بررسي اثرات كافئين وآهن بر پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء،واكنش اكروزومي و ساختار DNA اسپرم‌هاي گاو در حضور تورين و آلبومين

مهران عربي* و محبوبه شاهرخي**

* گروه زيست شناسي دانشگاه شهركرد

**گروه زيست شناسي دانشگاه پيام نور مركز اصفهان

چكيده

تجمع عوامل محيطي سمي در بدن جانوران يكي از مهم ترين علت‌هاي ناباروري محسوب مي‌شود. بنابراين شناسايي اين عوامل يا موقعيت هايي كه بر عملكرد طبيعي اسپرم‌ها اثر مي‌گذارند، بسيار مهم است .در اين پژوهش نمونه‌هاي اسپرمي از گاوهاي نژاد هولشتاين به صورت خالص و تازه تهيه شدند. ميزان اكسيداسيون چربي‌هاي غشايي بر اساس ميزان توليد تركيبات واكنش دهنده با اسيدتايوباربي توريك (TBA) به ويژه مالون دي آلدييد(MDA) سنجيده شد. ميزان كمپلكس TBA+MDA در حضور القاء كننده(پروموتر)LPO (محلول ۱۰۰ ميكرومولاراز سولفات آهن و۵۰۰ ميكرومولار از اسيد اسكوربيك) و غلظت‌هاي ۵-۰/۵ ميلي مولار تورين و يا ۰/۲۵-۵/۲۵ درصد آلبومين مورد سنجش قرار گرفت. غلظت ۱/۵ ميلي مولار تورين و ۵/۲۵ درصد آلبومين به عنوان موثرترين غلظت‌هاي آنتي اكسيداني انتخاب شدند. در مرحلة بعد، پنج غلظت مختلف از محلول كافئين و يا سولفات آهن (۱۰۰۰و۸۰۰-۶۰۰-۴۰۰-۲۰۰ ميكرومولار) در حضور و يا عدم حضور آنتي اكسيدان ها، به نمونه‌هاي اسپرمي اضافه گرديدند. در تمامي تيمارهاي كافئين و آهن،ميزان LPO نسبت به گروه شاهد افزايش معني داري را نشان داد. پس از اضافه سازي آلبومين و تورين به نمونه‌هاي اسپرمي تيمار شده، ميزان توليد MDA در محيط كاهش يافت. درتمامي گروه‌هاي تيمار برخلاف گروه شاهد،ناحيه هاله (محل هضم ژلاتين در نتيجة واكنش اكروزومي) مشاهده نشد.عملكرد سلول‌ها در واكنش اكروزومي فقط در گروه شاهد طبيعي بود.در گروه‌هاي تيمار به دليل اختلال در واكنش اكروزومي، هيچ هاله اي در اطراف سلول‌هاي اسپرم تشكيل نشد. ميزان شكنندگي وآسيب D NA سلول‌هاي اسپرم نيز با استفاده از روش ژل الكتروفورز براي سلول‌هاي منفرد و به كمك روش رنگ آميزي نيترات نقره، مورد بررسي قرار گرفت. نتايج به دست آمده نشان داد كه آسيب DNA در همة گروه‌هاي تيمار جزيي و ميزان درصد DNA آسيب ديده در گروه‌هاي تيمار نسبت به گروه‌هاي شاهد از نظر آماري معني دار نبود.

واژه‌هاي كليدي: اسپرم گاو، پراكسيداسيون، كافئين، آهن، واكنش اكروزومي،DNA .

مقدمه

مجموعه متابوليت‌هاي اكسيژن موسوم به انواع اكسيژن فعال[1] يا ROS بوده كه به عنوان يكي از عوامل ايجاد ناباروري در مردان و نيز در زنان شناخته مي‌شوند(۱). از معروف ترين اين مشتقات آنيون سوپراكسيد($O_2^{\cdot-}$)و راديكال هيدروكسيل (OH) هستند. ROS داراي اثري دوگانه برعمل و ساختار سلول‌هاي اسپرم بوده، از يك طرف جهت انجام برخي روندهاي طبيعي نظير واكنش اكروزومي ضروري بوده، واز طرفي ديگردر غلظت‌هاي زياد در محيط كه موسوم به استرس اكسيداتيو[2] است ، موجب مهار قدرت تحرك و نيز تغيير در شكل ظاهري اين سلول‌ها شده و بدين ترتيب درصدهايي از ناباروري را ايجاد خواهند نمود(۱). يكي از تظاهرات مهم اين نوع از استرس، پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء[3] (LPO)است. LPO يك پديده فيزيولوژيك بوده و در سلول‌هايي كه غشاء آنان غني از اسيدهاي چرب غير اشباع [4] يا PUFA هستند، رخ داده و از مجموعه واكنش هايي كه شامل تخريب و تشكيل مجدد پيوندهاي دوگانه در اين اسيدهاي غشايي است، تشكيل مي‌شود. روند LPO موجب تخريب ساختارغشاء،كاهش قدرت تحرك، مهار فعاليت‌هاي آنزيمي، وايجاد شكستگي در DNA سلول‌هاي اسپرم شده، كه هريك به تنهايي و يا در همراهي با ديگر عوامل منجر به ناباروري مي‌گردند (۸-۱).

رابطه معكوسي بين پراكسيده شدن چربي‌هاي غشاء و ميزان قدرت تحرك اسپرم‌ها در شرايط In vivo وIn vitro وجود دارد (۹،۲). در مجموع دو مدل براي پراكسيداسيون چربي‌ها پيشنهاد مي‌شود:۱ - اكسيژناسيون آنزيمي كه به وسيله آنزيم‌هاي توليد كننده ايكوزانوئيد هدايت مي‌شوند، و۲ - اكسيژناسيون غير آنزيمي، كه همان اتواكسيداسيون PUFA بوده (تحريك توسط ROS وفلزات واسطه) كه در نهايت تحت اثر آنتي اكسيدان‌ها مهار مي‌گردد(۱۰). مطالعات جديد نشان مي‌دهد كه ROS ، باعث بروز آسيب‌هاي جدي در DNA سلول‌هاي اسپرم مي‌شود(۱۵). در مقابل سلول هاي اسپرم واجد مكانيسم‌هاي تدافعي در مواجهه با اكسيداسيون DNA بوده كه شامل : الف - آرايش و بسته بندي بسيار فشرده DNA ،ب- وجود آنتي اكسيدا ن‌هاي پلاسماي مايع اسپرمي مي‌باشد(۱۱).آنتي اكسيدان ها[5] موادي هستند كه قادر به جمع آوري ROS و سپس خنثي سازي آنان در داخل و خارج سلول‌هاي بدن مي‌باشند. سلول‌هاي اسپرم در طي روند اسپرماتوژنز، مقدار زيادي از سيتوپلاسم خود را به همراه مواد آنتي اكسيداني موجود در آن از دست داده و بدين ترتيب در مقابل روند پراكسيداسيون سلولي حساس گرديده،اما به علت غوطه وري در پلاسماي مايع اسپرمي (مني)[6] كه محتوي آنتي اكسيدان‌هاي فراواني نظير: اسكوربات (ويتامينC)،اورات ها، تورين، گروه‌هاي سولفيدريلي، مولكول‌هاي پروتئيني كوچك مثل آلبومين و گلوتاتيون،كاتالاز و سوپراكسيد ديسموتاز است، به خوبي در مقابل روند استرس اكسيداتيو محافظت مي‌گردند.امروزه استراتژي كاربرد آنتي اكسيدان‌ها در راستاي معكوس سازي و رفع صدمات وارده به سلول‌ها مدنظرمحققان قرار گرفته است.وجود يك آنتي اكسيدان موثر و قوي در محيط و در زماني كه سلول‌هاي اسپرم

