Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۱، جلد ۱۳، شماره ۴، پاییز ۹۹، صفحه۱۳ تا ۲۴
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی اثرات سولفات مس برروی کیفیت پارامترهای اسپرم، میزان قطعه قطعه شدن DNA و بافت بیضه موش‌های بالغ نژاد ویستار

حمید پیروزمنش [۱]، راحیل جنتی فر[۱]، لیلا ناصرپور[۱]
۱- زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، واحد تحقیقات جهاددانشگاهی، قم،ایران. rahiljanati2016@gmail.com

تاریخ دریافت:۹۹/٤/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/٦/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: سولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده های زیست محیطی است که دارای توان تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سولفات مس برروی کیفیت پارامترهای اسپرم، میزان قطعه قطعه شدن DNA و بافت بیضه موش‌های بالغ نژاد ویستار می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۳۰ موش‌های نژاد ویستار بالغ با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌های بالغ تصادفی در ۳ گروه کنترل، دریافت کننده سولفات مس با غلظت(mg/kg100) و غلظت(mg/kg200) به مدت زمان ٥٦ روز مورد تیمار قرار گرفتند. در پایان دوره تیمار، وزن بیضه، ثبت و پارامترهای اسپرم بر اساس(WHO2010) بررسی شد.کیفیت کروماتین اسپرم، توسط رنگ‌آمیزی های هسته‌ای آکریدین اورانژ ارزیابی، سطح مالون دی آلدهید اندازه‌گیری و داده‌ها با روش آماری One-Way ANOVA آنالیز شدند.

یافته ها: کیفیت پارامترهای اسپرم در سولفات مس با غلظت mg/kg200 کاهش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵). وزن بیضه در دوز mg/kg200 کاهش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵). قطر لوله‌های منی ساز، سطح هورمون تستوسترون، تعداد سلول های جنسی و میزان تکه‌تکه شدن DNA اسپرم در دوز mg/kg200 کاهش یافت(P<۰/۰۵). غلظت مالون دی آلدهید با دوز 200 mg/kg سولفات مس به طور معنی داری افزایش داشت(P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که سولفات مس در غلظت بالا باعث ایجاد اثرات مخرب بر روی کیفیت اسپرم و بافت بیضه می‌شود.

واژه های کلیدی: سولفات مس، کیفیت اسپرم، بافت بیضه، قطعه قطعه شدن DNA.

مقدمه

مس به عنوان یک عنصر اساسی در حفظ عملکرد موجودات زنده ضروری است. حیوانات در طول کل زندگی خود در معرض مس و مشتقات صنعتی آن از طریق مواد غذایی یا آلودگی های زیست محیطی قرار می‌گیرند(۱۰، ۲). تظاهرات بالینی مرتبط با مسمومیت مس در قسمت‌های مختلف بدن شامل کبد، کلیه، طحال، ریه و روده مشاهده می‌شود(۱۶). جذب مس از طریق دستگاه گوارش تحت تأثیر تعدادی از ترکیبات نظیر(اکسیدها، هیدروکسیدها، سیترات‌ها و سولفات‌ها) انجام می‌شود(۲). سولفات مس متداول ترین نمک مس می‌باشد؛ با این حال، دیگر نمک های مس شامل کربنات، سیانید، اکسید و سولفید نیز وجود دارند(۱). هم‌چنین یون مس و مشتقات صنعتی در غلظت‌های مختلف در سیستم تولید مثل زن و مرد وجود دارد(۲۳، ۵). قرار گرفتن در معرض آلاینده های زیست محیطی باعث ایجاد اثرات مخرب پاتوفیزیولوژی در باروری از جمله کاهش کیفیت پارامترهای اسپرم، تغییر در وضعیت پاتولوژی بافت بیضه و افزایش شیوع ناهنجاری‌های تکاملی دستگاه تولید مثل مردان می‌شود(۲۳). جذب بیش از حد مس باعث ایجاد افزایش ROS شده ودر نهایت منجر به ایجاد استرس و

www.SID.ir

Archive of SID

آسیب های اکسیداتیو در بافت بیضه می شود(۱۸). نتایج برخی از مطالعات نشـــان می‌دهد، افزایش یون مس به عنوان یک فلز سـنگین وآلاینده زیسـت محیطی می‌تواند موجب کاهش تعداد اسـپرم، حیات و مورفولوژی اسـپرم شود(۲۷، ۲۶). درمطالعه دیگر نشان داده شد که مصرف طولانی مدت سـولفات مس باعث کاهش کیفیت اسپرم، کاهش وزن بیضـــه و بدن در موش‌های صـــحرایی نر بالغ می‌شـــود(۶). ســـولفـات مس از طریق مکـانیســـم‌هـای فیزیولوژیـک بـاعـث کـاهش غلظـت FSH، LH و تستوسترون و اختلال در عملکرد غدد جنسی و اختلالات در اسپرماتوژنز می شود(۱۵). در مطالعات سال‌های اخیر برخی از پژوهشـــگران اثبات کرده‌اند که وجود عوامل محیطی نظیر آلودگی محیط زیستی، فلزات سنگین وغیره می‌توانند بر روی سیسـتم تولید مثل اثرات مخربی داشـته باشـند. در برخی از مطالعات، فلزات سـنگین را به عنوان آلاینـده‌هـای زیســـت محیطی معرفی می‌کننـد. نقش بیولوژیکی مس شامل: کاتالیز انتقال الکترون با استفاده از حالت اکسیداسیون می‌باشد. هم‌چنین مس به عنوان یکی از مهم‌ترین مواد معدنی، برای برخی از پاســـخ‌های ایمنی بدن لازم و ضـــروری می‌باشـــد(۷). اگرچه مقادیر کم غلظت مس برای برقراری شـــرایط متعادل فیزیولوژیکی ضروری است، اما نتایج مطالعات متعدد اثبات می‌کند که غلظت بیش از حد یا ناکافی این عنصر باعث ایجاد سمیت و ایجاد اثرات جبران ناپذیر خواهد شد(۴). به نظر می‌رسد نقش مس در ظرفیت تولید مثل مردان تا حد زیادی ناشناخته است، اما این فلز سنگین موجب تغییر ساختار و عملکرد اســپرم و هم‌چنین تغییر در گیرنده های هیپوفیز شده و در نهایت سبب کاهش ترشح هورمون مردانه و در نهایت موجب آسیب به سیستم تولید مثلی می شود(۲۴، ۲۰).

