توان آنتی‌اکسیدانی اسکوربات و آلبومین در نمونه‌های اسپرم گاو تیمار یافته با جیوه

مهران عربی* و حسن شاهقلیان

***گروه زیست‌شناسی- دانشگاه شهرکرد**

گروه ریاضی- دانشگاه شهرکرد

پست الکترونیکی: mehranarabi@yahoo.com

چکیده

امروزه اهمیت جیوه (II) به عنوان یک یون فلزی مضر در ایجاد سمیت دستگاه تولید مثل مدل‌های جانوری و نیز اثرات نامطلوب بر باروری مردان، به خوبی مد نظر بوده و هدف ما نیز در پژوهش حاضر بررسی توان آنتی‌اکسیدانی اسکوربات و آلبومین در نمونه‌های اسپرم گاو تیمار یافته با کلرید جیوه، در شرایط آزمایشگاهی است. نتایج نشان داد که ۱۰۰μM جیوه قادر به القاء پراکسیداسیون چربی‌ها به طور معنی‌دار طی یک دوره زمانی سه ساعته است. افزودن اسکوربات (۷۰۰ μM و ۱۰۰۰ میکرومولار) و آلبومین (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) موجب کاهش میزان پراکسیداسیون چربی‌های محیط گردید. اما در مقابل، کاربرد ۱۳۰۰μM اسکوربات و آلبومین ۱ درصد دارای اثرات منفی بوده، به طوری که موجب گسترش هر چه بیشتر پراکسیداسیون چربی‌ها گردیدند. علاوه بر این، تیمار جیوه موجب کاهش و افت معنی‌دار در قدرت تحرک و نیز درصد اسپرم‌های زنده در محیط‌های متفاوت گردید .در این قسمت نیز فقط غلظت‌های کم از اسکوربات و آلبومین مؤثر واقع شده و اثرات منفی جیوه را خنثی ساختند. از سوی دیگر، افزودن جیوه به نمونه‌های هموژن شده اسپرم گاو، موجب کاهش قابل توجه و معنی‌داری در میزان گلوتاتیون احیاء شده محیط گردید که در همراهی غلظت‌های کم از این دو آنتی‌اکسیدان، این اثر منفی نیز معکوس شده و ذخایر آسیب دیده گلوتاتیون احیاء شده سلول‌های اسپرم ترمیم گردید. جالب توجه آن که در این قسمت کاربرد ۱۳۰۰μM اسکوربات و نیز آلبومین ۱ درصد موجب افزایش نسبی سطوح گلوتاتیون احیاء شده محیط گردیده و می‌توان آن را در ارتباط با القاء پراکسیداسیون چربی‌ها و سپس آزادسازی گلوتاتیون احیاء شده از منابع درون سلولی، ارزیابی نمود. بنابراین، پژوهش حاضر نشان می‌دهد که جیوه به عنوان یک آلاینده فعال در طبیعت عمل نموده و قادر به القاء ناباروری در سلول‌های اسپرم جانوران از طریق ایجاد تغییر در جنبه‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آنان می‌باشد. در ضمن به پژوهشگران توصیه می‌شود که آنتی اکسیدان‌ها را به عنوان یک تیغ دو لبه در نظر گرفته و به هنگام به کارگیری محدوده‌های ظریف غلظتی از این مواد، جنبه‌های منفی احتمالی این کاربرد را نیز مد نظر داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: *اسپرم گاو، اسکوربات، آلبومین، پراکسیداسیون، قدرت تحرک، گلوتاتیون احیاء شده*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تمامی موجودات زنده هوازی با پارادوکسی به نام اکسیژن مولکولی (O_2) روبرو بوده یعنی از یک سو نیازمند بـه آن بوده و از سویی دیگر با وجـود ضـروری بـودن اکـسیژن، متابولیـت‌هـای آن هماننـد رادیکـال هیدروکـسیل ($OH^{\cdot}$)، آنیون سوپراکـسید (O_2^{-}) و یـا آب اکـسیژنه (H_2O_2) بـر عملکرد و ساختار سلول‌ها تأثیر منفی نهاده و بقاء موجود زنده را در معرض خطر قرار می‌دهند و بـه همـین علـت اکسیژن را نوعی تیغ دو دم در نظـر مـی‌گیرنـد. مجموعـه مشتقات اکسیژن موسوم به انواع اکسیژن فعال[1] بوده که به عنوان یکی از عوامل ایجـاد نابـاروری در انـسان شـناخته می‌شوند. اکسیژن فعـال دارای اثـری دوگانـه بـر عمـل و ساختار سلول‌های اسپرم بوده، از یک طرف جهـت انجـام برخی روندهای طبیعی همانند واکنش آکروزومی در ایـن سلول‌ها ضروری بوده و از طرفـی دیگـر در غلظـت‌هـای زیاد در محیط که موسوم به استرس اکسیده شـدن اسـت، موجب مهار قدرت تحرک[2] و نیز تغییر در شـکل ظـاهری این سلول‌ها شده و بدین ترتیب درصدهایی از نابـاروری یا عقیمی را ایجاد خواهند نمود. یکـی از تظـاهرات مهـم اسـترس اکـسیده شـدن در سـلول‌هـا، پراکـسیداسیون چربی‌های غشاء[3] است. پراکسیداسیون چربی یـک پدیـدهٔ فیزیولوژیـک بـوده و در همـهٔ سـلول‌هـایی کـه غنـی از اسیدهای چرب غیراشباع هـستند، رخ داده و از مجموعـه واکنش‌هایی که شامل تخریب و تشکیل مجدد پیونـدهای دوگانه در این اسیدهای غشایی است، تـشکیل مـی‌شـود. روند پراکسیداسیون چربی موجب تخریب ساختار غـشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمـی، و ایجـاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم شده، کـه منجـر بـه ناباروری در مردان می‌گردند [۸- ۱].

