسایش لیپیدی در بیضه و اپیدیدیوم در گروه سرب نسبت به گروه‌های درمان بیشتر بود. همچنین، القای زیرصفاقی استات سرب باعث کاهش تحرک‌پذیری اسپرم در گروه سرب نسبت به گروه‌های دیگر شد. به علاوه، شمار اسپرم‌های نرمال نیز در گروه سرب کمتر از دیگر گروه‌ها بود. با وجود این، استفاده از تمرین هوازی هشت هفته‌ای و یا مکمل ضداکسایشی گیاهی فقط باعث مهار آثار زیانبار ناشی از قرارگیری در معرض سرب بر این شاخص‌ها شده است. با توجه به یافته‌های این تحقیق به نظر می‌رسد قرارگیری در معرض آلودگی هوا آثار مضری بر دستگاه تولید مثل دارد، اما انجام فعالیت‌های منظم هوازی و یا مکمل ضداکسایشی گیاهی فقط باعث مهار آثار زیانبار آلاینده‌ها می‌شود و بهبود بیشتر کیفیت و کمیت شاخص‌های تولید مثلی را به دنبال ندارد.

واژگان کلیدی: پارامترهای تولید مثلی، دویدن استقامتی، سرب، کورکومین، ناباروری

* **E.mail : aghil_kosari@yahoo.com**

www.SID.ir
Archive of SID

مقدمه

با پیشرفت فناوری و صنعتی شدن جوامع در دهه‌های اخیر، تولید و استفاده از فلزات سنگین افزایش یافته است. یکی از عناصری که حتی به مقدار کم نیز آثار سوء زیادی بر سلامتی انسان‌ها دارد سرب است که هیچ نقشی مفیدی در بدن انسان ندارد و وجود هر مقدار از آن در بدن عامل خطر محسوب می‌شود. این فلز به طور وسیعی در طبیعت پخش و گسترده شده و میزان دریافت آن در طول زمان افزایش یافته است، به طوری که تخمین زده می‌شود مقدار سرب در خون انسان‌های ما قبل تاریخ ۰۱۶٪ میکروگرم بر دسی‌لیتر خون بوده که این مقدار در حال حاضر به ترتیب ۵۰ تا ۲۰۰ برابر کمتر از پایین‌ترین میزان سرب خون انسان‌های ساکن در نیمکره‌های جنوبی و شمالی است (۳).

آثار سمی سرب ممکن است در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، خون، کلیه، قلب و عروق، سیستم‌های غدد درون‌ریز و ایمنی، مجرای معده‌ای-روده‌ای، دستگاه تولید مثل و استخوان حادث گردد (۷، ۸، ۱۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد آثار سمی سرب ممکن است از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش پراکسایش لیپیدی باعث اختلال در عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن از جمله دستگاه تولید مثل شود (۱۲، ۱۷، ۲۲، ۲۴).

شاخص‌های مختلفی برای سنجش کارکرد دستگاه تولید مثل وجود دارند. ارزیابی کیفیت اسپرم یکی از شاخص‌های حساس برای ارزیابی کارکرد دستگاه تولید مثل است. پارامترهای استاندارد رایج برای ارزیابی کارکرد اسپرم مثل غلظت، تحرک‌پذیری و مورفولوژی شاخص‌های زیستی حساسی برای مواجهه با آلاینده‌ها به حساب می‌آیند (۹، ۲۰). به دلیل اینکه بخش اعظم غشای پلاسمایی اسپرم از اسیدهای چرب اشباع نشده تشکیل شده (۴۵٪ از اسیدهای چرب غشای اسپرم اشباع نشده است)، همچنین به دلیل پایین بودن ظرفیت ضداکسایشی آن، سلول اسپرم به میزان زیاد مستعد آسیب‌های پراکسایشی است (۹، ۲۰).

مطالعات نشان دادند استرس اکسایشی ناشی از سرب از طریق آسیب به غشای اسپرم، افزایش تعداد اسپرم‌های ناهنجار، کاهش تحرک‌پذیری اسپرم و کاهش توانایی آن در نفوذ به درون سلول تخمک باعث کاهش باروری می‌شود (۹، ۲۰، ۲۲). استرس اکسایشی(OS)[1] وضعیتی است که با آسیب شدید ساختار و عملکرد سلولی همراه است و نهایتاً به مرگ زودرس سلولی می‌انجامد. این وضعیت را معمولاً انواعی از رادیکال‌های آزاد، مخصوصاً متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) القا می‌کند. متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) به اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشای پلاسمایی اسپرم حمله می‌کنند و آبشاری از واکنش‌های شیمیایی با عنوان پراکسایش لیپید (LPO)[2] را به راه می‌اندازند (۱۹).LPO یکی از مهم‌ترین آثار پاتولوژیایی رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود.

مالون دی‌آلدهید (مالون آلدهید یا بیس دی‌متیل استال) یکی از دی‌آلدهیدهای سه کربنهٔ بی‌نهایت

1. oxidative stress
2. lipid peroxidation

www.SID.ir
Archive of SID

واکنش‌پذیری است که محصول فرعی LPO تولید می‌شود. این آلدهید با گروه‌های عملکردی بسیاری از مولکول‌ها از جمله پروتئین‌ها، لیپوپروتئین‌ها، RNA، DNA ترکیب می‌شود(۵).