ضرورت انجام مطالعه

با توجه به این که ســـولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده های زیســـت محیطی اســـت و قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد بنابر این ممکن است غلظت های بالای سولفات مس موجب آسـیب به انواع مختلف سـلول ها و بافت ها شود. لذا در این مطالعه غلظت های مختلف سولفات مس را برروی سیستم تولید مثلی رت های بالغ بررسی گردید. در مطالعه حال حاضر اثرات سولفات مس برروی کیفیت پارامترهای اسپرمی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی و هورمون جنسی(تستوسترون) ومیزان MDA به عنوان نشانگرهای اکسید کننده استرس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

دراین مطالعه تجربی تعداد ۳۰ موش صـــحرایی نژاد ویســـتار نر با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از بخش حیوانات انستیتو پاستور تهران تهیه شد. موش‌ها در یک محیط کنترل شده، در دمای ۲۶ -۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۵-۴۵ درصد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تمام موش‌ها به مدت یک هفته برای سازش با محیط به صورت جداگانه نگهداری و با غذای استاندارد تغذیه شدند. پس از این مدت موش‌های نر بر اســـاس وزن، به ۳ گروه ۱۰تایی تقسـیم شـدند. پس از بررسـی مقادیر مورد نیاز سـولفات مس موش صـحرایی، غذای اســـتاندارد به همراه دو دوز متفاوت از ســـولفات مس(mg/kg100 و mg/kg200) بـه مـدت ۵۶ روز در اختیار موش‌ها قرار گرفت.گروه کنترل غذای اســـتاندارد بـدون ســـولفـات مس و گروه‌هـای تجربی بـه ترتیـب mg/kg100 و mg/kg200 غذای اســـتاندارد در یافت کردند(۲۲). پس از پایان دوره تیمار، حیوانات، وزن شده و توسـط دی اتیل اتر، بیهوش و سـرانجام کشـته شـدند؛ سـپس ناحیه دمی اپیدیدیم چپ آن‌ها جدا شـده و برای آنالیز پارامترهای اسـپرم، مورد اسـتفاده قرار گرفت؛

www.SID.ir

Archive of SID

هم‌چنین بیضه چپ، خارج شد؛ وزن آن ثبت شد و از آن برای بررسی‌های بافت شناسی استفاده شد.

بررسی تعداد اسپرم

برای بررسی تعداد اسپرم ابتدا اپیدیدیم جداشد. سپس ناحیه دمی اپیدیدم درظرف حاوی محیط کشت Ham's F10 منتقل گردید و برای خروج اسپرم‌ها، به چند قطعه برش داده شد. ده دقیقه بعد، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون محیط کشت حاوی اسپرم، با ۹۰۰ میکرولیتر فیکساتیو فرمالین ٪۲ با نسبت(۱:۹) رقیق شد. سپس تعداد اسپرم‌ها با استفاده ازلام نئوبار، در زیرمیکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰، شمارش شد. شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی(WHO 2010) انجام شد(۱۷) و تعداد اسپرم در میلی لیتر مکعب محاسبه گردید.

بررسی قابلیت تحرک اسپرم

سنجش تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل(WHO2010) انجام شد؛ بدین ترتیب که ابتدا 10 µl از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم روی لام نئوبار منتقل و حداقل ۲۰۰ اسپرم و ۵ میدان دید برای تعیین درصد تحرک در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰× مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی، درصد تحرک اسپرم محاسبه گردید.

بررسی قابلیت حیات اسپرم

برای سنجش قابلیت حیات اسپرم، بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی(WHO 2010) و رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین انجام گرفت. بدین منظور ابتدا نسبت یک حجم سوسپانسیون اسپرم و دو حجم ائوزین، در میکروتیوب مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، حجم مساوی از محلول نگروزین به آن اضافه شد و گسترش نازکی از نمونه بر روی لام ایجاد گردید. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ معمولی با عدسی X۱۰۰۰، تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه گردید. در این رنگ آمیزی، سر اسپرم‌های زنده، سفید و سر اسپرم‌های مرده، قرمز رنگ شد.

بررسی مورفولوژیکی اسپرم

برای بررسی مورفولوژی اسپرم ها از همان نمونه ای که برای بررسی تحرک اسپرم تهیه شده بود استفاده گردید بدین صورت که گستره ای بر روی لام تهیه شد، و بعد در مجاورت هوا خشک گردید. سپس یک‌بار به آرامی با آب مقطر شستشو داده شد و دوباره در مجاورت هوا خشک گردید. سپس زیر میکروسکوپ نوری با دید ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت. در هر نمونه تعداد ۳۰۰ اسپرم بطور دقیق بررسی شدند(۹). اسپرم‌ها بر اساس شکل ظاهری به ۵ گروه تقسیم شدند: ۱ -طبیعی ۲ -بدون دم ۳ -ناهنجاری سر با دم سالم ۴ -ناهنجاری دم با سر سالم ۵ -ناهنجاری توام سر و دم.