1. Reactive oxygen species
2 .Oxidative stress
3. Lipid peroxidation
4. Polyunsaturated fatty acids
5. Antioxidants
6. Seminal plasma

محروم از محيط حامي خود يعني پلاسماي مايع اسپرمي اند ، بسيار كارساز بوده و منجر به بقاء آنان خواهد شد. در اين راستا نيزمشخص گرديده كه، دريلاسماي مايع اسپرمي مردان نابارور(عقيم)مقاديركمتري از انواع آنتي اكسيدان‌ها درمقايسه با مردان بارور يا طبيعي وجود دارد (١و٢).

تورين[1] (٢-آمينو اسيد اتان سولفونيك) مهم ترين بتا اسيد آمينه ضروري در بدن جانوران است.اين اسيد آمينه در سنتز پروتئين‌ها كاربردي نداشته و اغلب به صورت آزاد يا پپتيد ساده در بافت‌هاي عضله قلبي و اسكلتي ونيز مغز وجود دارد. البته امروزه تورين به عنوان عامل پايدار كننده غشاء ونوعي آنتي اكسيدان مورد شناسايي قرار گرفته است (١٢).آلبومين نيز به عنوان يك پروتئين كوچك موجود در مايع اسپرمي و با عمل كلاتوري[2] خود يون‌هاي فلزي موجود در محيط زيست سلول‌ها را كه باعث پيشرفت و گسترش واكنش‌هاي پراكسيداسيون سلولي مي‌شوند، جذب نموده و دور مي‌سازد(١٠).هم چنين مشخص شده كه آلبومين واجد خاصيت جذب تركيبات مضري نظير نيترات پروكسي كه از واكنش آنيون سوپراكسيد با اكسيد نيتريك حاصل مي‌گردد، نيز مي‌باشد (١٣). كافئين[3] در تركيب قهوه، چاي، كاكائو، وانواع شكلات‌ها وجود داشته و ماده اي ليپوفيل است كه به راحتي از غشاء سلول‌ها عبور مي‌كند (١٤و١٥). آهن نيز به عنوان يكي از عناصر فلزي واسطه، نقش مهمي را در فيزيولوژي و نيز پاتولوژي سلول‌ها ايفاء مي‌كند(١٠،١٥).هدف از طراحي و اجراي اين پژوهش بررسي اثر غلظت‌هاي متفاوت از كافئين وآهن (١٠٠٠ و٨٠٠-٦٠٠-٤٠٠-٢٠٠ ميكرومولار) در حضورو ياعدم غلظت‌هاي موثر از آنتي اكسيدان‌هاي آلبومين و تورين، بر ميزان پراكسيداسيون چربي‌هاي غشايي، واكنش اكروزومي، و ميزان شكست‌هاي موجود در DNA نمونه‌هاي اسپرم گاو هولشتاين بود.

مواد و روش‌ها

تهيه نمونه‌هاي مايع اسپرمي

نمونه‌هاي مايع اسپرمي از گاوهاي نژاد هولشتاين[4] به صورت خالص و تازه از مركز اصلاح نژاد و تلقيح مصنوعي منطقه كبوترآباد وابسته به سازمان تحقيقات جهاد كشاورزي استان اصفهان تهيه شدند. به دليل مسافت طولاني بين مركز و دانشگاه شهركرد، و جهت جلوگيري از مرگ سلول‌هاي اسپرم، نمونه‌ها در ظروف درب دار استريل با عايق حرارتي (لايه‌هاي يخ) قرار داده مي‌شدند. در آزمايشگاه نمونه‌ها با بافر فسفاته سالين دار يا PBS (pH= ٧/٢)رقيق و سانتريفوژ گرديدند.

اندازه گيري پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء

در اين روش حساس و ساده (١٦)از قدرت واكنش دهندگي اسيد تيو باربيتوريك[5] (TBA) با مالون دي آلديد[6] (MDA) (به عنوان يك محصول نهايي از پراكسيداسيون چربي ها) استفاده شد و در انتها ميزان توليد كمپلكس TBA+MDA تعيين گرديد كه معادل با ميزان پراكسيداسيون چربي‌ها بود. براي سنجش LPO ابتدا ٠/١ ميلي ليتر از نمونه اسپرمي با ٠/١ ميلي ليتر از آنتي اكسيدان‌ها و يا كافئين و آهن به همراه ٠/٥ ميلي ليتر از Tris و ٠/٣ ميلي ليتر از PBS در لوله آزمايش

1. Taurine
2. Chelator
3. Caffeine
4. Holstein
5. Thiobarbituric acid
6. Malondialdehyde

ريخته شد.سپس لوله‌ها در انكوباتور در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ٦۰ دقيقه قرار داده شدند. در انتها، واكنش با اضافه سازي يك ميلي ليتر از TCA سرد متوقف گرديد. در اين مرحله لوله‌ها به مدت ۱۰ دقيقه‌سانتريفوژشدند.يك ميلي ليتر از سطحي ترين بخش مايع درون لوله‌ها برداشته شد و به مجموعه‌اي ديگر از لوله‌هايي كه از قبل يك ميلي‌ليتر از TBA به آنان اضافه شده بود، افزوده گرديدند. در پايان كار، لوله‌ها در بن ماري به مدت ۱۰ دقيقه قرار داده شدند. پس از آن به هر لوله يك ميلي ليتر آب مقطرافزوده گرديد و،در دماي اتاق،در طول موج ۵۳۲ نانومتر مقدار جذب نوري هر لوله خوانده و ثبت گرديد. جهت انتخاب موثرترين غلظت از آنتي اكسيدان‌هاي آلبومين و تورين در جهت مقابله با شرايط پراكسيداسيون سلولي، مقدار كمپلكس TBA+MDA در حضور القاء كننده (پروموتر) LPO (محلول ۱۰۰ ميكرومولار از سولفات آهن و ۵۰۰ ميكرومولار از اسيداسكوربيك) و غلظت‌هاي ۵-۵/. ميلي مولار تورين و ۲۵-۵/۲۵/. درصد آلبومين مورد سنجش قرار گرفت. در مرحلة بعد، پنج غلظت نهايي كافئين و آهن در حضور و يا عدم حضور غلظت موثر از آنتي اكسيدان ها، به نمونههاي اسپرمي اضافه گرديدند.