با در نظر گرفتن آثار زیان‌بار سرب بر بخش‌های مختلف بدن و افزایش روزافزون امکان قرارگیری در معرض آلودگی سرب، راهکارهای مختلفی برای خنثی یا کم کردن این آثار زیان‌بار بررسی شده است. یکی از این راهکارها توجه به تغذیه و مواد غذایی مورد استفاده به ویژه مواد ضداکسایشی است. تغذیهٔ مناسب نقش بسزایی در مقابله با مسمومیت ناشی از سرب دارد. محققان خاصیت ضداکسایشی موادی از قبیل ویتامین B۶، E، C و تیامین را در دفع فلزات سمی از قبیل سرب بررسی کرده‌اند (۷، ۱۲، ۱۷، ۲۴)، اما در سال‌های اخیر تلاش‌های گسترده‌ای برای پیدا کردن مواد ضداکسایشی طبیعی به ویژه مواد با منشأ گیاهی انجام شده است.

محققان نشان داده‌اند کورکومین ترکیبی فنولی است که حدود ۳٪ از ترکیب زردچوبه را به خود اختصاص می‌دهد و آثار ضداکسایشی در مقابل رادیکال‌های آزاد دارد (۱۱، ۱۵، ۱۸، ۲۵). فتما و همکارانش (۱۸) اثر کورکومین را در آسیب‌های اکسایشی و پراکسایش لیپیدی ناشی از آرسنیت سدیم در بافت‌های مختلف موش بررسی کرده‌اند. این محققان اظهار داشتند تزریق هم‌زمان کورکومین و آرسنیت سدیم باعث کاهش آثار سمی آرسنیت سدیم در کبد، کلیه، بیضه، ریه و مغز می‌شود. از این‌رو، نتیجه‌گیری کرده‌اند کورکومین تأثیر سودمندی بر مسمومیت ناشی از آرسنیت سدیم دارد (۱۸).

علاوه بر مکمل‌های ضداکسایشی، تأثیر ورزش بر وضعیت ضداکسایشی بدن نیز مطرح است. این موضوع مانند سکه‌ای دو روست که یک سوی آن تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن بر اثر ورزش و طرف دیگر آن افزایش فعالیت مواد ضداکسایشی مانند گلوتاتیون و سوپراکسیددیسموتاز به دنبال ورزش است. اما آنچه باید به آن دقت شود این است که شدت و مدت ورزش نقش مهمی در این رابطه ایفا می‌کند چرا که تحقیقات نشان داده‌اند ورزش استقامتی این توانایی را دارد که دفاع ضداکسایشی بدن را ارتقا دهد (۱، ۲، ۲۳).

محققان نشان دادند تمرینات استقامتی از طریق کاهش استرس‌های اکسایشی در بیضه نقش مهمی در باروری دارد (۲۷). تحت شرایط طبیعی (عدم وجود پیش‌تمرینی، تغذیهٔ مناسب و جزآن) تمرینات استقامتی تأثیر معکوسی بر کارکرد دستگاه تولیدمثل ندارد (۱۶، ۱۹). علی‌رغم وجود گزارش‌های پژوهشی متعدد مبنی بر آثار مثبت فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط در جلوگیری از استرس اکسایشی در بافت‌های مختلف بدن، همچنین در دستگاه تولید مثل، تاکنون پژوهشی مشاهده نشده است که به طور هم‌زمان به مطالعهٔ اثر یک دوره دویدن روی نوارگردان، مکمل ضداکسایشی کورکومین و یا ترکیبی از این دو بر ویژگی کیفی اسپرم، همچنین شاخص استرس اکسایشی در بیضه و اپیدیدیوم به ویژه در موش‌های در معرض آلاینده‌ای همچون سرب بپردازد. لذا، با توجه به آثار سرب بر ایجاد استرس اکسایشی (۱۲، ۲۰، ۲۲، ۲۴) و از طرف دیگر وجود ارتباط بین استرس اکسایشی و کارکرد تولید مثلی (۹، ۱۲، ۲۴) این فرض مطرح می‌شود

www.SID.ir
Archive of SID

تزریق هشت هفته‌ای سرب از طریق افزایش استرس اکسایشی- که با مالون دی‌آلدهید (MDA)[1] بافت بیضه نشان داده می‌شود- باعث کاهش کارکرد دستگاه تولید مثل می‌شود. بر این اساس هدف این مطالعه بررسی تأثیر تعاملی سرب، تمرینات ورزشی و مکمل ضداکسایشی بر برخی پارامترهای تولیدمثلی در موش‌های صحرایی است.

روش‌شناسی

جامعهٔ آماری و آزمودنی‌های پژوهش. جامعهٔ آماری پژوهش حاضر شصت سرموش صحرایی نر بالغ دو ماههٔ نژاد ویستار بودند که از مرکز انستیتو پاستور آمل خریداری شدند. پس از انتقال آزمودنی‌ها به محیط آزمایشگاه، به مدت یک هفته (هفتهٔ اول) جهت تطابق با محیط جدید و در طی دورهٔ پژوهش نیز به صورت گروه‌های چهار سرموش در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف و در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخهٔ تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی دورهٔ پژوهش نیز حیوانات غذای ساخت شرکت بهپرور را به صورت پلت و به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن و با توجه به وزن‌کشی هفتگی مصرف کردند. ضمناً آب مورد نیاز حیوان نیز به صورت آزاد و از طریق بطری‌های ویژه در دسترس قرار داشت. این حیوانات پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید و نحوهٔ فعالیت روی نوارگردان، به طور تصادفی به شش گروه پایه (بدون هیچ گونه مداخله‌ای)، شم (حلال کورکومین)، سرب، تمرین استقامتی هشت هفته‌ای، مکمل کورکومین و ترکیبی از تمرین و مکمل کورکومین تقسیم شدند.