آماده سازی نمونه برای بررسی بافت بیضه

بیضه چپ، بعد از خروج از بدن موش، در فیکساتیو MDF قرار داده شد. سپس برش‌گیری و پاساژ بافتی انجام شد. سرانجام به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی بافت بیضه، لام‌های ۵ میکرونی با روش هماتوکسیلین – ائوزین(H&E) رنگ آمیزی شدند. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و قطرلوله‌های منی‌ساز در هر نمونه لوله منی‌ساز با بزرگنمایی X1000 میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

روش اندازه گیری هورمون تستوسترون

تستوسترون با استفاده از کیت الیزا شرکت(DRGآلمان) اندازه‌گیری گردید. به طور خلاصه نمونه‌ها در چاهک ریخته شده و سپس محلول تستوسترون و محلول آنتی تستوسترون اضافه شد و به مدت ۹۰دقیقه در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. چاهک‌ها سپس با آب دیونیزه شستشو و سوبسترا به هر چاهک افزوده و برای مدت ۲۰دقیقه انکوبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش با افزودن محلول متوقف کننده، متوقف و جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

روش اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی(MDA)

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید(MDA) با استفاده از روش Buege و Aust صورت پذیرفت(۷). در این روش ابتدا ۱ ml از سرم را به ۱ ml از تری کلرواستیک اسید، افزوده و پس از مخلوط شدن، در دور g۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۳ محلول تیوباربیتوریک اسید را به ml۱/۵ از محلول رویی سانتریفوژ شده افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از خارج نمودن، لوله‌ها را خنک نموده و جذب آن‌ها در طول موج 535 nm بررسی گردید.

روش آماری آنالیز داده‌ها

داده‌های حاصل،توسط نرم افزار SPSS ویرایش(۲۲) و با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه One way ANOVA و آزمون متعاقب،Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح(P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس برروی وزن بیضه

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش معنی‌داری در وزن بیضه دربین گروه دریافت کننده سولفات مس mg/kg200 نسبت به دو گروه دیگر وجود دارد(جدول۱)(P<۰/۰۵).

تغییرات هیستوپاتولوژیکی

لوله‌های منی‌ساز در موش‌های گروه کنترل از لحاظ شکل ظاهری دارای مورفولوژی سالم و هیچ گونه آتروفی مشاهده نشد هم‌چنین در داخل لوله‌های منی ساز، اسپرم با مورفولوژی طبیعی نیز وجود داشت(شکل۱). بیضه گروه‌های تحت درمان با سولفات مس، با درجات مختلفی از آتروفی همراه بود. در روز ۵۶، تقریباً تمام لوله‌های منی ساز به طور کامل تخریب شدند و فقط یک لایه از سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی حضور داشتند(شکل۱). بررسی‌های بافت شناسی بافت بیضه موش‌های تحت تیمار نشان داد که قطر لوله منی ساز در گروهی که سولفات مس را با دوز mg/kg 200 را در ۵۶ روز دریافت کرده اند نسبت به گروه کنترل و گروهی که mg/kg 100 دریافت کرده بود کاهش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵)(جدول ۲). میانگین تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در موش‌های گروه کنترل و سولفات مس در روز ۵۶ پس از شروع مصرف سولفات مس در جدول(۲) نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در در گروه mg/kg200 و مدت زمان ۵۶ روز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت(P<۰/۰۵). در مطالعه حال حاضر، هم‌چنین میانگین تعداد سلول‌های اسپرم در دوز mg/kg 200 در روز ۵۶ کاهش معنی‌داری داشت(جدول۲).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس سولفات برروی میزان غلظت هورمون تستوسترون سرم خون

مقایسه میزان غلظت هورمون تستوسترون موجود در سرم خون گروه(mg/kg 200) در مدت زمان ۵۶ روز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵). این در صورتی است که در گروه(mg/kg 100) در مدت زمان ۵۶ هیچ گونه اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد(P≥۰/۰۵).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس سولفات برروی میزان غلظت پراکسیداسیون لیپیدی

مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپیدی در سرم خون گروه mg/kg ۲۰۰ در مدت زمان ۵۶ روز نسبت به گروه کنترل و گروه mg/kg ۱۰۰، افزایش معنی‌داری داشت(P<۰/۰۵).

بر سی اثر غلظت های مختلف سولفات مس برروی پارامترهای اسپرم

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تحرک و مورفولوژی اسپرم در گروه mg/kg 200 در مدت زمان ۵۶ روز کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل و mg/kg 100 داشت($P<0/05$)(جدول ۵). میانگین درصد اسپرم های زنده(قابلیت حیات) در گروه mg/kg 200 نسبت به گروه کنترل و mg/kg100 کاهش معنی‌داری یافت($P<0/05$)(جدول ۵). بررسی میزان یک‌پارچگی و شکست DNA اسپرم با رنگ آمیزی AO نشان داد که در گروه mg/kg 200 در مدت زمان ۵۶ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت(جدول ۳ و شکل ۲).

جدول ۱- مقایسه بین وزن بیضه(وزن / گرم) در گروه های مختلف *($P<0/05$)