آنتی‌اکسیدان‌ها[4] ترکیبـاتی هـستند کـه قـادر بـه جمع‌آوری اکسیژن فعـال و سـپس خنثـی‌سـازی آنـان در داخل و خارج سلول‌های بدن می‌باشند. سلول‌های اسـپرم طی روند اسپرماتوژنز، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را به همراه مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از دست داده و بدین ترتیب در مقابل روند استرس اکسیده شدن حـساس گردیده، اما به علت غوطه‌وری در پلاسمای مایع اسپرمی[5] (منی) کـه محتـوی آنتـی‌اکـسیدان‌هـای فراوانـی هماننـد اسکوربات[6] یا ویتامین C، اورات‌هـا، تـورین، گـروه‌هـای سولفیدریل، کاتـالاز و سوپراکـسید دیـسموتاز اسـت، بـه خوبی در مقابل رونـد اسـترس اکـسیده شـدن محافظـت می‌گردند. امروزه اسـتراتژی کـاربرد آنتـی‌اکـسیدان‌هـا در راستای معکوس‌سازی و رفع صدمات وارده به سـلول‌هـا مدنظر محققان قرار گرفته است. وجود یک آنتـی‌اکـسیدان مؤثر و قوی در محیط و در زمانی که سـلول‌هـای اسـپرم محروم از محیط حامی خود یعنی پلاسمای مایع اسـپرمی می‌باشند، بسیار کارساز بوده و منجر به بقاء آنـان خواهـد شد. در این راستا این مطلب نیز مشخص گردیده کـه، در پلاسمای مـایع اسـپرمی مـردان عقـیم مقـادیر کمتـری از آنتی‌اکسیدان‌هـا در مقایـسه بـا مـردان بـارور وجـود دارد [۱ و ۹].

اسـکوربات بـه عنـوان اولـین خـط دفـاعی آنتی‌اکسیدانی در خون و پلاسمای مایع اسـپرمی بـوده، و موجب مهار روند اکسیداسیون لیپـوپروتئین‌هـا مـی‌شـود. اسکوربات روزانه به میزان ۵۰۰ میلی‌گـرم و یـا بیـشتر در رژیم غذایی یافت مـی‌شـود. ایـن ویتـامین در حـدود ۶۵ درصد از توان آنتی‌اکسیدانی پلاسمای مایع اسپرمی متعلق به مردان بارور را شـامل مـی‌گـردد [۱۰]. در سـال ۱۹۷۷ مشخص گردید که حضور اکسیژن فعال در پلاسمای مایع