تعيين ميزان پروتئين‌هاي نمونه اسپرمي

مقدار پروتئين نمونه‌ها به عنوان يكي از پارامترهاي لازم جهت محاسبه ميزان فعاليت ويژه MDA است. در اين روش مقدار جذب نوري نمونه با استفاده از SDS [1] در طول موج ۷۵۰ نانومتر به وسيله اسپكتروفتومتر تعيين و مقدار پروتئين نمونه‌ها محاسبه شد(۱۷).

بررسي واكنش اكروزومي

جهت تعيين عملكرد سلول‌هاي اسپرم در واكنش اكروزومي مطابق با آزمايش ژلاتين عمل گرديد (۱۸). بدين منظور بيشترين غلظت (۱۰۰۰ ميكرو مولار) از كافئين و آهن به همراه غلظت انتخاب شده از تورين وآلبومين به لام‌هاي ژلاتين دار اضافه شد و سپس به كمك كوماسي بلو رنگ آميزي گرديدند. لام‌هاي رنگ‌آميزي شده با ميكروسكوپ نوري با بزرگنمايي ٤۰ مورد بررسي قرار گرفتند. تعداد سلول‌هاي اسپرم واجد هاله [2] (محل هضم ژلاتين در نتيجه واكنش اكروزومي در اطراف سر اسپرم ها) و نيز سلول‌هاي بدون هاله شمارش و ثبت گرديدند. براي هر تيمار (همراه با گروه شاهد مربوطه) حداقل پنج لام انتخاب گرديدند و در هر لام تعداد حداقل ٤۰۰ سلول اسپرم مورد بررسي قرار گرفتند.

اندازه‌گيري ميزان شكست‌هاي DNA اسپرم

به منظور مشخص سازي درصد شكست‌هاي موجود در نردبان DNA ،ازروش ژل‌الكتروفورز سلول‌هاي منفرد يا روش ستاره دنباله دار[14] استفاده شد (۱۱،۱۹). جهت آماده كردن لام ها، ابتدا يك لايه از آگاروز با نقطه جوش طبيعي بر روي لام‌ها گسترش داده شد.پس از آن،لام‌ها به مدت يك شب در دماي اتاق نگهداري شدند.در مرحله بعد، ۸۰ ميكروليتر از محلول آگا روز با نقطه جوش پايين و۲۰ ميكروليتر از نمونه اسپرمي به سطح لام‌ها اضافه گرديد. پس از منجمد شدن آگاروز و برداشتن لامل، سومين لايه از محلول آگاروز (از نوع با نقطه جوش پايين) به سطح هرلام اضافه گرديد. سپس لام‌ها در ظرفي كه حاوي محلول تجزيه

1. Sodium-dodecyle-sulphate

2. Halo

كننده تازه و سرد بود (به منظور تجزيه غشاءهاي سلولي و هسته اي و نيز باز شدن پيچ‌هاي نردبان DNA)، قرار داده شدند. اين مرحله به مدت ٤ ساعت در دماي ٤ درجه سانتي گراد به انجام رسيد. الكتروفورز به مدت ٤٠ دقيقه و تحت ٣٠٠ ميلي آمپر به صورت افقي به انجام رسيد. پس از شستشو با محلول خنثي كننده و انجام روند ثبيت سلولي، لام‌ها با محلول نيترات نقره رنگ آميزي شدند. پس از بررسي لام‌هاي رنگ آميزي شده به وسيله ميكروسكوپ نوري معمولي، تعداد سلول‌هاي طبيعي ونيز سلول‌هاي واجد شكست‌هاي DNA (از نظرقطعه قطعه شدن هسته) محاسبه و از لحاظ آماري ميزان معني دار بودن آن‌ها در هر يك از گروه‌هاي تيماري و شاهد تعيين شد.

مواد شيميايي و روش آماري

در اين پژوهش كليه مواد شيميايي مورد استفاده از كارخانه ي Merck آلمان تهيه و خريداري گرديدند. محلول‌هاي مورد استفاده به كمك PBS (در آب مقطر دو بار تقطير) تهيه گرديدند. با بهره گيري ازنرم افزار SPSS (version 11.0)، روش آماري one-way ANOVA در مقايسه اثرات غلظت‌هاي مختلف از آنتي اكسيدان‌ها (مقايسه درون گروهي) بر روند LPO و انتخاب موثرترين غلظت و روش آماري t-test جهت بررسي ميزان اختلاف ميانگين داده‌هاي گروه‌هاي تيمار (تجربي) با گروه شاهد (مرجع)در ساير مقايسه‌ها مورد استفاده قرارگرفتند. مقدار p<٠/٠٥ ،از نظرآماري معني دار در نظرگرفته شد.داده‌هاي حاصل از اين پژوهش به صورت سه تكرار مستقل سه تايي مي‌باشند.اين داده‌ها به صورت ميانگين ± انحراف استاندارد بيان شده اند.