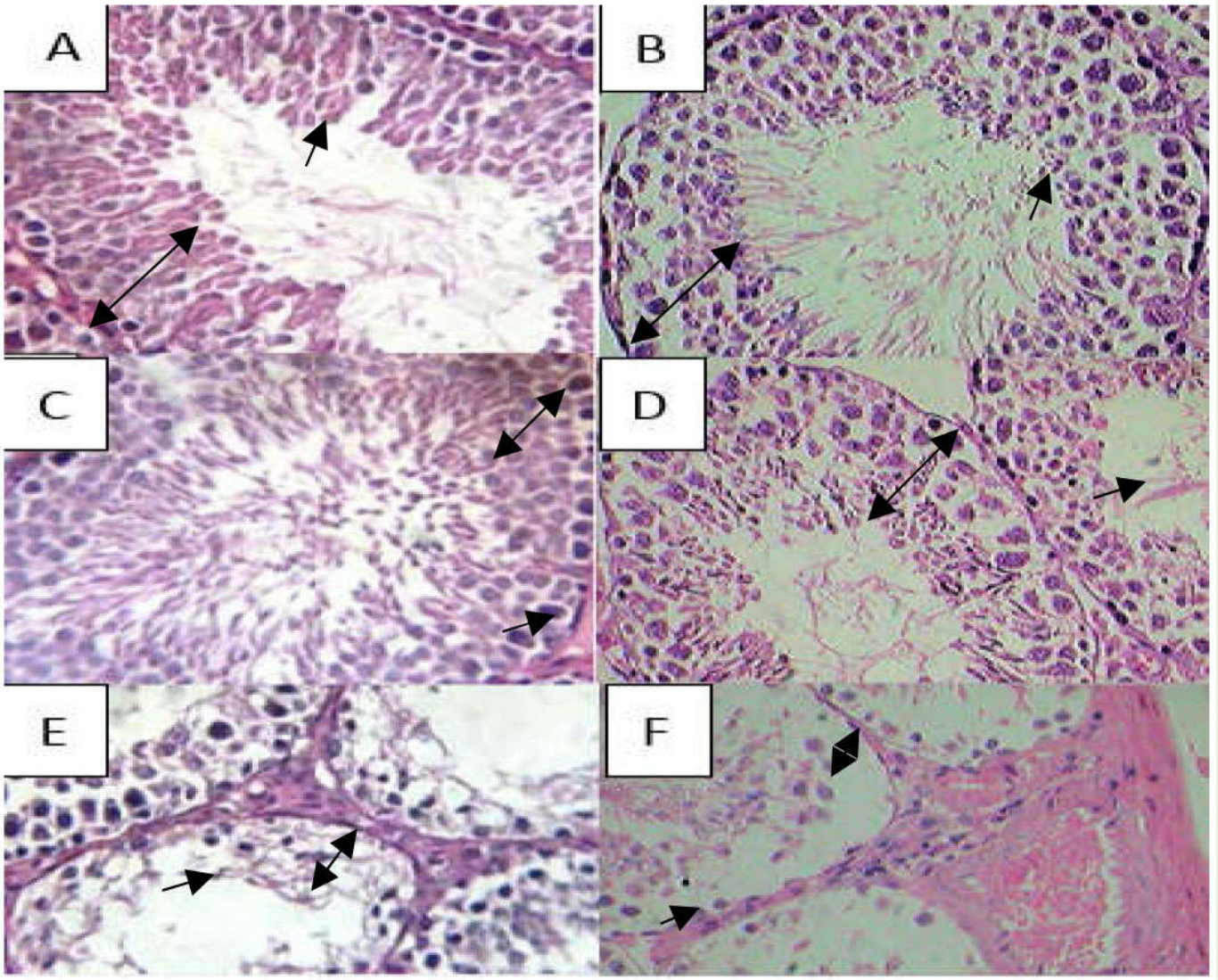
نتایج وزن بیضه (gr)	۵۶ روز
گروه ها	
گروه کنترل	۱۳۵۴ ±۳۲/۱۶
۱۰۰mg/kg	۱۲۱۶/۵۴ ±۲۹/۹۸
۲۰۰mg/kg	۱۱۷۹/۵۴ ±۲۷/۸۹*

جدول ۲- مقایسه بین قطر لوله‌های منی ساز، سلول‌های جنسی در گروه‌های مختلف * ($P<0/05$)

گروه ها / پارامترها	کنترل	۱۰۰ mg/kg	۲۰۰ mg/kg
قطر لوله های منی ساز(µ)	۶۳/۶ ±۲/۱۶۹	۵۸/۸ ±۱/۷۶۶	۵۳/۴ ±۲/۲۳۴*
تعداد سلول های اسپرماتوگونی(10^6)	۴۵/۴±۱/۲۳۶	۳۸/۳±۱/۸۰	۳۸/۳±۱/۶۷۵*
تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه(10^6)	۴۵,۶ ± ۱,۲۸۴	۴۲,۹۵ ± ۱,۲۶	۳۸,۳ ± ۱/۸۰*
تعداد سلول های اسپرماتید (10^6)	۴۷,۱ ± ۱,۹۳۴	۴۳,۳ ± ۲,۰۶	۳۹,۳۵ ±۱ /۶۵*
تعدادسلول های اسپرم (10^6)	۵۳,۹ ± ۱,۷۱۶	۴۸,۸ ± ۲,۱	۳۶,۰۵ ± ۲/۱۵*