1- Reactive Oxygen Species(ROS)
2- Motility
3- Lipid Peroxidation (LPO)
4- Antioxidants
5- Semen
6- Ascorbate

Archive of SID

www.SID.ir

اسپرمی موجب کاهش معنی‌داری درغلظت اسکوربات آن می‌گردد [۱۱]. آلبومین نیز به عنوان یک پروتئین کوچک موجود در مایع اسپرمی، یون‌های فلزی موجود در محیط زیست سلول‌ها را که باعث پیشرفت و گسترش واکنش‌های پراکسیداسیون سلولی می‌شوند، جذب نموده و دور می‌سازد [۱۲]. همچنین مشخص شده که آلبومین دارای خاصیت جذب محصولاتی مضر همانند نیترات پروکسی که از واکنش آنیون سوپراکسید با اکسید نیتریک حاصل می‌گردد، نیز می‌باشد [۱۳]. در سال‌های اخیر با توجه به وفور جیوه در طبیعت، بررسی اثرات مختلف این عنصر در بدن جانوران، موضوع مطالعه بسیاری از محافل علمی بوده است. جیوه به دو شکل غیر آلی (منابع طبیعی) و آلی (منابع صنعتی) در محیط زیست جانوران وارد شده و به تدریج در بدن آنان انباشته می‌گردد. بیشتر جیوه موجود در اتمسفر از منابع غیر آلی بوده و در رسوبات، آب و خاک ذخیره شده است. همچنین جیوه به میزان زیادی در آب‌های خروجی از کارخانجات چرم‌سازی، کاغذسازی، و باطری‌سازی یافت شده و در طبیعت نیز به عنوان یک آفت‌کش بر ضد نرم‌تنان مورد استفاده گسترده قرار می‌گیرد [۱۴ و ۱۵].

در این پژوهش سعی بر آن بوده که اثرات کلرید جیوه (۱۰۰ میکرومولار، شاهد مثبت) به عنوان یک یون فلزی آلاینده در طبیعت، بر روی برخی پارامترهای بیوشیمیایی و عملکردی سلول‌های اسپرم گاو، همانند استحکام غشاء، میزان قدرت تحرک، درصد سلول‌های زنده و میزان گلوتاتیون احیاءشده[1] یا گلوتاتیون احیاء شده (گروه‌های تیولی غیر پروتئینی) بررسی گردید. در این راستا و به طور هم زمان نیز توان آنتی‌اکسیدانی اسکوربات (ویتامین C)(۷۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ میکرومولار) و آلبومین سرم گاوی[2] (۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۱ درصد) بر نحوهٔ عملکرد جیوه و در میان کنش با آن مورد ارزیابی قرار گیرد. در محاسبات به عمل آمده در این پژوهش، گروه فاقد آنتی‌اکسیدان واقع در زمان صفر از انکوباسیون به عنوان گروه مرجع یا شاهد منفی در نظر گرفته شد و این در حالی است که در این زمان فرصتی برای عملکرد جیوه وجود نداشته است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر بر روی سلول‌های اسپرم انزال یافته گاو نژاد هولشتاین[3] به انجام رسید. بدین منظور ۹ نمونه اسپرم (مایع منی خالص بدون ترکیبات نگهدارنده) از مرکز اصلاح نژاد دام و تلقیح مصنوعی سازمان جهاد کشاورزی، روستای کبوترآباد، شهرستان زیار، از توابع اصفهان تهیه و خریداری گردیدند. نمونه‌های مذکور به سرعت و در یک فلاسک حاوی یخ، به محل آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. پس از شستشو با محلول رینگر تایرود[4] (شامل: ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم KCl، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۰/۱ گرم $NaHCO_3$، ۰/۰۰۵ گرم NaH_2PO_4، ۰/۰۱ گرم $MgCl_2$، ۰/۱ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم Hepes، و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده) و در اثر عمل سانتریفوژ (۵۰۰×g، به مدت ۱۰ دقیقه) پلاسمای منی از سلول‌های اسپرم تفکیک گردید. رسوب‌های اسپرمی حاصله (حل شده در حداقل رینگر) در مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور سنجش میزان پراکسیداسیون چربی‌ها، میزان تولید ترکیبات واکنش دهنده با اسید تیوباربی توریک[5] از جمله مالون دی آلدیید[1]، مورد اندازه‌گیری قرار