نحوهٔ تهیه و تزریق محلول استات سرب و مکمل کورکومین. برای تهیهٔ این محلول ابتدا ۲ گرم از استات سرب را با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ وزن کردند و در ظرف مدرجی قرار دادند. سپس، به تدریج حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ سی‌سی رقیق شد. با توجه به نتایج پژوهش دنیل و همکارانش (۱۸) که تاثیر دوز ۲۰ میلی‌گرم استات سرب را بر ایجاد استرس در موش‌های صحرایی بررسی کردند، در این پژوهش نیز ۲۰ میلی‌گرم استات سرب به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی سه روز در هفته و به مدت هشت هفته به گروه‌های تمرین سرب و گروه سرب تزریق شد. در این میان، هم‌زمان با تزریق استات سرب به گروه‌های تمرینی، مکمل کورکومین، ترکیبی (تمرین+کورکومین) و گروه سرب به گروه شم نیز ۳۰ میلی‌گرم حلال کورکومین (اتیل اولیت) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیرصفاقی سه روز در هفته و به مدت هشت هفته تزریق شد. به‌علاوه، کورکومین نیز به صورت زیرصفاقی و به صورت محلول با اتیل اولیت در دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن یک روز در هفته و به مدت هشت هفته به گروه‌های مکمل و ترکیبی تزریق شد (۱۵).

برنامهٔ تمرین استقامتی. قبل از اجرای پروتکل تمرینی، آزمودنی‌ها به مدت چند روز با نحوهٔ انجام فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. برنامهٔ آشنایی شامل پنج جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۵ تا ۸ متر در دقیقه و شیب صفر درصد و به مدت ۵ تا ۱۰

1. Malondialdehyde

www.SID.ir
Archive of SID

دقیقه بود. برنامهٔ تمرینی گروه تمرینی عبارت بود از دویدن روی نوارگردان بدون شیب و ویژهٔ جوندگان که در آن تمرین با رعایت اصل اضافه‌بار به صورت پیشرونده بین ۶۴-۲۵ دقیقه و با سرعت بین ۲۲-۱۵ متر در دقیقه اجرا شد. این برنامه به مدت هشت هفته و هر هفته نیز در پنج جلسه اجرا گردید. برای گرم کردن نیز آزمودنی‌ها در ابتدای هر جلسهٔ تمرینی به مدت سه دقیقه با سرعت ۷ متر در دقیقه دویدند. سپس، برای رسیدن به سرعت مورد نظر به ازای هر دقیقه، ۲ متر در دقیقه به سرعت نوارگردان افزوده شد. برای سرد کردن بدن در انتهای هر جلسهٔ تمرینی نیز سرعت نوارگردان به طور معکوس کاهش یافت تا به سرعت اولیه برسد. کل برنامهٔ تمرینی روی نوارگردان بدون شیب انجام شد.

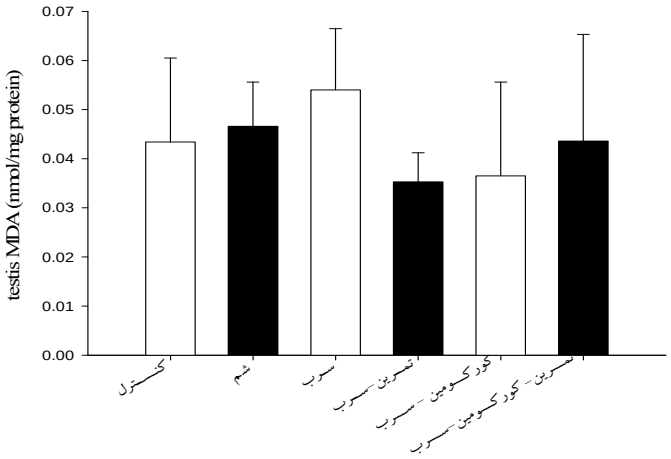
خون‌گیری و بافت‌برداری. در این تحقیق، برای جلوگیری از اثر سن بر تغییرات شاخص‌های مورد نظر در پژوهش، تمام حیوانات در انتهای پژوهش با شرایط کاملاً مشابه کشته شدند. تمام گروه‌ها در شرایط استراحتی (۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی و یا ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق) با کتامین و زایلازین با نسبت ۵ به ۲ بی‌هوش و سپس کشته شدند. سپس ۵ سی‌سی خون مستقیماً از قلب بیرون کشیده شد. خون لخته شده به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم حاصل از آن در تیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی قرار گرفت و برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام به آزمایشگاه منتقل شد.

بررسی ویژگی‌های کیفی اسپرم. برای ارزیابی ویژگی‌های اسپرم یکی از اپیدیدیوم‌ها بلافاصله برداشته شد، به خوبی تکه‌تکه شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول تیرود در دمای ۳۷°C قرار داده شد تا اسپرم‌ها به خوبی پخش شوند. سپس سوسپانسیون صاف شد. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نیز یک قطره از محلول صاف شده روی لام ریخته شد. سپس، در هوای آزاد خشک شد. نمونه‌ها در اتانول ۹۵٪ تثبیت شد. سپس، با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند. ۵۰۰ اسپرم به ازای هر نمونه شمارش شد. اسپرم‌های به لحاظ مورفولوژیایی غیر نرمال عبارت بودند از اسپرم‌های بدون سر، سر صاف، سر سوزنی، گردن خمیده، دم خمیده و اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های چندگانه. برای اندازه‌گیری تحرک‌پذیری، یک قطره از سوسپانسیون روی لام ریخته شد تا تعداد اسپرم‌های متحرک و غیرمتحرک توسط میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ شمارش شود. به علاوه، بیضه و اپیدیدیوم سمت دیگر حیوان جدا و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. سپس، در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید و پروتئین نگهداری شد.