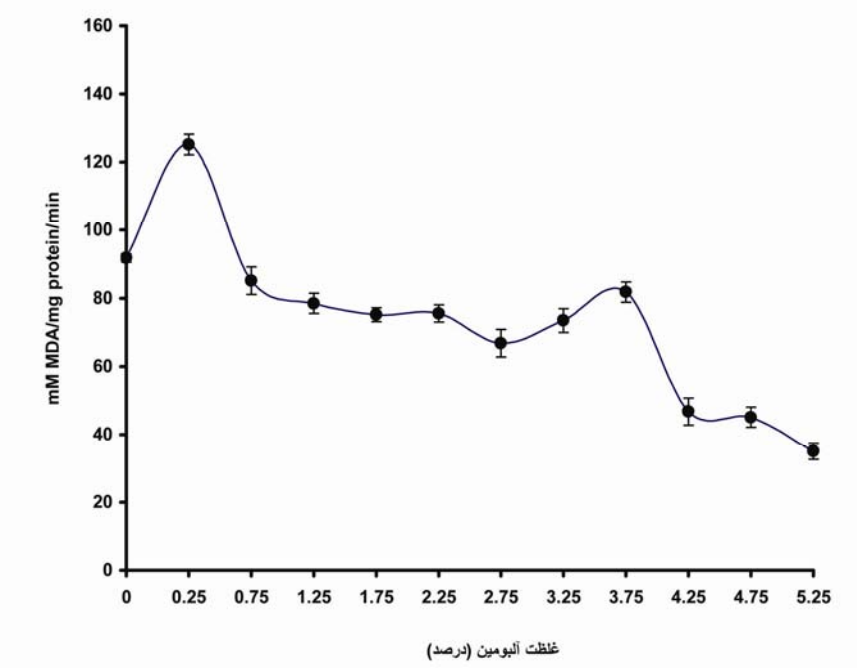
نتايج

اندازه گيري ميزان پراكسيداسيون چربي‌ها در غشاء اسپرم‌هاي گاو

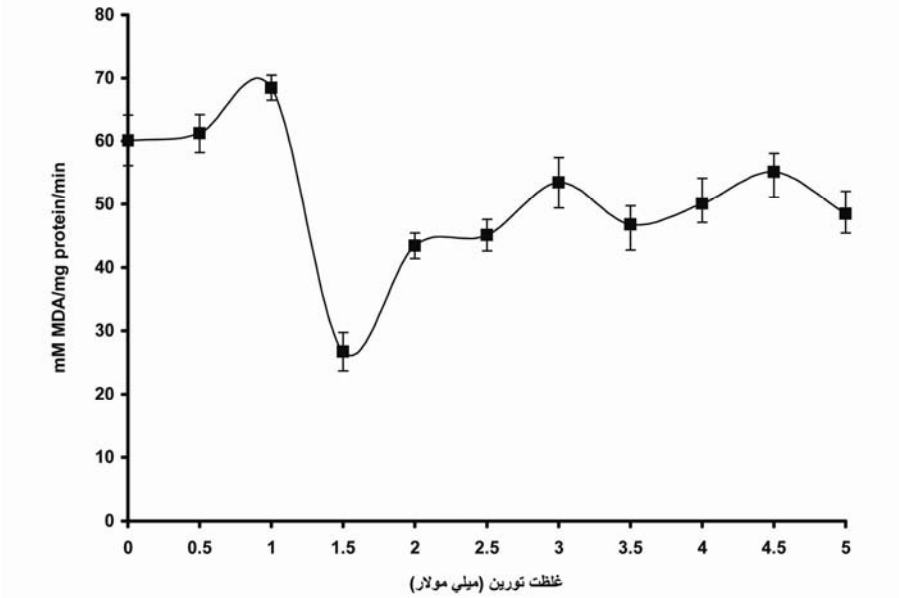
بر اساس نتايج، پس از استفاده از پروموترLPO و به كار گيري محدوده غلظتي از آلبومين (٠/٢٥-٢٥/. درصد) و تورين (٥-٥/. ميلي مولار)،غلظت ٠/٢٥ درصد از آلبومين و ١/٥ ميلي مولار از تورين به عنوان موثرين غلظت‌ها در كاهش دادن ميزان LPO از اين دو آنتي اكسيدان انتخاب گرديدند. به عبارت ديگر،اين دو غلظت از آلبومين و تورين بيشترين مقدار كاهش را در ميزان توليد MDA (معرف پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء)محيط باعث گرديدند (p<٠/٠٠١) (شكل‌هاي ١و٢).در تمامي گروه‌هاي تيماري حاوي كافئين وآهن، ميزان LPO نسبت به گروه شاهد افزايش معني داري را نشان داد كه پس از اضافه سازي غلظت‌هاي انتخاب شده ازآنتي اكسيدان‌ها به اين نمونه‌هاي اسپرمي، كاهش معني داري در ميزان توليدMDA پديدار شد (شكل‌هاي ٣ و٤). با توجه به اين نتايج و پس از بررسي مقايسه اي، به نظر مي‌رسد كه قدرت آنتي اكسيداني آلبومين در خنثي سازي روند پراكسيداسيون چربي‌ها بيش تر از تورين باشد. در مجموعه آزمايش‌هاي اين قسمت نمونه‌هاي اسپرمي متفاوت در طي روزهاي جداگانه مورد ارزيابي قرار گرفتند.

بررسي واكنش اكروزومي در اسپرم‌هاي گاو

بررسي لام‌هاي رنگ آميزي شده نشان داد كه در هيچ

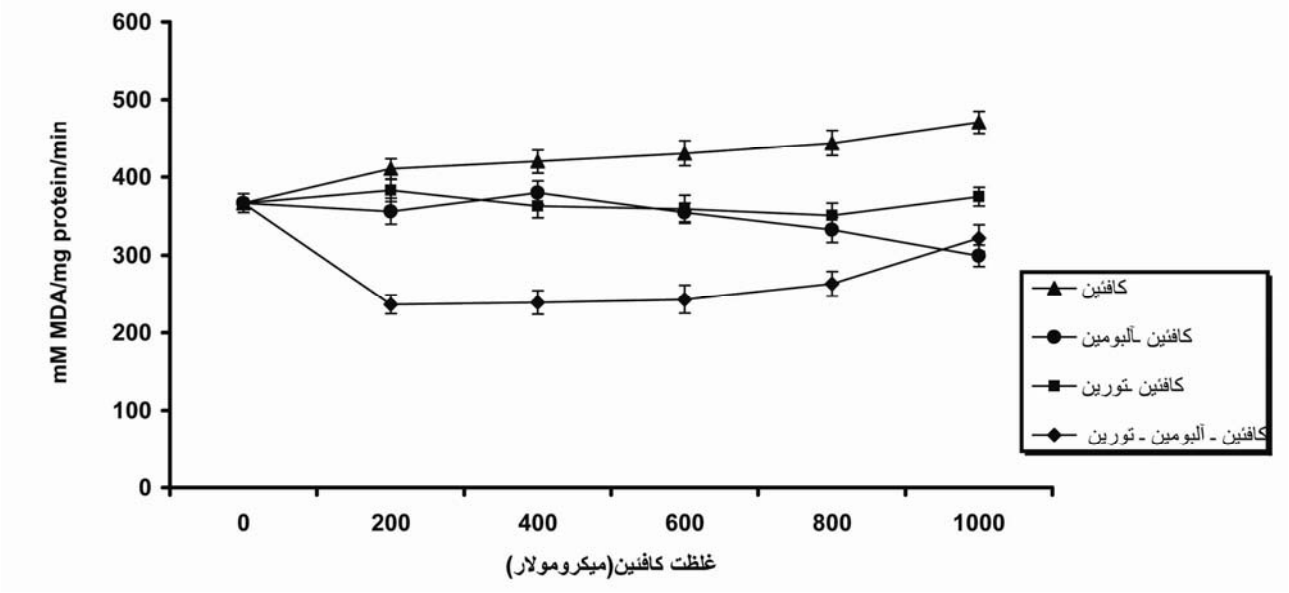


شكل ۱- بررسي اثر غلظت‌هاي مختلف از آلبومين بر پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء (ميزان توليد MDA) در نمونه‌هاي حاوي اسپرم‌هاي گاو. كم‌ترين ميزان توليد MDA در حداكثر غلظت آلبومين مشاهده شد.