1- GSH

2- Buffalo Serum Albumin (BSA)
3- Holstein
4- Tyrode Ringer
5- Thiobarbituric Acid (TBA)

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت. مخلوط واکنش شامل ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه اسپرمی، ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱/۲ درصد TBA، در حضور جیوه، و در حضور یا عدم حضور اسکوربات و آلبومین بود که به مدت یک ساعت در محیط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از حرارت دادن و سانتریفوژ نمودن مخلوط واکنش، مقدار غلظت کمپلکس TBA+MDA تشکیل شده (میزان جذب نوری سطحی‌ترین لایه از مخلوط واکنش) در لوله‌های آزمایش، در طول موج ۵۳۲ نانومتر و به کمک اسپکتروفوتومتر سنجیده شد و واحد نهایی جهت محاسبه آن μMMDA/mg protein.min، در نظر گرفته شد [۱۶].

جهت بررسی میزان قدرت تحرک سلول‌های اسپرم گاو، درصد سلول‌های متحرک و غیرمتحرک به کمک میکروسکوپ فاز متضاد، و در دمای اتاق (۲ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد)، به مدت سه ساعت و با فواصل زمانی یک ساعت، تعیین گردید [۱۷].

به منظور تعیین درصد تعداد سلول‌های اسپرم زنده و غیر زنده طی سه ساعت انکوباسیون، از روش رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین استفاده گردید. در این روش با کمک میکروسکوپ نوری معمولی بر روی هر لام ۴۰۰ عدد اسپرم شمارش گردید. اساس این روش بر رنگ‌پذیری اسپرم‌های زنده می‌باشد، به طوری که اسپرم‌های غیرزنده فاقد خاصیت رنگ‌پذیری می‌باشند [۱۸].

اندازه‌گیری میزان گروه‌های سولفیدریل (تیول) غیرپروتئینی به عنوان یک سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی در سلول‌های اسپرم گاو، که حدود ۹۰ درصد آنان گلوتاتیون احیاء شده است، در نمونه‌های اسپرم هموژن شده[2] (به کمک هموژنایزر با دور ۲۵۰ تا ۳۰۰ در هر دقیقه، و به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه)، در حضور جیوه، و در حضور یا عدم حضور آنتی‌اکسیدان‌ها، و با به‌کارگیری DTNB[3] به عنوان معرف به انجام رسید و واحد نهایی جهت محاسبه آن μM–SH/mg protein.min، در نظر گرفته شد [۱۹].

مواد شیمیایی مورد استفاده از کارخانهٔ مرک آلمان خریداری گردیدند. با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS، روش آماری t- استیودنت مورد استفاده قرار گرفت که به کمک آن میانگین نتایج گروه‌های تجربی با گروه شاهد مقایسه گردیدند. مقدار $p<0/05$، از نظرآماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج حاصله از این پژوهش به صورت میانگین ± انحراف استاندارد، ذکر گردیده‌اند.

نتایج

آزمون آماری در مورد میانگین داده‌های حاصل از آزمایش سنجش پراکسیداسیون چربی پس از یک دوره انکوباسیون سه ساعته (با فواصل زمانی یک ساعت)، نشان داد که اضافه‌سازی کلرید جیوه (۱۰۰μM) موجب افزایش قابل توجه و معنی‌دار در میزان کمپلکس TBA+MDA (وابسته به زمان) محیط گردید، به طوری که پس از ساعت سوم انکوباسیون سلول‌های اسپرم با جیوه این افزایش در مقایسه با زمان صفر انکوباسیون، به میزان ۶۶/۵۹ درصد ($p<0/001$) بود (شکل ۱). اضافه‌سازی غلظت‌های کم از اسکوربات (۷۰۰ μM) به محیط فوق موجب کاهش معنی‌دار در میزان گسترش پراکسیداسیون چربی طی سه ساعت آزمایش گردید، که این روند مؤید خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ویتامین و دورسازی رادیکال‌های آزاد از محیط حاوی اسپرم‌های گاو است. در این قسمت، در ساعات دوم و سوم از انکوباسیون میزان کاهش MDA محیط تحت اثر اسکوربات بیشتر بوده به طوری که در