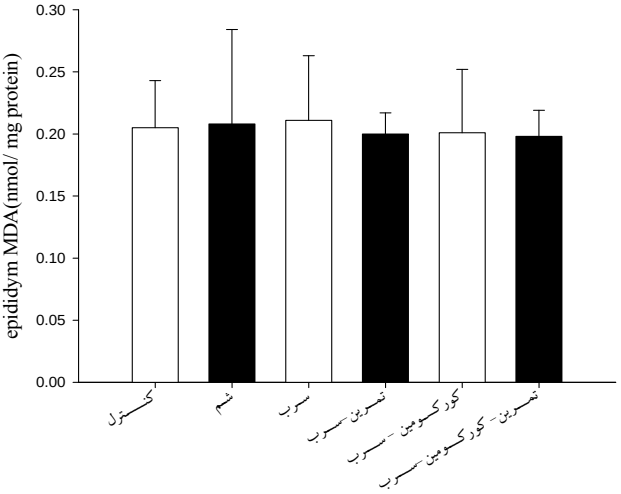
برای اندازه‌گیری وزن اندام‌های تولید مثلی، بیضه و اپیدیدیوم یک سمت (سمت چپ) موش‌ها برداشته شد. پس از جدا کردن اپیدیدیوم و بیضه از یکدیگر، همچنین جدا کردن چربی اپیدیدیوم‌ها به طور کاملاً مشابه وزن بیضه و اپیدیدیوم با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. به علاوه، بیضه و اپیدیدیوم سمت دیگر حیوان جدا و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شد. سپس، در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید و پروتئین نگهداری شد.

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید. در این تحقیق غلظت MDA با استفاده از روش تیوباربیتوریک

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۱. میانگین و انحراف معیار مالون دی‌آلدهید (nmol/mg protein) بیضه در گروه‌های مختلف



شکل ۲. میانگین و انحراف معیار مالون دی‌آلدهید(nmol/mg protein) اپیدیدیوم در گروه‌های مختلف پژوهش

www.SID.ir

جدول۱. میانگین و انحراف معیار مورفولوژی و تحرک‌پذیری اسپرم در گروه‌های مختلف پژوهش

شاخص / گروه	پایه	شم	سرب	تمرین و سرب	مکمل و سرب	تمرین،مکمل و سرب
مورفولوژی	۹۰/۵۸± ۴/۸۴	۸۷/۳۴ ±۲/۷۷	۸۶/۳۱ ±۴/۲۷	۸۹/۷۹±۲/۹۷	۸۸/۷۳±۳/۹۱	۹۲/۱۳±۴/۲
تحرک‌پذیری	۴۸/۱۸±۷/۵۸	۴۷/۱۶±۳/۹۵	۴۳/۶۹±۸/۸۲	۴۴/۹±۱۰/۷۶	۴۳/۶۹±۸/۲۸	۴۷/۴۵±۸/۳۸

جدول۲. میانگین و انحراف معیار مورفولوژی و تحرک‌پذیری اسپرم در گروه‌های مختلف پژوهش

شاخص / گروه	پایه	شم	سرب	تمرین و سرب	مکمل و سرب	تمرین،مکمل و سرب
نسبت وزن بیضه به وزن موش	۰/۰۰۴۴±۰/۰۰۰۷۸	۰/۰۰۳۹±۰/۰۰۰۸۳	۰/۰۰۴۸±۰/۰۰۰۵۱	۰/۰۰۴۹±۰/۰۰۰۳۱	۰/۰۰۴۶±۰/۰۰۰۸۳	۰/۰۰۴۶±۰/۰۰۰۲۹
نسبت وزن اپیدیدیوم به وزن موش	۰/۰۰۱۸۷±۰/۰۰۰۲۶	۰/۰۰۱۶۹±۰/۰۰۰۲۸	۰/۰۰۱۹۶±۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۱۸۹±۰/۰۰۰۱۴	۰/۰۰۱۸۸±۰/۰۰۰۱۹	۰/۰۰۱۷۴±۰/۰۰۰۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

اسید شرح دادهٔ رائو و همکارانش اندازه‌گیری گردید. ابتدا بافت‌ها به کمک نیتروژن مایع و هاون چینی پودر شدند و با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر بافر لایزیس (۵۰ میلی‌مولار تریس و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) هموژنیزه شدند. سپس، محلول هموژنیزه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به همراه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر در لولهٔ آزمایش ریخته شد و به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر معرف TBA (مقدار ۰/۶۷g از پودر ۲- تیوباربیتوریک اسید (TBA, Merck, Mw:۱۴۴.۱۵)) به همراه ml۱۰۰ آب مقطر در ظرفی حل شد. حدود ۰/۵g NaOH به محلول فوق اضافه گردید. در نهایت ml۱۰۰ اسید استیک گلاسیال به محلول فوق اضافه شد. سر لوله‌ها با ورقه‌های آلومینیومی کاملاً پوشانده شدند و به مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار گرفتند. پس از خنک شدن در دمای اتاق، لوله‌ها مجدداً در ۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت، جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۴ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV۱۶۰۰) خوانده شد. غلظت پروتئین نیز به روش برادفورد اندازه‌گیری شد. آلبومین سرم گاوی (Sigma, BSA) به عنوان پروتئین استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌های آماری. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن نحوهٔ توزیع داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به منظور بررسی تفاوت‌های بین گروهی هر یک از شاخص‌ها در سطح $P\leq ۰/۰۵$ استفاده شد. به علاوه، آزمون تعقیبی نیز برای تعیین این موضوع به کار رفت که تغییرات به دست آمده از آزمون‌های فوق در کدام گروه و یا شاخص معنادار است.