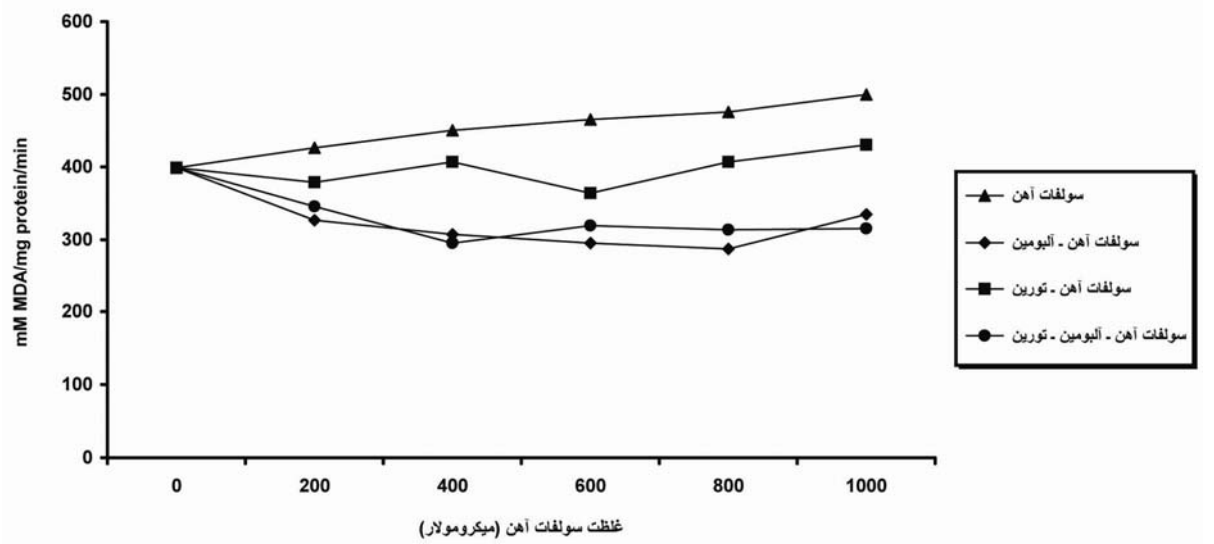


شكل ۲- بررسي اثر غلظت‌هاي مختلف از تورين بر پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء (ميزان توليد MDA) در نمونه‌هاي حاوي اسپرم‌هاي گاو. كم‌ترين ميزان توليد MDA در غلظت ۵/۱ ميلي‌مولار تورين مشاهده شد.

يك از گروه‌هاي تيمار شده با كافئين و آهن سلول‌هاي هاله دار وجود نداشت و سلول‌هاي واجد هاله فقط در لام‌هاي گروه شاهد مشاهده گرديدند (شكل ۵). بنابراين به نظر مي‌رسد عملكرد سلول‌هاي اسپرم در اجراي مراحل مولكولي واكنش اكروزومي در گروه‌هاي تيماري دچار اختلال شديد شده است.



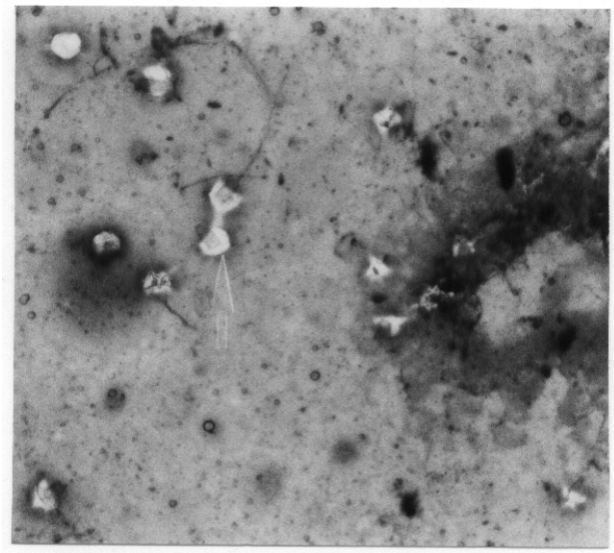
شكل ٣- بررسي اثر غلظت‌هاي مختلف از كافئين بر پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء (ميزان توليد MDA) در نمونه‌هاي حاوي اسپرم‌هاي گاوبا و يا بدون حضور آلبومين و يا تورين (جدا و يا به صورت تركيب با هم).



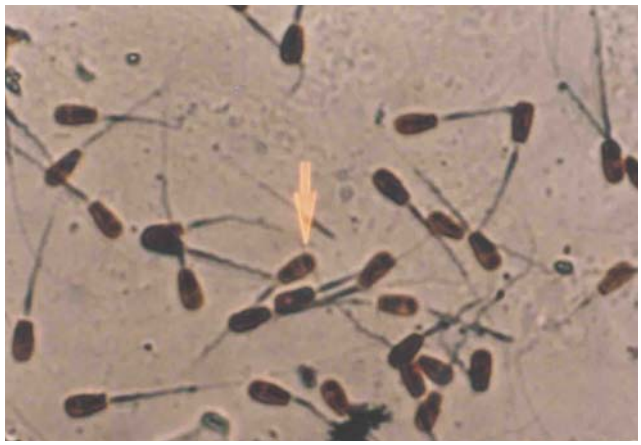
شكل ٤- بررسي اثر غلظت‌هاي مختلف از سولفات آهن بر پراكسيداسيون چربي‌هاي غشاء (ميزان توليد MDA) در نمونه‌هاي حاوي اسپرم‌هاي گاوبا و يا بدون حضور آلبومين و يا تورين (جدا و يا به صورت تركيب با هم).

بررسي ميزان شكست‌هاي DNA در اسپرم‌هاي گاو

با توجه به نتايج پژوهش حاضر، مشخص شد كه غلظت‌هاي مورد استفاده از كافئين، وآهن، باعث بروز آسيب جزيي در ساختار DNA سلول‌هاي اسپرم گاو در گروه‌هاي تيماري (نسبت به گروه شاهد غير معني دار،$p>0/05$) گرديدند. آسيب‌هاي موجود در ساختار DNAسلول‌هاي اسپرم در گروه شاهد مثبت (تيمار شده با آب اكسيژنه ١٠ ميلي مولار) به صورت قطعه قطعه شدن هسته مشخص گرديدند (شكل ٦).



شكل ٥ - اسپرم‌هاي گاو رنگ آميزي شده با كوماسي بلو در گروه شاهد منفي. (فلش نشان دهنده منطقه هاله ذوب ژلاتين)در اطراف سر سلول اسپرم است(٤٠٠ ×).



شكل ٦- اسپرم‌هاي گاو رنگ آميزي شده با نيترات نقره در گروه شاهد مثبت (تيمار شده با آب اكسيژنه ١٠ ميلي مولار). فلش نشان دهنده سلول اسپرم با هسته قطعه قطعه شده (شكستگي‌هاي DNA) است. اسپرم‌هاي سالم (بدون شكستگي در DNA) واجد هسته‌هاي يكدست تيره هستند (٤٠٠ ×).

بحث و نتيجه‌گيري

بررسي ميزان پراكسيداسيون چربي‌ها در غشاءاسپرم‌هاي گاو

نقايص عملكردي در سلول‌هاي اسپرم كه به دنبال اثرات ROS وLPO برآنان پديدار مي‌گردند، به عنوان يك عامل اصلي در بروز ناباروري مطرح هستند. از آن ميان مي‌توان به كاهش درقدرت تحرك، اختلالات اكروزومي، و اختلالات جدي و گسترده در غشاء سلول‌هاي اسپرم كه موجب تضعيف اتصال اين سلول‌ها به سطح تخمك مي‌شوند، اشاره نمود (٢٠،٩،٦،٣، ٢،١).