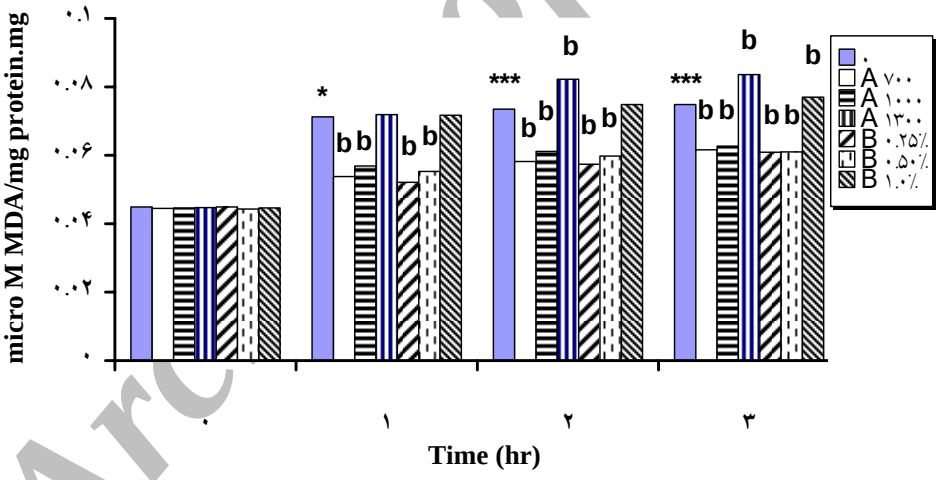
1- Malondialdehyde
2- Homogenated Sperm Samples
3- 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]

Archive of SID

www.SID.ir

ساعت سوم این مقدار در حدود ۱۷/۶۵ درصد ($p<۰/۰۱$) (نسبت به گروه تیمار یافته با جیوه در همان ساعت از انکوباسیون) بود. درغلظت ۱۰۰۰ µM از اسکوربات میزان کاهش تولید MDA در مقایسه با عملکرد غلظت ۷۰۰ µM کم‌تر بوده و در غلظت ۱۳۰۰ µM این روند به صورت غیر قابل انتظار معکوس شده (نسبت به تیمار جیوه مربوطه) و نه تنها هیچ مهاری بر روند پراکسیداسیون اعمال نکرده بلکه موجب افزایش و پیشبرد روند پراکسیداسیون چربی در محیط گردید. این افزایش تنها در ساعات دوم و سوم انکوباسیون مشاهده گردیده و در ساعت دوم این میزان بیشتر بود (۱۱/۸۴ درصد، $p<۰/۰۱$) (شکل ۱).

پس از اضافه‌سازی درصدهای متفاوت از آلبومین مشخص گردید که غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵۰ درصد از آن موجب افت معنی‌دار در میزان تولید MDA محیط گردید. در ساعت اول انکوباسیون این میزان بیشتر از سایر ساعات بود. در کاربرد غلظت ۱ درصد از آلبومین میزان کاهش MDA محیط در مقایسه با گروه‌های تیمار یافته با جیوه معنی‌دار نبوده و حتی در ساعت سوم انکوباسیون این روند معکوس گردیده و موجبات گسترش هر چه بیشتر روند پراکسیداسیون چربی را فراهم آورد (۸/۴۲ درصد، $p<۰/۰۱$، نسبت به محیط‌های حاوی جیوه و بدون آنتی‌اکسیدان) (شکل ۱).



شکل ۱- میزان مالون دی آلدیید (MDA) تولید شده در نمونه‌های اسپرم گاو تیمار یافته با جیوه، در حضور غلظت‌های متفاوت از آنتی‌اکسیدان‌های اسکوربات (A) و آلبومین (B) در فواصل زمانی مختلف از انکوباسیون
اعداد موجود در شکل نمایان‌گر، میانگین ± انحراف استاندارد بوده و هر تیمار شامل سه تکرار سه تایی است.
مقایسه شده با زمان صفر انکوباسیون و فاقد آنتی‌اکسیدان (شاهد) : $p<۰/۰۰۱$ *** ، $p<۰/۰۱$ **
مقایسه شده با ساعت سپری شده مربوطه طی انکوباسیون: $p<۰/۰۱$ b