یافته‌ها

الف) نتایج مربوط به ویژگی‌های کیفی اسپرم

جدول ۱ میانگین و انحراف معیار مورفولوژی اسپرم را در گروه‌های مختلف پژوهش نشان می‌دهد. همان‌گونه که در جدول نیز ملاحظه می‌شود میانگین تحرک‌پذیری اسپرم در گروه سرب نسبت به گروه پایه، شم، تمرین- سرب، و گروه ترکیبی به ترتیب ۴/۴۲، ۳/۴۷، ۱/۲۱ و ۳/۷۶ درصد کمتر است. اما اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود ندارد. در مورد مورفولوژی نیز میانگین اسپرم‌های نرمال در گروه سرب نسبت به گروه‌های پایه، شم، تمرین- سرب، مکمل- سرب و گروه ترکیبی به ترتیب ۲۷/۴، ۱/۰۳، ۳/۴۸، ۲/۴۲ و ۵/۸۲ درصد کمتر است. همچنین، میانگین اسپرم‌های نرمال در گروه ترکیبی نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر است.

ب) نتایج مربوط به MDA بیضه و اپیدیدیوم

شکل‌های ۱ و ۲ نتایج مالون دی‌آلدهید بیضه و اپیدیدیوم را نشان می‌دهند. چنانچه از این جدول پیداست، میانگین مالون دی‌آلدهید بیضه در گروه سرب نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر است. میانگین MDA در گروه سرب نسبت به گروه‌های پایه، شم، تمرین- سرب، مکمل- سرب و گروه ترکیبی به ترتیب ۲۴/۴۲، ۱۵/۸۷، ۵۲/۹۷، ۹۴/۴۷ و ۲۳/۸۵

www.SID.ir
Archive of SID

درصد بیشتر است. همچنین، میانگین MDA در گروه‌های تمرین- سرب و مکمل- سرب نسبت به گروه پایه کمتر است اما میانگین MDA در گروه پایه و ترکیبی تقریباً یکسان است. همچنین، میانگین MDA اپیدیدیوم در گروه سرب نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر است. میانگین MDA در گروه سرب نسبت به گروه‌های پایه، شم، تمرین- سرب، مکمل- سرب و گروه ترکیبی به ترتیب ۲/۸۲، ۱/۲۹، ۵/۳۸، ۳/۳۲ و ۶/۳۹ درصد بیشتر است. همچنین، میانگین MDA در گروه‌های تمرین- سرب، مکمل- سرب و گروه ترکیبی نسبت به گروه پایه کمتر است.

ج) نتایج مربوط به نسبت وزن بیضه و اپیدیدیوم به وزن موش

میانگین و انحراف معیار نسبت وزن بیضه و اپیدیدیوم به وزن موش در جدول ۲ نشان داده شده است. باتوجه به داده‌های جدول ۲ میانگین نسبت وزن بیضه به وزن موش در گروه شم نسبت به گروه‌های پایه، سرب، تمرین-سرب، مکمل- سرب و گروه ترکیبی کمتر است. همچنین، میانگین نسبت وزن بیضه به وزن موش در گروه پایه نسبت به گروه‌های تمرین- سرب، مکمل- سرب و گروه ترکیبی کمتر است. همچنین، میانگین نسبت وزن اپیدیدیوم به وزن موش در گروه شم نسبت به گروه‌های دیگر کمتر است. میانگین نسبت وزن اپیدیدیوم به وزن موش در گروه پایه نسبت به گروه‌های تمرین- سرب و مکمل- سرب کمتر اما نسبت به گروه ترکیبی بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر مشخص شد القای زیرصفاقی سرب باعث خرابی پارامترهای تولید مثلی (تحرک‌پذیری و مورفولوژی اسپرم، MDA بیضه و اپیدیدیوم، وزن بیضه و اپیدیدیوم) شد. در مقابل، اگرچه اجرای پروتکل‌های درمانی شامل انجام تمرینات منظم بدنی و یا مکمل کورکومین تغییر معناداری در مقادیر این شاخص‌ها ایجاد نکرد، اما باعث مهار آثار زیانبار ناشی از القای سرب در شاخص‌های تولید مثلی شد. این موضوع به ویژه زمانی صادق است که ترکیبی از تمرین و مکمل کورکومین راهبرد درمانی به کار رفت. هر چند تحقیق کاملاً مرتبطی جهت مقایسهٔ یافته‌ها مشاهده نشد، اما این یافته‌ها در کل همسو با تحقیقات مورتی و همکارانش (۱۹۹۵)، پینون و همکارانش (۱۹۹۵) و مصطفی و همکارانش (۲۴) است که روی موش‌ها انجام دادند و نشان دادند تزریق استات سرب به ترتیب به مدت ۱۶، ۱۰ و ۸ هفته تأثیر معناداری روی تحرک‌پذیری اسپرم ندارد.

در مقابل، نتایج پژوهش حاضر در خصوص تأثیر القای زیرصفاقی سرب بر تحرک‌پذیری اسپرم با نتایج هلنا و همکارانش (۲۰) و سوزان و همکارانش (۱۶) همسو نیست. با وجود این، در پژوهش حاضر مشخص شد بین مورفولوژی اسپرم در گروه‌های مختلف تفاوت معناداری وجود ندارد، اما میانگین درصد اسپرم‌های نرمال در گروه ترکیبی در مقایسه با گروه‌های شم و سرب بیشتر بود.

این یافته با نتایج اسپومنکا و همکارانش (۲۰۰۷)، هلنا و همکارانش (۲۰) و سوزان و همکارانش (۱۶) همسوست، اما با نتایج مورتی و همکارانش (۱۹۹۵)، پینون و همکارانش (۱۹۹۵) غیر همسوست.