www.SID.ir

Archive of SID

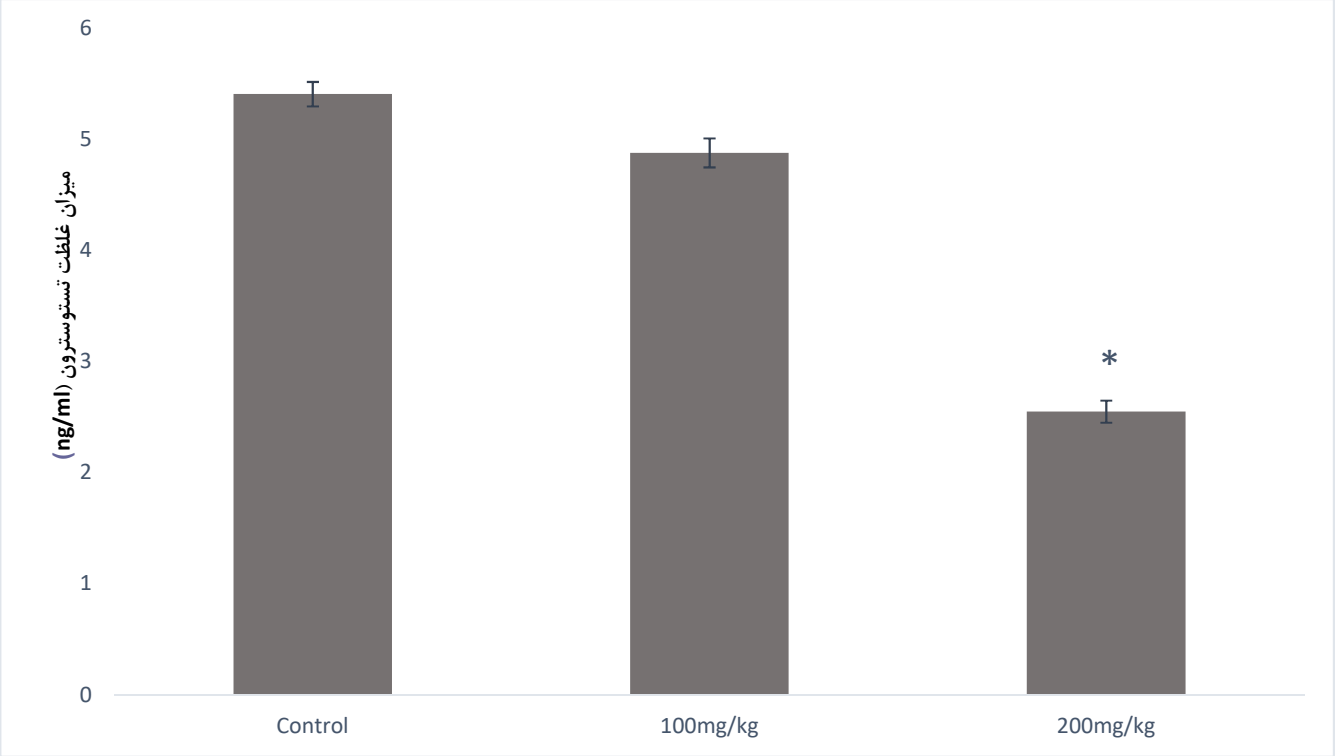


شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف تیمارشده

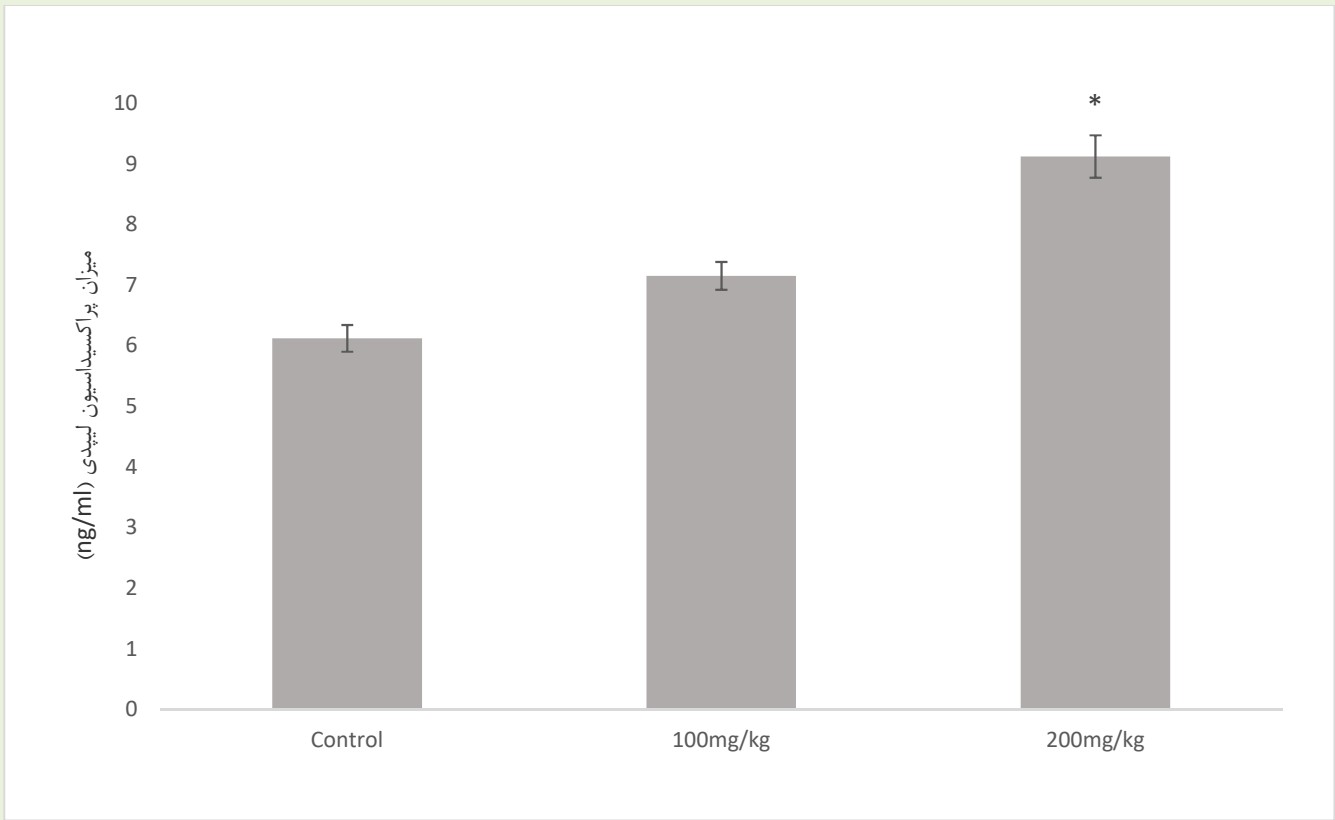
برش‌های ۵ میکرونی، هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰۰نشان دهنده(A، B): تصویر لوله¬ی منی‌ساز رت‌های گروه کنترل که مورفولوژی طبیعی را نشان می‌دهند. (C، D): تصویر لوله‌ی منی ساز رت های گروه دریافت کننده سولفات مس با دوز(100 mg/kg) در ۵۶ روز می‌باشد.(لوله‌های منی ساز در این گروه دژنره شده و همراه با کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی می‌باشد. (F،E): تصویر بخش‌هایی از لوله‌های منی‌ساز رت‌های گروه دریافت کننده سولفات مس با دوز(200 mg/kg) در ۵۶ روز می‌باشد. در این گروه که لوله‌های منی ساز دژنره شده، ضخامت اپیتلیوم زایشی کاهش پیدا کرده و به خوبی فقدان کاملاً سلول‌های اسپرم و کاهش سلول‌های سرتولی را نشان می‌دهد.(نشان¬دهنده ارتفاع اپیتلیوم زایشی)(نشان¬دهنده سلول‌های اسپرم نابالغ اسپرماتید).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱ - مقایسه غلظت های مختلف تستوسترون دربین گروه‌های مختلف * (P<۰/۰۵)