در ادامه این تحقیق، قدرت تحرک سلول‌های اسپرم در محیط‌های مختلف اندازه‌گیری گردید. کاربرد جیوه موجب کاهش معنی‌دار در قدرت تحرک و فعالیت اسپرم‌های گاو طی سه ساعت دوره انکوباسیون گردید (نسبت به زمان صفر از انکوباسیون). این کاهش در ساعت سوم به میزان ۱۲/۹۴ درصد ($p<۰/۰۰۱$) بود. در همین راستا، اضافه‌سازی غلظت ۷۰۰µM از اسکوربات به نمونه‌های تیمار یافته با جیوه موجب افزایش معنی‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

در تعداد اسپرم‌های فعال محیط شد (جدول ۱). در مقابل هنگامی که غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ میکرومولار از اسکوربات به محیط‌های فوق افزوده گردید، نه تنها هیچ تصحیحی به انجام نرسید بلکه یک کاهش مجدد معنی‌دار نیز در درصد قدرت تحرک اسپرم‌ها به وقوع پیوست (جدول ۱). در ادامه، استفاده از غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد از آلبومین موجب افزایش معنی‌داری در میزان قدرت تحرک اسپرم‌ها در تیمارهای جیوه گردید اما غلظت ۱ درصد از آلبومین فاقد این اثر بود و موجب کاهش معنی‌داری در قدرت تحرک اسپرم‌ها (نسبت به تیمارهای جیوه) در طی ساعات دوم و سوم از انکوباسیون گردید (جدول ۱).

جدول ۱- درصد قدرت تحرک سلول‌های اسپرم گاو تیمار یافته با جیوه، در حضور غلظت‌های متفاوت از آنتی‌اکسیدان‌های اسکوربات و آلبومین در فواصل زمانی مختلف از انکوباسیون

	زمان انکوباسیون (ساعت)			
غلظت آنتی‌اکسیدان	۰	۱	۲	۳
صفر	۸۵ ± ۰/۸	۸۰ ± ۰/۹ **	۷۷ ± ۱ **	۷۴ ± ۰/۹ ***
۷۰۰μM A	۸۶ ± ۰/۸	a ۸۳ ± ۰/۷	a ۸۰ ± ۰/۷ **	c ۸۲ ± ۰/۶ *
۱۰۰۰μM A	۸۷ ± ۰/۸	۸۲ ± ۰/۶ *	a ۷۳ ± ۰/۹ ***	a ۷۰ ± ۰/۸ ***
۱۳۰۰μM A	۸۳ ± ۰/۷	۸۰ ± ۰/۷ **	b ۷۲ ± ۰/۸ ***	b ۶۸ ± ۰/۶ ***
٪ ۰/۲۵ B	۸۷ ± ۰/۹	a ۸۳ ± ۰/۹	b ۸۳ ± ۰/۷	c ۸۴ ±۱
٪ ۰/۵ B	۸۷ ± ۰/۹	a ۸۳ ± ۰/۶	b ۸۴ ± ۱	c ۸۴ ± ۱
٪ ۱ B	۸۵ ± ۰/۶	۸۰ ± ۰/۷ **	a ۷۳ ± ۰/۹ ***	b ۷۰ ± ۰/۸ ***

A = اسکوربات و B = آلبومین(BSA).

اعداد موجود در جدول نمایانگر، میانگین ± انحراف استاندارد بوده و هر تیمار شامل سه تکرار سه تایی است.

مقایسه شده با زمان صفر انکوباسیون و فاقد آنتی‌اکسیدان(شاهد): $p<۰/۰۰۱$ ***، $p<۰/۰۱$ **، $p<۰/۰۵$ *

مقایسه شده با ساعت سپری شده مربوطه طی انکوباسیون: $^{a}p<۰/۰۵$، $^{b}p<۰/۰۱$، $^{c}p<۰/۰۰۱$