سازوکار عمل مسمومیت با سرب مورد توافق

www.SID.ir
Archive of SID

همگان نیست، اما اعتقاد بر این است که سرب روی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها عمل می‌کند، DNA را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ساخت پروتئین، RNA و DNA را تغییر می‌دهد (۱۲، ۲۲، ۲۴). سرب از جمله تولیدکننده‌های گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) است. این موضوع در این پژوهش نیز به نوعی تأیید شد، چرا که اندازه‌گیری سطوح مالون دی‌آلدهید (MDA)، شاخص استرس اکسایشیِ گروه‌های مختلف نشان داد تزریق سرب در آزمودنی‌ها باعث افزایش میانگین مالون دی‌آلدهید در گروه سرب نسبت به گروه پایه شد که این امر نشان‌دهندهٔ افزایش قابل توجه استرس اکسایشی در نتیجهٔ مسمومیت با سرب است.

افزایش آسیب اکسایشی حاصل از ROS نه تنها به ماهیت و میزان آن بستگی دارد بلکه به زمان و مدت استمرار آن و فاکتورهای خارج سلولی از جمله دما، شدت اکسیژن و ترکیبات مولکولی نظیر یون‌ها، پروتئین‌ها و جمع‌کنندگان ROS نیز بستگی دارد (۶، ۱۴). متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن با دو سازوکار اصلی باعث ناباروری می‌گردند. اول اینکه، ROS به غشای پلاسمایی اسپرم آسیب می‌رساند و در حقیقت تحرک اسپرم و توانایی آن را برای ادغام با اووسیت کاهش می‌دهد. دوم، ROS مستقیماً به DNA اسپرم آسیب می‌زند و باعث افزایش تعداد اسپرم‌های ناهنجار می‌شود (۲۸). هر سیگنال یا محرکی که تولید بالای ROS را به راه اندازد، ممکن است غشای داخلی و خارجی میتوکندری را به هم بریزد و منجر به آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری گردد. پروتئین سیتوکروم C با فعال کردن کاسپازها، سرانجام منجر به آپوپتوزیس سلولی می‌گردد (۴، ۱۴). به طور کلی، آسیب‌های القا شده با ROS منجر به از دست رفتن تحرک اسپرم، غیر فعال شدن آنزیم‌های گلیکولیزی و صدمه به غشاهای آکروزومی و اکسید شدن DNA و مرگ زودرس یا آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌گردد که مجموعهٔ این عوامل، سلول اسپرم را جهت بارورسازی تخمک ناتوان می‌سازد (۲۱، ۳۰).

در پژوهش حاضر، مشخص شد میانگین تحرک‌پذیری و مورفولوژی اسپرم در گروه‌های تمرین- سرب، مکمل کورکومین- سرب و گروه ترکیبی در مقایسه با گروه سرب بیشتر است. از این یافته می‌توان نتیجه گرفت اعمال این متغیرها احتمالاً از طریق افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن باعث افزایش میانگین تحرک‌پذیری و مورفولوژی اسپرم در گروه‌های درمان شده است.

محققان گزارش دادند تمرینات با شدت متوسط آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و با تنظیم افزایشی ژن‌های ضد اکسایشی باعث بهبود کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه سرب می‌شود (۲۳، ۲۷). در این تحقیق، کورکومین مادهٔ ضداکسایش به کار رفت تا بتوان آثار احتمالی مهاری ناشی از سمیت سرب و نیز اختلالات ناشی از آن را مطالعه کرد. رادیکال‌های فعال اکسیژن نظیر آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل در ایجاد صدمات اکسایشی نقش دارند، لذا پاکسازی این عوامل در جلوگیری از بروز بیماری‌های مختلف و سرطان مفید است. آثار ضداکسایشی کورکومین در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد را محققان تأیید کرده‌اند، ولی این آثار اغلب وابسته به دوز و

www.SID.ir

شرایط محیطی هستند (۱۱، ۱۵، ۱۸). یاجینگ شان و همکارانش (۳۰) در تحقیقی نشان دادند کورکومین می‌تواند مادهٔ ضداکسایشی قوی در برابر استرس‌های اکسایشی و آثار ناشی از آن استفاده شود.

همچنین، ماکوسود و همکارانش (۷) که در تحقیقی به بررسی اثر کورکومین بر سرب پرداخته بودند، به این نتیجه دست یافتند که کورکومین مادهٔ غذایی ضداکسایشی قوی است و نقش مهمی در مهار آثار ناشی از سمیت سرب دارد و می‌تواند آن را مهار کند.

در تحقیقی دیگر نیز امار و همکارانش (۱۱) اثر کورکومین در مقابل آسیب‌های اکسایشی ناشی از کروم را در سیستم تولید مثلی موش‌های نر بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند که تزریق کروم باعث تغییر بافت بیضه، کاهش غلظت اسپرم، کاهش میزان تستوسترون، کاهش وزن اندام‌های تناسلی، افزایش میزان پراکسایش لیپیدی و کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود، در حالی که تزریق کورکومین به تنهایی، همچنین تزریق هم‌زمان کورکومین و کروم از این تغییرات جلوگیری می‌کند. بنابراین، نتیجه گرفتند که کورکومین نقش محافظتی در مقابل آسیب اکسایشی ناشی از کروم در سیستم تولید مثلی موش‌های نر دارد.