در پـژوهش حاضـر، اضـافه سـازي آهـن و كـافئين بـه نمونه‌هاي اسپرم گاو موجب گسترش روند LPO گرديد. علت افزايش پراكسيداسيون سلولي در حضورآهن مربوط به خاصيت كاتاليتيكي آن است. برطبق يك قاعده كلـي، يون‌هاي فلزي با عمل واسطه اي خـود قـادر بـه توليـد راديكال پرقدرت هيدروكسيل ($OH^{\cdot}$)(محرك اصلي روند LPO) از ديگر انواع ROS نظيرآنيون سوپراكسيد ($O_2^{-\cdot}$)و آب اكـسيژنه (H_2O_2) هـستند.مجموعـه ايـن واكـنش‌هـا موسوم به معادله هابر- ويس بوده كه بـه صـورت رابطـه زير نمايش داده مي‌شود(١٠):

يون فلزي

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^-$$

هم چنين مشخص شده كه ويتامينC موجود در محيط به عنوان يك عامل احياء كننده،موجب رها سازي يـون‌هـاي فلـزي نظيـرآهن و مـس از سـاختار بيوشـيميايي غـشاء سلول‌ها شده و بدين ترتيب با وارد سازي اين يون‌هـا در مجموعه واكنش‌هاي موسـوم بـه فنتـون و سـپس هـابر- ويس، موجبـات گـسترش بـيش از پـيش پراكـسيداسيون سلولي را فراهم خواهد نمود(٢١). در مورد مكانيسم‌هاي عمل كافئين در افزايش دهي پراكسيداسيون سلولي موارد زير قابل بررسي مي‌باشند.

به نظر مي‌رسد كه يكي از دلايل افزايش ميزان MDA وLPO در گروه‌هاي تيمارشده با كافئين، افـزايش توليـد $O_2^{-\cdot}$ در نتيجه مهـار فعاليـت آنـزيم سوپراكسيددیـسموتاز باشد.اثر كافئين در ايجاد LPO در يك مدل اسپرمي مـورد بررسي قرار گرفته و مشخص شده كه كافئين (١٠٠ ميلـي مولار)حركت چرخشي پروتئين‌هاي تيول دار موجـود در ميسل‌هاي ميكروسكوپي را افـزايش داده و ايـن افـزايش مربوط به مهـار فعاليـت آنـزيم سوپراكـسيدسموتاز و در نتيجه افزايش توليد و اثـر $O_2^{-\cdot}$ در محـيط اسـت(٢٢). در سال ٢٠٠٠ نيز دو محقق ايرانـي بـه نـام‌هـاي جعفـري و رباني نشان دادند كه كافئين در غلظـت‌هـاي ٢٠-٥ ميلـي مولار باعث افزايش شديدي در توليد $O_2^{-\cdot}$ شده كـه يكـي از نتـايج آن بـروز شكـست‌هـاي زيـاد در سـاختارDNA ماكروفاژهاي مقيم آلوئـول‌هـاي شـشي در مـوش اسـت (٢٣).از طرف ديگر، افزايش ميزان LPO در پس از تيمـار اسپرم‌ها با كافئين رامي توان به كـاهش سـطح گلوتـاتيون احيا، شده يا GSH مربـوط دانـست. وجـود GSH جهـت جلوگيري از گسترش رونـد LPO و نيـز حـذف ROS از محـيط ضـروري بـوده وكـاهش در ميـزان آن موجـب پيشرفت LPO در غشاء سلول‌هاي اسپرم خواهد شـد. بـه دنبال تزريق روزانـه كـافئين بـه مـوش هـا(mg/kg B.W. ١٠٠)،سطوح GSH كبدي در حدود ٢٢/٥ در صد نـسبت به گروه شـاهد كـاهش يافـت (٢٤). مـشخص شـده كـه كافئين با آزاد سازي ذخاير راديكال‌هاي هيدروپراكسيدها از غشاء اسپرم‌ها نوعي فعاليت پرواكسيداني رااز خود بـه نمايش مي‌گذارد.اين راديكال‌ها به نوبه خود توسط ديگـر عناصر غشايي جذب شده و با ايجاد راديكال‌هاي جديـد در غشاء و محيط عمل اسپرم‌هـا موجبـات تخريـب ايـن نواحي را فراهم خواهند آورد(٢٢).

كاربرد آنتي اكسيدان‌هـا بـه عنـوان مـواد دوركننـده راديكال‌هـاي آزاد از محـيط اطـراف سـلول هـا، موجـب فروكش سازي روند LPO شده و بدين ترتيـب سـاختار بيوشيميايي سلول‌ها نيزمحفـوظ خواهنـد مانـد. در سـال ١٩٩٤، گروهي از محققين عنوان نمودندكه اضافه سـازي يك آنتـي اكـسيدان بـه مجموعـه اسـپرم‌هـاي حاصـل از سانتريفوژ مايع اسپرمي، موجب كاهش صـدمات سـلولي ناشي از اجراء اين روش بر آنان مي‌گردد(١).در راس اين

صدمات LPO قرار داشته كه خود ناشي از افزايش غيرطبيعي ميزان ROS در محيط است (۳-۱).در پژوهش حاضرمشخص گرديد كه كاربرد غلظت هايي معين از تورين و آلبومين در مهار سازي روند LPO بسيار موثر و مفيد خواهد بود.

در يك تحقيق اثر تورين بر ميزان پراكسيداسيون سلولي در جدار سرخرگ آئورت موش‌هاي با رژيم غذايي غني از فروكتوز (به مدت ٤ هفته)، مورد بررسي قرار گرفت و مشخص شد كه ميزان پراكسيدهاي ليپيدي و ساير تركيبات كونژوگه مربوط به آنان در موش هايي كه تورين را همراه با آب آشاميدني دريافت كرده بودند، به طور معني داري كاهش يافته بود(۲۵).در همين راستا، Balkan و همكارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند كه كاربرد تورين ميزان MDA و سطح تركيبات كونژوگه با آن را در پلاسماي خون، كبد و آئورت خرگوش، كاهش مي‌دهد. در اين مطالعه سيستم آنتي اكسيداني كبد بدون تغيير باقي ماند و به نظر مي‌رسد اعمال اين اثر تنها به دليل قدرت آنتي اكسيداني تورين و تاثير آن در كاهش دهي چربي‌هاي سروم خون باشد(۲٦).

در مورد آلبومين نيز مشخص شده كه آلبومين نه تنها به پراكسيدهاي ليپيدي ناشي از فعاليت فسفوليپاز ۲ Aمتصل شده و آنان را بي اثر مي‌سازد، بلكه قادر است كه پراكسيداسيون چربي‌ها را نيز ترميم كند. علاوه بر آن به وسيله خاصيت آنتي اكسيداني و كلاتوري خود، فلزات واسطه‌اي را كه باعث پيشرفت و گسترش واكنش‌هاي اكسيداسيون سلولي مي‌شوند را جذب نموده و در نهايت از محيط دور مي‌سازد(۱۰).هم چنين در يك گزارش جالب توجه آمده است كه،آلبومين نيز واجد فعاليت پراكسيدازي بوده و پراكسيدهاي ليپيدي را به الكل‌هاي مربوطه مبدل ساخته و بدين سان آنان را از محيط عمل سلول‌ها دور مي‌سازد (۲۷).