به منظور تأیید یافته‌های آزمایش‌های پراکسیداسیون چربی و نیز قدرت تحرک اسپرم‌ها، از روش رنگ‌آمیزی با ائوزین جهت تعیین درصد اسپرم‌های زنده موجود در هر محیط استفاده شد. نتیجه نشان داد که جیوه موجب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های زنده محیط طی ساعات دوم و سوم انکوباسیون می‌شود (به ترتیب ۷/۷۸ و ۶/۶۷ درصد، $p<۰/۰۱$) (جدول ۲). اضافه‌سازی غلظت‌های کم از اسکوربات (۷۰۰μM) و آلبومین(۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) موجب افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های زنده طی ساعات دوم و سوم انکوباسیون با جیوه گردیدند. در مقابل، افزودن غلظت‌های زیاد از اسکوربات (۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ میکرومولار) و نیز غلظت ۱ درصد آلبومین موجب کاهش مضاعف و معنی‌دار درصد سلول‌های زنده محیط گردیدند (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- درصد سلول‌های اسپرم زنده گاو در نمونه‌های تیمار یافته با جیوه، در حضور غلظت‌های متفاوت از آنتی‌اکسیدان‌های اسکوربات و آلبومین در فواصل زمانی مختلف از انکوباسیون

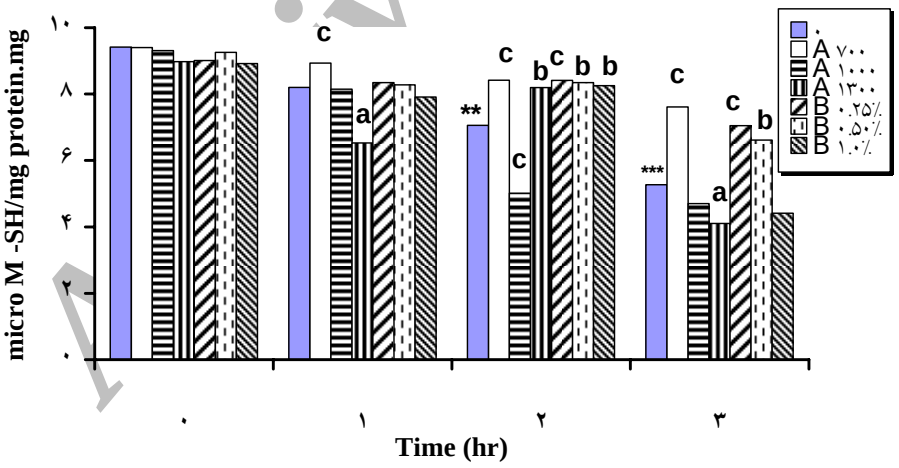
	زمان انکوباسیون (ساعت)			
غلظت آنتی‌اکسیدان	۰	۱	۲	۳
صفر	۹۰ ± ۰/۸	۸۸ ± ۰/۸	** ۸۴ ± ۰/۷	** ۸۳ ± ۰/۵
۷۰۰µM A	۹۰ ± ۰/۸	۹۰ ± ۰/۷	b ۸۹ ± ۰/۵	a * ۸۶ ± ۰/۹
۱۰۰۰µM A	۹۰ ± ۰/۸	۸۸ ± ۰/۹	** ۸۲ ± ۰/۷	a *** ۸۰ ± ۰/۶
۱۳۰۰µM A	۸۹ ± ۰/۷	۸۸ ± ۰/۷	a *** ۸۰ ± ۰/۶	a *** ۸۰ ± ۰/۶
٪ ۰/۲۵ B	۸۹ ± ۰/۶	۸۹ ± ۰/۸	b ۹۰ ± ۰/۹	b ۸۹ ± ۰/۷
٪ ۰/۵ B	۹۰ ± ۰/۸	۸۹ ± ۰/۷	b ۸۹ ± ۰/۸	b ۸۹ ± ۰/۸
٪ ۱ B	۸۹ ± ۰/۶	* ۸۷ ± ۰/۸	** ۸۳ ± ۰/۶	*** ۸۱ ± ۰/۹

A = اسکوربات و B = آلبومین(BSA)

اعداد موجود در جدول نمایانگر، میانگین ± انحراف استاندارد بوده و هر تیمار شامل سه تکرار سه‌تایی است.