کورکومین آنتی‌اکسیدان جمع‌کننده با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد است و پراکسایش لیپیدهای غشا را مهار می‌کند. هشت هفته تمرین استقامتی، دریافت مکمل کورکومین و ترکیب تمرین استقامتی و مکمل کورکومین تغییر معناداری در مالون دی‌آلدهید بیضهٔ موش‌های دریافت‌کنندهٔ سرب ایجاد نکرد. اما میانگین مالون دی‌آلدهید بیضه در گروه سرب در مقایسه با گروه تمرین- سرب افزایش قابل توجهی داشت. این یافته نشان می‌دهد استفاده از تمرینات استقامتی در مقایسه با مکمل کورکومین تأثیر بیشتری در جلوگیری از استرس اکسایشی ناشی از سرب داشته است. میزان مالون دی‌آلدهید اپیدیدیوم نیز در گروه سرب نسبت به دیگر گروه‌ها به ویژه گروه‌های تمرین- سرب، مکمل سرب و گروه ترکیبی بیشتر بود. افزایش میزان MDA در گروه سرب نشان‌دهندهٔ افزایش آسیب اکسایشی ناشی از سرب در سیستم تولید مثلی است.

اسپرماتوزوآ، برخلاف دیگر سلول‌ها، ساختار و عمل متفاوتی دارد و به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، دارای چند پیوند دوگانه (PUFA) در غشای پلاسمایی و میزان فوق‌العاده ناچیز آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی است و نسبت به آسیب اکسایشی بسیار حساس است (۶).

پراکسید شدن اسیدهای چرب غشا به از دست رفتن سیالیت غشا و کاهش در فعالیت آنزیم‌های غشا و کانال یونی و در نتیجه از دست دادن تدریجی توانایی اسپرم‌ها جهت اتصال به اووسیت منجر می‌شود (۵). مهم‌ترین اثر LPO در تمام سلول‌ها به ویژه اسپرم، به هم ریختگی ساختار غشا (سلولی یا ارگانلی) و عمل غشا (فرایندهای انتقال یون، سیالیت و نفوذپذیری، گرادیان‌های سوخت‌وسازی و جزآن) است. در کنار این آثار غشایی، LPO به DNA و پروتئین‌ها نیز آسیب می‌رساند (۲۱).

آلدهیدهای سیتوتوکسیک حاصل از LPO از طریق واکنش‌پذیری با گروه تیول در پروتئین‌ها به طور کووالانسی به آن‌ها متصل می‌شوند و عملکرد

www.SID.ir
Archive of SID

پروتئین را تغییر می‌دهند. همچنین، می‌توانند از طریق رادیکال‌های آلکوکسیل و پراکسیل باعث اکسایش بازهای DNA (به‌ویژه گروه‌های آمینوگوانوزین) شوند و ترکیبات اضافی حلقوی[1] را تشکیل دهند (۲۹). این تغییرات سلولی که با LPO ایجاد می‌شوند روی پارامترهای اسپرمی و عملکرد آن‌ها تأثیر عمده‌ای می‌گذارد (۱۰).

یکی دیگر از فاکتورهای تولیدمثلی، وزن ارگان‌های تولید مثلی است. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد بین نسبت وزن بیضه و اپیدیدیوم به وزن موش در هیچ‌کدام از گروه‌ها تفاوت معناداری وجود ندارد اما میانگین نسبت وزن بیضه و اپیدیدیوم به وزن موش در گروه سرب، تمرین- سرب و ترکیبی در مقایسه با گروه شم بیشتر بود. این موضوع احتمالاً به دلیل رسوب سرب در گروه‌هایی است که سرب دریافت کرده‌اند و از آنجا که بین این گروه‌ها و گروه پایه تفاوت زیادی وجود ندارد، بنابراین استرس ناشی از تزریق نیز یکی دیگر از دلایل این اختلاف است.

ایت و همکارانش (۲۰۰۹) در تحقیقی نشان دادند دریافت سرب به مدت ۹۰ روز باعث کاهش وزن بیضه و اپیدیدیوم و هیپوفیز در موش‌ها می‌شود. سرب از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش آسیب‌های اکسایشی می‌شود. در نتیجه، نکروز بافت‌های بدن به ویژه بافت‌های تولید مثلی را به دنبال دارد.

نتیجه اینکه؛

قرارگیری مداوم در معرض آلاینده‌ای موسوم به استات سرب عمدتاً از طریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث استرس اکسایشی و آسیب به بافت می‌شود و اتخاذ راهبردهای شیوهٔ سالم زندگی از قبیل انجام فعالیت منظم بدنی و یا مکمل‌های ضداکسایشی گیاهی به ویژه ترکیبی از این دو فقط باعث مهار آثار زیانبار ناشی از قرارگیری در معرض سرب بر کیفیت و یا کمیت شاخص‌های تولید مثلی می‌شود. علی‌رغم این موارد، مطالعات بیشتری برای تأیید این یافته‌ها مورد نیاز است.

1. cyclic adducts

www.SID.ir
Archive of SID

منابع

۱- دبیدی روشن، ولی‌الله؛ گائینی، عباسعلی؛ رواسی، علی‌اصغر؛ جوادی، ابراهیم ،۱۳۸۴، اثر یک دورهٔ تمرین تداومی بر CRP موش‌های صحرایی نژاد ویستار، فصلنامهٔ المپیک، سال سیزدهم، ش ۲ (۳۰).

۲- سیاه کوهیان، معرفت؛ جوادی، ابراهیم؛ قراخانلو، رضا؛ ناظم، فرزاد ،۱۳۸۲، مقایسهٔ اثر شدت تمرینات هوازی بر عامل‌های خطرزای قلبی- عروقی در مردان بزرگسال، فصلنامهٔ المپیک، سال یازدهم- ش ۱ و ۲ (۲۳).