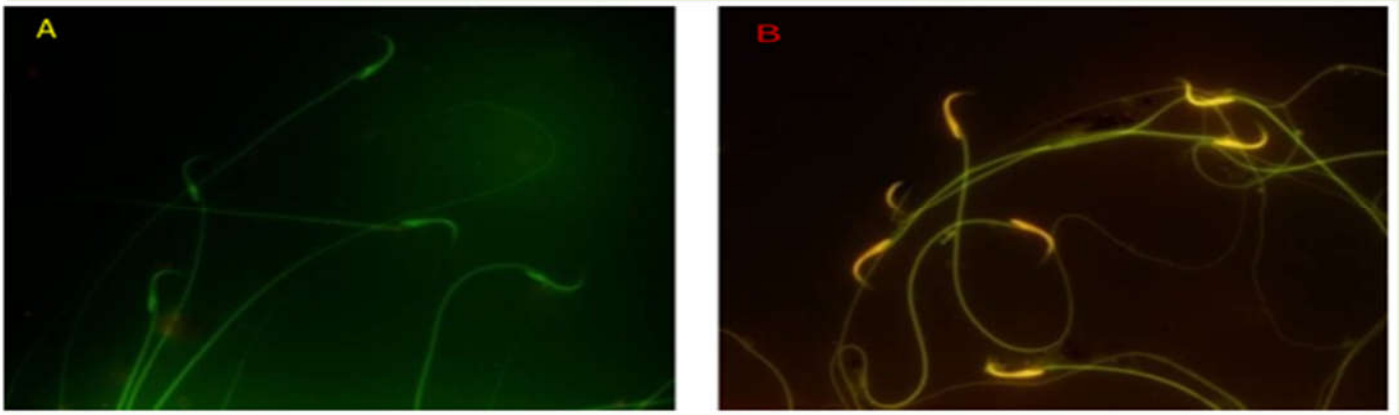
نمودار ۲- مقایسه غلظت پراکسیداسیون لیپیدی در بین گروه های مختلف * (P<۰/۰۵)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه پارامترهای اسپرم در بین گروه های مختلف *(P<۰/۰۵)

گروه ها / پارامترها	کنترل	mg/kg۱۰۰	mg/kg۲۰۰
تحرک (٪)	۶۸ ±۶/۴	۶۰ ± ۶/۱۹	۳۵ ± ۵/۳۱*
مورفولوژی(٪)	۹۳ ± ۱/۹	۹۸/۴ ± ۵/۱	۹۹ ± ۲/۳*
قابلیت حیات(٪)	۷۳ ± ۳/۷	۶۹ ± ۲/۹	۶۲ ± ۲/۵
شکست DNA(٪)	۹۸ ± ۴/۷	۹۴ ± ۵/۱	۷۶ ± ۷/۳*



شکل۲- تأثیر مخرب سولفات مس بر میزان شکستگی DNA اسپرم را نشان می دهد.

در این روش اسپرم موش هایی که اسپرم دارای کروماتین سالم و طبیعی (سبز) (A) و اسپرم دارای کروماتین آسیب دیده (زرد-نارنجی)(B) می باشد .

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه سعی شده است که اثرات مخرب مصرف سولفات مس با دوز(mg/kg 200-100) را بر روی بیضه موش‌های بالغ نژاد ویستار در مدت زمان۵۶روز را نشان دهد. در مطالعه حال حاضر وزن بیضه گروه تیمار شده با دوز mg/kg 200 سولفات مس در مدت زمان ۵۶ روز کاهش معنی‌داری یافته است اما تفاوت معنی داری در دوز mg/kg 100 دراین مدت زمان مشاهده نشد. در مطالعه حال حاضر، سطح تستوسترون سرم خون در گروه تیمار شده با دوز mg/kg 200 سولفات مس کاهش معنی‌داری داشت. سولفات مس با تاثیر مخرب برروی عملکرد غده هیپوفیز موجب کنترل ترشح هورمون LH و در نهایت کاهش سطح تستوسترون خون می‌شود. در بسیاری از مطالعات به خوبی نشان داده شده است که هورمون‌های آزاد کننده گنادوتروپین از غده هیپوفیز(LH ، FSH) موجب تکامل سیستم تولید مثلی جنس نر خواهد شد(۴). بنابر این کاهش ترشح LH از غده هیپوفیز، موجب کاهش سطح تستوسترون و در نهایت آتروفی بیضه می‌شود(۱۳). بنابر این کاهش وزن بیضه و کاهش میزان