بررسي واكنش اكروزومي در اسپرم‌هاي گاو

ميزان توانايي سلول‌هاي اسپرم در اجراي واكنش اكروزومي به عنوان عامل تعيين كننده اي در باروري مطرح بوده وتضمين كننده فرايند لقاح كامل و مناسب است. استحكام طبيعي غشاء نه تنها براي متابوليسم طبيعي اسپرم ها،بلكه جهت اتصال موفق اسپرم به تخمك و واكنش اكروزومي طبيعي (بخشي از مرحله ظرفيت پذيري اسپرم‌ها بوده كه به همراه با حركات شديد تاژك در دست يابي اسپرم به تخمك نقش مهمي داشته و منجر به لقاح مي‌گردد) سلول‌هاي اسپرم، لازم و ضروري است. در اين ارتباط استراتژي كاربرد مواد آنتي اكسيدان در جهت بهبود هر چه بيشتر وضعيت استحكام غشاء اسپرم‌ها به عنوان يك امر ضروري، مورد نظر پژوهش گران اين حوزه قرار گرفته است (۲۸). سلول‌هاي اسپرم در طي روند اسپرماتوژنز حجم عمده اي از سيتوپلاسم خود را از دست داده، بنابراين در مقايسه با سلول‌هاي سوماتيكي واجد مواد آنتي اكسيدان كم تري بوده و چنانچه پلاسماي مايع اسپرمي يا محيط زيست اسپرم‌ها كه حاوي انواع زيادي از آنتي اكسيدان‌هاي آنزيمي و غير آنزيمي است، از آنان جدا گردد شرايط بسيار نامساعد وخطرناكي را براي اين سلول‌ها فراهم آورده كه اولين پيامد آن هجومROS موجود در محيط خواهد بود(۲،۱).

در پژوهش حاضر، واكنش اكروزومي و به دنبال آن هضم لايه نازك از ژلاتين در گروه‌هاي تيمار شده با كافئين و آهن مشاهده نگرديد. از جمله نقايص القاء شده توسط اثر LPO در اسپرم‌ها اختلالات گسترده در غشاء

سلولي آنان بوده كه موجب تضعيف اتصال اين سلول‌ها به سطح تخمك مي‌شوند(۱۸،۹،۲). كافئين در جهت ارائه پديده ظرفيت پذيري اسپرم‌هاي گونه‌هاي مختلف از پستانداران نقشي اساسي دارد. كافئين با تغيير غلظت كلسيم درون سلولي موجب افزايش فعاليت آنزيم‌هاي دخيل در پيشبرد واكنش اكروزومي شده و بدين ترتيب در طي پژوهش حاضر موجب تخليه محتوي كيسه اكروزومي وآنزيم‌هاي هيدروليتيكي آن در مرحله قبل از اضافه‌سازي به لام‌هاي ژلاتين‌دار شده است. Funahashi and Nagai در سال ۲۰۰۱ نشان دادندكه كافئين موجب ظرفيت پذيري و واكنش اكروزومي خود به خودي در اسپرم‌هاي بز مي‌شود (۲۹).

HSU و همكارانش نيز در سال ۱۹۹۱ نشان دادند كه آب اكسيژنه به عنوان يكي از انواع ROS قادر به القاء واكنش اكروزومي در اسپرم‌هاي موش صحرايي است (۳۰). از طرف ديگر مكانيسم ديگري را مي‌توان در ارتباط با آب اكسيژنه عنوان نمود و آن اين كه اين ماده به عنوان سوبستراي اصلي در واكنش هابر- ويس مطرح بوده و درحضور يون‌هاي آهن به راديكال‌هاي هيدروكسيل مبدل مي‌شود. اين راديكال‌ها نيز به نوبه خود موجب القاءو گسترش LPO در غشاهاي زيستي خواهند شد و يكي از نتايج حتمي آن ايجاد اختلال در غشاءهاي اكروزومي و سپس مهار واكنش اكروزومي خواهد بود.هم چنين مشخص شده كه القاء روند LPO موجب مهار تبادلات يوني لازم جهت فعاليت‌هاي اسپرم مي‌شود(۳۱،۲۸).

در پژوهش حاضر، هر چند كه كاهش معني داري در توليد محصولات نهاييLPO پس از اضافه سازي آنتي اكسيدان‌ها حاصل گرديد،اما نمي‌توان آن را به عنوان ملاك و معيار مشخصي جهت ارزيابي چگونگي عملكرد اكروزوم سلول‌هاي اسپرم در نظر گرفت زيرا بازسازي و ترميم آسيب‌هاي وارد شده به غشاء سلول‌هاي اسپرم به طور كامل توسط عملكرد تورين و آلبومين حاصل نگرديد و ميزان غلظت MAD نيز در طي اين واكنش‌ها به حد طبيعي خود نرسيد.لذا علي رغم توان آنتي اكسيداني تورين و آلبومين، مقدمات ترميم و بازسازي اكروزوم به طور كامل فراهم نگرديد.

بررسي ميزان شكست‌هاي DNA در اسپرم‌هاي گاو

آسيب‌هاي احتمالي در ساختار DNA مانع از پيشبرد روند لقاح نشده، اما اين امكان وجود دارد كه در آينده به ناهنجاري‌هاي جنيني منجرگردد (۱۱). Barroso و همكارانش در سال۲۰۰۰ عنوان نمودند كه مقدارROS توليد شده در محيط را مي‌توان به عنوان يك عامل پيشگويي كننده در بروز آسيب در DNA به شمار آورد (۳۲). در پژوهش حاضر، اضافه سازي كافئين و آهن به نمونه‌هاي اسپرم گاو منجر به بروز آسيب‌هاي شديد و معني دار در ساختارDNA نگرديد. Lopez و همكارانش در سال ۱۹۹۸ نشان دادند كه ROS به صورت وابسته به زمان و در دراز مدت قادر به ايجاد آسيب در ساختار DNA سلول‌هاي اسپرم انسان بوده و چنين اثراتي با استفاده از مواد آنتي اكسيداني تعديل مي‌يابند(۳۳). به هر حال مكانيسم دقيقي كه بتوان به كمك آن چگونگي اثر كافئين و آهن را بر ساختار DNA سلول‌هاي اسپرم توجيه نمود، به درستي مشخص نيست.