۳- عسلی، محمد؛ دبیدی روشن، ولی‌الله؛ حاجی‌زاده مقدم، اکبر؛ ۱۳۹۰، التهاب و آسیب قلبی ناشی از آلودگی سرب و نقش مهاری تمرینات منظم هوازی، فصلنامه المپیک، سال نوزدهم، ش۴(۵۶)، ۱۲۴-۱۱۳.

4- Agrwal, A.; Prabakaran, S.A. (2005). "Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology". India J Exp Biol., 43: 963-74.

5- Agarwal, A.; Nallella, K.P.; Allamaneni, S.S.; Said, T.M. (2004). "Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature". Reprod Biomed Online, 8: 616–27.

6- Agarwal, A.; Ramadan, A.; Saleh, M.D. (2002). "Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment". Urolo Clinics of North America, 29: 1-12.

7- Ahamed, Maqusood; Siddiqui, Mohd; Kaleem, Javed (2007). "Environmental lead toxicity and nutritional factors". Clinical Nutrition, 26, 400– 408.

8- Ahamed, M.; Siddiqui, M.K. (2007). "Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions". Clinica Chimica Acta, 383 ; 57– 64.

9- Ait, H.N.; Slimani, M.; Merad, B.B.; Zaoui, C. (2009). "Reproductive Toxicity of Lead Acetate in Adult Male Rats". American Journal of Scientific Research, 3:38-50.

10- Aitken, R.J. (1995). "Free radicals, lipid peroxidation and sperm function". Reprod Fertil Dev., 7:659–68.

11- Amar, K.; Aparajita, C.; Rituparna, G.; Mahitosh, S. (2007). "Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system". Environmental Toxicology and Pharmacology, 24;160-166.

12- Aziza, A.; Ahmed, A.; Mahmoud, S.; Nabila, S. (2009). "Protective effect of Aquilegia vulgaris (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats". Food and Chemical Toxicology, 47; 2209–2215.

13- Chunhong, W.; Yan, Z.; Jiancheng, L.; Guang, S.; Yan, W. (2006). "Impacts of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis". Clinica Chimica Acta, 370, 82–88.

14- Cocuzza, M.; Sikka, S.C.; Athayde, K.S.; Agarwal, A. (2007). "Clinical relevance of oxidative stress and sperm choramatin damage in male infertility: an evidence based analysis". Inter Braz J Urol., 33 (5): 603-21.

15- Daniel, Sh.; Limson, J.L.; Dairam, A.; Watkins, G.M.; Daya, S. (2004). "Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium –induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain". Journal Of Inorganic Biochemistry, 98:266-275.

16- De Souzam, J.; Arce, J.C.; Pescatellol, S.; Scherzerh, S.; Luciano, A.A. (1994). "Gonadal hormones and semen quality in male runners : a volume threshold effect of endurance training". Int J Sports Med., 15(7):383-391.

17- Fatma, G.; Suna, K.; Dilek, D.; Filiz, D.; Yusuf, K. (2009). "Malathion-induced testicular toxicity in male rats

www.SID.ir
Archive of SID

and the protective effect of vitamins C and E". Food and Chemical Toxicology, 47 ; 1903–1908.

18- Fatma, M.; Demerdash, E.; Mokhtar, I.; Fatma, M.E. (2008). "Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs". Food and Chemical Toxicology, 47 ; 249–254.

19- Gebreegziabher, Y.; Marcos, E.; McKinon, W.; Rogers, G. (2004). "Sperm characteristics of endurance trained cyclists". Int J Sports Med., 25(4):247-51.

20- Helena, O.; Marcello, S.; Conceição, S.; Maria, D. (2009). "Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice". Cell Biol Toxicol, 25:341–353.

21- Maneesh, M. Jayalekshmi, H. (2006). "Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction". Indian J of Clinical Biochemistry, 21(2): 80-9.

22- Manuel, M.; Mark, A.; Rafael, M.; Pilar, C. (2009). "Reduced sperm quality in relation to oxidative stress in red deer from a lead mining area". Environmental Pollution, 157 ; 2209–2215.

23- Mari-Carmen; Gomez-Cabrera; Elena, D.; Jose, V. (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training". Free Radical Biology & Medicine, 44 ;126–131.

24- Mustafa, S.; Gaffari, T.; Abdurrauf, Y. (2005). "The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats". Theriogenology, 63 ;2063–2072.

25- Radha, K.; Anoop, K.; Jaya, G.; Rikhab, C.S. (2006). "Multiple biological activities of curcumin: A short review". Life Sciences, 78; 2081–2087.

26- Sikka, S.C. (1996). "Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function". Frontiers in Bioscience, 1: 78-86.

27- Srinivasulu, C.;Tae, G.S.; Dng-Hoon, H.; Justin, D.L.; Mohamed, R.M.; Jason, S.; Shuan, C.L.; Mark, P.M. (2008). "Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice". Journal of endocrinology, 199:333-341.

28- Tremellen, K. (2008). "Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective". Human Reprod Update, 14 (3 pp): 243–58.

29- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T.D. (2005). "Metals, Toxicity and Oxidative Stress". Current Medicinal Chemistry, 12: 1161-208.

30- Ya-Jing, Shang; Xiao-Ling, Jin; Xian-Ling, Shang; Jiang-Jiang, Tang; Guo-Yun, Liu; Fang, Dai; Yi-Ping, Qian; Gui-Juan, Fan; Qiang, Liu; Bo, Zhou (2010). "Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure–activity relationship and influence of microenvironment". Food Chemistry, 119 1435–1442.

Archive of SID

www.SID.ir