www.SID.ir

Archive of SID

تستوسترون سرم خون می‌تواند ناشی از افزایش غلظت سولفات مس در بدن و هم چنین اثرات مخرب آن باشد. در بسیاری از مطالعات به خوبی نشان داده شده است که غلظت‌های بالای مس موجب تولید گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن(ROS) خواهد شد. گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن(ROS) در حداقل میزان خود سبب ایفای نقش‌های مختلف فیزیولوژیکی از جمله تکامل در ساختار و عملکرد اسپرم‌ها می‌شود. اما افزایش میزان استرس اکسیداتیو و به دنبال آن افزایش تولید رادیکال های آزاد موجب تخریب بافت بیضه و در نهایت موجب آتروفی بیضه و کاهش کیفیت اسپرم می گردد(۲۱). افزایش غلظت مس، موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در مایع منی خواهد شد(۸). در مطالعه حال حاضر، به خوبی نشان داده شده است که افزایش غلظت مس موجب افزایش غلظت MDA به عنوان شاخص سنجش لیپید پراکسیداسیون می‌شود که این عمل بدین منظور است که وجود غلظت‌های بالای مس موجب اختلال در عملکرد آنزیم های آنتی‌اکسیدانی می‌شود و افزایش سطح MDA می‌شود(۳). افزایش ROS موجب تحریک آپوپتوزیس و قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های اسپرماتوژنیک بیضه می‌شود که این امر موجب کاهش تعداد اسپرم و افزایش مرگ سلولی خواهد شد(۱۱). نتایج مطالعه حال حاضر به خوبی نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض سولفات مس باعث کاهش کیفیت اسپرم و مهار اسپرماتوژنز می‌شود. در برخی از مطالعات که به منظور بررسی اثر سولفات مس بر روی پارامترهای اسپرم و یک-پارچگی اسپرم DNA انجام شده است، ارتباط معنی داری بین افزایش غلظت مس در پلاسمای منی و کاهش تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم طبیعی نشان می دهد(۱۲). در مطالعه حال حاضر، کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی اسپرم در گروه دریافت کننده سولفات مس با دوز 200 mg/kg پس از ۵۶ روز مشاهده شد. نقش فیزیولوژیکی مس در اسپرم هنوزمشخص نیست، اما آنچه به نظر می رسد این است که حضور مس در تحرک اسپرم نقش مهمی بر عهده داشته باشد و هم چنین باعث کنترل ترشح هورمون LH از گیرنده‌های هیپوفیز می‌شود(۲۵). هم چنین افزایش پراکسیداسیون لیپیدی(MDA) می‌تواند اثرات مخربی بروی عملکرد اسپرم از طریق اختلال در متابولیسم، تحرک و تخریب DNA اسپرم ها داشته باشد(۱۴). در یک مطالعه دیگر، نشان داده شد که بین غلظت یون مس موجود در مایع منی و تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی طبیعی ارتباط معنی‌داری وجود دارد(۱۹). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که تیمار موش‌ها با سولفات مس با دوز 200 mg/kg به مدت ۸ هفته باعث آتروفی بیضه می‌شود. هم چنین تیمار با این دوز موجب کاهش تعداد اسپرم در لوله‌های منی‌ساز، کاهش تحرک، ایجاد ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم، قابلیت حیات اسپرم ها و افزایش آسیب به DNA اسپرم می‌شود. نتایج مطالعه حال حاضر نشان می‌دهد که افزایش غلظت سولفات مس موجب کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، کاهش تستوسترون و به دنبال آن باعث آتروفی بیضه وکاهش تعداد سلول اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید می‌شود. کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در نهایت موجب کاهش تعداد سلول‌های اسپرم نیز می‌شود. در پایان، این مطالعه شواهدی در مورد اثرات مخرب سولفات مس بر روی ساختمان بیضه‌ها و کیفیت اسپرم ارائه داد. افزایش غلظت سولفات مس، سلول‌های مختلفی مانند اسپرماتوگونی و سلول‌های اسپرم را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش درصد اسپرماتوژنز و کیفیت پارامترهای اسپرم می‌شود. سولفات مس، به عنوان یک آلاینده زیست محیطی اثرات مخرب بر تعداد، قابلیت تحرک، قابلیت حیات، مورفولوژی طبیعی اسپرم و هم چنین قطر لوله های منی ساز، تعداد سلول های جنسی(اسپرماتوگونی،

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرم)دارد. هم چنین کاهش قابلیت حیات و باعث افزایش میزان شکستگی DNA اسپرم خواهد شد. لذا به نظر می رسد که کاهش دادن هورمون های گنادوتروپینی توانسته است منجر به تغییرات پارامترهای اسپرم گردد. بنابراین به نظر می رسد که دوز بالای سولفات مس باعث اختلال در محور هورمونی هیپوفیز ــ بیضه ای می شود که می تواند عامل ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرم گردد. البته فاکتور های استرس اکسیداتیو نیز به همراه اختلال هورمونی روی پارامترهای اسپرم تاثیر دارند.