ROS (به ويژه آب اكسيژنه) قادر به اكسيداسيون بازهاي DNA و هم چنين برخي پروتئين‌ها در سلول‌هاي مختلف بوده و اين اكسيداسيون منجر به ايجاد پل‌هاي

عرضي در بين دو رشته‌ي DNA خواهد شد(۳۱).در ساير پژوهش‌ها نشان داده شده كه يك همبستگي منفي بين ميزان آسيب‌هاي DNA و كيفيت مايع اسپرمي از نظر شكل، قدرت تحرك، وتوان باروري اسپرم‌ها وجود دارد (۹،۱۱،۳٤). با توجه به اين مطالب و با در نظر گيري داده‌هاي اين پژوهش، مي‌توان اظهار نمود كه علي رغم وجود پراكسيداسيون چربي‌ها در محيط‌هاي حاوي كافئين و آهن، به علت آن كه مقدار راديكال‌هاي آزاد و يا ROS كافي در محيط اطراف DNA سلول‌هاي اسپرم گاو فراهم نگرديده بود، لذا آسيب‌هاي شديد در DNA مشاهده و ثبت نگرديد. نكته ديگر آن كه اختلافات موجود بين جنس‌ها و گونه‌هاي مختلف جانوري، موجب بروز نتايج متفاوت در ساختار DNA سلول‌هاي اسپرم متعاقب استرس اكسيداتيو مي‌گردد. در اين قسمت دو اختلاف مهم مد نظر قرار دارند: اول- اختلاف بين ساختار بيوشيميايي غشاء پلاسمايي سلول‌ها و نيز غشاء هسته‌اي سلول‌هاي اسپرم كه به طور مسلم ميزان مقاومت متفاوتي را در مقابل استرس اكسيداتيو از خود نشان مي‌دهند، و دوم- وجود منابع آنتي اكسيداني مختلف و متفاوت در سيتوپلاسم و شيره هسته سلول‌هاي اسپرم در جنس‌ها و گونه‌هاي مختلف جانوري، كه در اين ارتباط مي‌توان اظهار نمود كه توان آنتي اكسيداني سلول‌هاي اسپرم گاو در مقايسه با سلول‌هاي مشابه آنان در انسان بيشتر بوده، لذا DNA آنان نيز مقاومت بيشتري را در مقابل هجوم راديكال‌هاي آزاد محيط از خود به نمايش گذارده، و بنابراين مصونيت بيشتري نيز خواهد داشت.

تشكر و قدرداني

بدين وسيله از مسؤلين دانشگاه پيام نور مركز اصفهان به جهت تامين منابع مالي اين پژوهش و نيز مساعدت جناب آقاي دكتر بهزاد شارقي رئيس محترم دانشكده علوم دانشگاه شهركرد، و همكاري جناب آقاي سيد رسول صيدايي كارشناس محترم آزمايشگاه فيزيولوژي جانوري گروه زيست شناسي دانشگاه شهركرد، تشكر و قدرداني مي‌گردد.

منابع

1- R.J. Aitken, and H. Fisher, Reactive oxygen species generation and human spermatozoa; the balance of benefit and risk. Bioassay 16: 259-267. (1994).

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

3- R.J.K, Anand, M., Arabi, K.S. Rana, And U. Kanwar, Role of vitamin C and E with GSH in checking the peroxidative damage to human ejaculated spermatozoa. Int. J. Urol. (7 suppl.)(S 74) p53. (2000).

4- M., Arabi, R.J.K. Anand, and U. Kanwar, Analysis of the impact of caffeine on membrane integrity, redox ratio and GST in human ejaculated sperm: effectiveness of antioxidants. Proc. Int. Cong. Androl. (Volume of Short communications): 365-

369. (2001).

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

6- M., Arabi, S.N., Sanyal, U. Kanwar, and R.J.K. Anand, 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. (2003).

7- M. Arabi, Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia 36: 306-310. (2004).

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

9- R.J. Aitken, Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol. Repord. 59: 1037-1046. (1999).

10- B. Halliwell, and J.M. Ggutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. Biochem. J. 219: 1-14. (1984).

11- C.M. Hughes, and W. Thompson, A comparison of baseline and induced DNA damage in human sperm from fertile men, using a modified comet assay. Mol. Hum. Repord. 2: 613-619. (1996).

12- R. Yanagimachi, Mammalian fertilization. In: physiology of reproduction. eds. Knobil, E. and Neill, J., Raven Press, New York: 189-317. (1994).

13- R.M., Gatti, R. Radi, and O. Augusto, Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. FEBS Lette. 348: 287-290. (1994).

14- J. Blanchard, and S.J.A. Sawers, Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and olderly men. J. pharmacoki. Net. Biopharm. 11:109-112. (1983).

15- L.S. Goodman, and A.C. Gilman, The pharmacological basis therapeutics, McGraw- Hill, pp 672-682. (1996).

16- R.J., Aitken, D. Harkiss, and D. Buckingham, Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. J. Reprod. Fertil. 98: 257-265. (1993).

17- M. Lees, and J. Paxman, Modification of Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. Anal. Biochem. 47**:** 184-192. (1972).

18- G., Fiscor, L.C., Ginsberg, G.M., Oldford, R.E. Snoke, and R.W. Becker, Gelatin- substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. Fertil. Steril 39: 543-552. (1993).

19- N.P., Singh, M.T., McCoy, R.R. Tice, and E.L. Schneider, A simple technique for quantitiation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res. 175: 184-191. (1988).

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

21-J.M.C. Gutteridge, Antioxidants, nutritional

supplements and life-threatening diseases. Br. J. Biomed. Sci. 51: 288-295. (1994).

22- D.A., Imoedemhe, A.B., Sigue, E.L. Pacpaco, and A.B. Olazo, The effect of caffeine on the ability of spermatozoa to fertilize matures human oocytes. J. Assist. Reprod. Genet. 9:155 -160. (1992).

23- M. Jafari, and A. Rabbani, Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. Toxicology 149 (2-3): 101-108. (2000).

24- M.M. Farag, and E.M. Abdel-Meguid, Hepatic gluatathione and lipid peroxidation in rats treated with theophylline. Effect of dose and combination with caffeine and acetaminophen. Biochem. Pharmacol. 47:443-446. (1994).

25- A.T. Antiha Nadhini, and C.V. Anuradha, Taurine modulates antioxidant potential and controls lipid peroxidation in the aorta of high fructose-fed rats. J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 6(2): 129-33. (2002).

26- J. Baikan, and O. Kanbagli, Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid level in the plasma, liver aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(8): 1755-1758. (2002).

27- M.K. Cha, and L.H. Kim, Glutathione-liked thiol peroxidase activity albumin a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. Biophys. Res. Commun. 222:619-625. (1996).

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

29- H. Funahashi, and T. Nagai, Regulation of in vitro penetration of frozen-thowed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. Mol. Reprod. Dev. 58: 424-431. (2001).

30- P.C., Hsu, C.C. Hsu, and Y.I. Guo, Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. Toxicology 139(1-2): 93-101. (1999).

31- L. Ernster, Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants, CRC Press, Boca Raton, pp 1-38. (1993).

32- G., Barroso, M. Morshedi, and S. Oehninger, Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum. Reprod. 15: 1338-1344. (2000).

33- S., Lopez, A., Jurisicova, J.G. Sun, and R.F. Casper, Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod. 13: 896-900. (1998).

34- E., Host, S. Lindenberg, and S. Smidt-Jensen, The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. Acta. Obs. Gyn. Scandinavia. 79: 559-563. (2000).