بررسی های آینده در مورد شناخت عوامل دیگر فاکتورهای بقاء سلول های زاینده در زمان افزایش دوز آلاینده های سمی مثل سولفات مس می تواند دانش ما را در مورد تظاهرات این یون کامل تر کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل از طرح جامع تحقیقاتی تصویب شده از سوی سازمان جهاد دانشگاهی واحد استان قم بود. بنابرین ازمسؤولین مربوطه تشکر به عمل می‌آید؛ هم چنین از کمک‌های ارزشمند سرکار خانم لیلا ناصر پور در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1.Al-Fartusie, FS., Mohssan, SN. (2017). Essential trace elements and their vital roles in human body. Indian J Adv Chem Sci, 5(3);127-36.
2.Aliasgharpour, M. (2020). Trace elements in human nutrition (II)–an update. international Journal of Preventive Medicine, 1(1); 2-11.
3.Alonso, C., Casero, E., Román, E., Campos, SF-P., de Mele MFL. (2016). Effective inhibition of the early copper ion burst release by purine adsorption in simulated uterine fluids. Electrochimica Acta, 189; 54-63.
4.Ammar, O., Houas, Z., Mehdi, M. (2019). The association between iron, calcium, and oxidative stress in seminal plasma and sperm quality. Environmental Science and Pollution Research, 26(14); 14097-105.
5.Asif M. (2017). Role of heavy metals in human health and particularly in respect to diabetic patients. TANG [HUMANITAS MEDICINE], 7(1); 1.-.10.
6.Bataineh, H., Al-Hamood, M., Elbetieha, A. (1998). Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts. Human & Experimental Toxicology, 17(10); 570-6.
7.D'souza, D., Subhas, BG., Shetty, SR., Balan, P. (2012). Estimation of serum malondialdehyde in potentially malignant disorders and post-antioxidant treated patients: A biochemical study. Contemporary Clinical Dentistry, 3(4); 448.
8.El-Hak, HNG., Mobarak, YM. (2020). Copper oxychloride–induced testicular damage of adult albino rats and the possible role of curcumin in healing the damage. Environmental Science and Pollution Research, 1-14.
9.Eliasson, R. (2010). Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. Asian Journal of Andrology. 12(1);26.
10. Fraga, CG. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. Molecular Aspects of Medicine, 26(4-5); 235-44.
11. Ghaniei, A., Eslami, M., BabaeiMarzango, SS. (2018). Determination of calcium, magnesium, phosphorus, iron, and copper contents in rooster seminal plasma and their effects on semen quality. Comparative Clinical Pathology, 27(2); 427-31.
12. Hultberg, B., Andersson, A., Isaksson, A. (1997). The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. Toxicology, 123(1-2); 33-40.
13. Kilic, M. (2007). Effect of fatiguing bicycle exercise on thyroid hormone and testosterone levels in sedentary males supplemented with oral zinc. Neuroendocrinology Letters, 28(5); 681-5.
14.Kňažická, Z., Lukáčová, J., Greń, A., Formicki, G., Massányi, P., Lukáč, N. (2020). Relationship between level of copper in bovine seminal plasma and spermatozoa motility. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 9(6); 1351-62.
15. Knazicka, Z., Tvrda, E., Bardos, L., Lukac, N. (2012). Dose-and time-dependent effect of copper ions on the viability of bull spermatozoa in different media. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 47(9); 1294-300.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Naozuka, J. (2018). Elemental enrichment of foods: essentiality and toxicity. Nutri Food Sci Int, 4; 1-5.
17. Organization, WH. (2010). World health statistics 2010: World Health Organization, 2-10.
18. Ribas-Maynou, J., Yeste, M. (2020). Oxidative stress in male infertility: causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants. Biology, 9(4); 77.
19. Saleh, BOM. (2008). Status of zinc and copper concentrations in seminal plasma of male infertility and their correlation with various sperm parameters. Iraqi Academic Scientific Journal, 7(1); 76-80.
20. Shi, L., Song, R., Yao, X., Ren, Y. (2017). Effects of selenium on the proliferation, apoptosis and testosterone production of sheep Leydig Cells in Vitro. Theriogenology, 93; 24-32.
21. Slivkova, J., Popelkova, M., Massanyi, P., Toporcerova, S., Stawarz, R., Formicki, G. (2009). Concentration of trace elements in human semen and relation to spermatozoa quality. Journal of Environmental Science and Health Part A, 44(4); 370-5.
22. Sokol, RJ., Deverbaux, M., Mierau, GW., Hambidge, KM., Shikes, RH. (1990). Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload: modification by vitamin E deficiency. Gastroenterology, 99(4); 1061-71.
23. Taylor, CT. (2001). Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. Environmental Toxicology and Pharmacology, 10(4); 189-98.
24. Torabi, F., Shafaroudi, MM., Rezaei, N. (2017). Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. International Journal of Reproductive BioMedicine, 15(7); 403.
25. Victor, S., Richmond, RH. (2005). Effect of copper on fertilization success in the reef coral Acropora surculosa. Marine Pollution Bulletin. 50(11); 1448-51.
26. Wagner, H., Cheng, JW., Ko, EY. (2018). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. Arab Journal of Urology, 16(1); 35-43.
27. Wu, W., Zhang, Y., Zhang, F. (1996). Studies on semen quality in workers exposed to manganese and electric welding. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine], 30(5);266-8.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effects of Copper Sulfate on Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation Rate and Testicular Tissue of Adult Wistar Rats

H.Pirozmanesh[1], **R. Janatifar[1]**, L.Naserpour[1]
1. Developmental Cell Biology, Reproductive Biology Research Group, Jihad University Research Unit, Qom, Iran.
rahiljanati2016@gmail.com

Received:2020.7. 3 **Accepted: 2020.20.9**

Abstract

Inroduction & Objective: Copper sulfate is one of the most important environmental pollutants that has the ability to produce free radicals and create oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effects of copper sulfate on sperm quality parameters, DNA fragmentation rate and testicular tissue of adult Wistar rats..

Material and Method: In this experimental study, 30adult Wistar rats weighing grams were used. Random adult mice were treated in 3 control groups, copper sulfate receptor with concentration (100 mg / kg) and concentration (200 mg / kg) for 56 days. At the end of the treatment period, testicular weight, sperm count and parameters were assessed based on (WHO2010). The quality of sperm chromatin was assessed by Acridine uranium nuclear pigments. Malondialdehyde level was measured. Data were analyzed using the One-Way ANOVA statistical method.

Results: The quality of sperm parameters in copper sulfate with a concentration of 200 mg / kg decreased significantly (P <0.05). The testicular weight was significantly reduced at a dose of 200 mg / kg (P <0.05). The diameter of the seminiferous tubules, testosterone levels, germ cells count, and sperm DNA fragmentation rate decreased at a dose of 200 mg / kg (P <0.05). The concentration of Malondialdehyde at a dose of 200 mg / kg sulfate copper was significantly increased (P <0.05).

Conclusion: This study shows that high concentrations of copper sulfate cause destructive effects on sperm quality, testicular tissue.

Keywords: Copper sulfate, sperm quality, testicular tissue, DNA fragmentation.

www.SID.ir