مقایسه شده با زمان صفر انکوباسیون و فاقد آنتی‌اکسیدان(شاهد): $p<۰/۰۰۱$ ***، $p<۰/۰۱$ **، $p<۰/۰۵$ *

مقایسه شده با ساعت سپری شده مربوطه طی انکوباسیون: $^{c}p<۰/۰۰۱$، $^{b}p<۰/۰۱$، $^{a}p<۰/۰۵$



شکل۲- میزان گلوتاتیون احیاء شده (GSH) در نمونه‌های اسپرم گاو با تیمار جیوه، در حضور غلظت‌های متفاوت از آنتی‌اکسیدان‌های اسکوربات (A) و آلبومین (B) در فواصل زمانی مختلف از انکوباسیون

در آخرین بخش، میزان گروه‌های تیولی غیرپروتئینی گلوتاتیون احیاء شده مورد سنجش قرار گرفت و مشخص گردید که جیوه به صورت معنی‌دار موجب کاهش میزان گلوتاتیون احیاء شده در این سلول‌ها شده به طوری که در سومین ساعت از انکوباسیون این کاهش در مقایسه با زمان صفر آن (شاهد) در حدود ۴۳/۹۹ درصد ($p<۰/۰۰۱$) بود (شکل ۲). اضافه‌سازی غلظت ۷۰۰µM از اسکوربات و نیز غلظت ۰/۲۵ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

از آلبومین موجب افزایش معنی‌دار در میزان گلوتاتیون احیاء شده محیط گردیدند ($p<۰/۰۰۱$). از سوی دیگر نیز افزودن غلظت ۱۰۰۰μM از اسکوربات سبب کاهش معنی‌داری در میزان گلوتاتیون احیاء شده (در ساعت دوم انکوباسیون) محیط گردید. با افزودن غلظت ۰/۵ درصد از آلبومین به محیط، افزایش معنی‌دار در میزان گلوتاتیون احیاء شده طی ساعات دوم و سوم انکوباسیون پدیدار گردید ($p<۰/۰۱$). نتیجهٔ قابل توجه‌ای که پس از کاربرد غلظت ۱۳۰۰μM از اسکوربات و نیز غلظت ۱ درصد از آلبومین حاصل گردید آن بود که در ساعات اول و سوم از انکوباسیون میزان گلوتاتیون احیاء شده محیط کاهش یافت اما در طی ساعت دوم آن بر میزان گلوتاتیون احیاء شده (نسبت به تیمار جیوه مربوطه) افزوده گردید ($p<۰/۰۱$).

بحث و تفسیر

سلول‌های اسپرم به علت وجود مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء خود بسیار مستعد دریافت استرس اکسیده شدن بوده و بدین ترتیب این واحدهای چربی به راحتی دچار تغییر حالت و وضعیت خواهند شد. از سوی دیگر، سلول‌های اسپرم طی روند اسپرماتوژنز حجم عمده‌ای از سیتوپلاسم خود را از دست داده، بنابراین در مقایسه با سلول‌های سوماتیکی دارای مواد آنتی‌اکسیدان کمتری بوده و چنانچه پلاسمای مایع اسپرمی یا محیط زیست اسپرم‌ها که حاوی انواع زیادی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است، از آنان جدا گردد شرایط بسیار نامساعد و خطرناکی را برای این سلول‌ها فراهم آورده، که اولین پیامد آن هجوم اکسیژن فعال موجود در محیط خواهد بود [۱ و ۲].

در این پژوهش اثرات جیوه بر روی سلول‌های اسپرم گاو و میان کنش آن با آنتی‌اکسیدان‌های اسکوربات و آلبومین (در غلظت‌های مختلف) مورد بررسی قرار گرفت. جیوه یک یون فلزی بسیار فعال و لیپوفیل بوده به طوری که بخار آن به سرعت از راه ریه‌ها و مخاط دهان جذب خون شده، از غشاء سلول‌ها عبور نموده و در بافت‌های بدن انباشته می‌گردد [۲۰]. در برخی گزارش‌ها به اثرات سمی جیوه بر عملکرد سلول‌های جانوری اشاره شده به طوری که برای مثال جیوه موجب القاء تولید اکسیژن فعال درون سلولی، آسیب در لوله‌های منی ساز بیضه، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول[1] و کاهش میزان گلوتاتیون احیاء شده سلول‌ها می‌شود [۲۴-۲۱]. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که جیوه به صورت وابسته به زمان، قادر به القاء و گسترش معنی‌دار روند پراکسیداسیون چربی در نمونه‌های اسپرم گاو شده ،که این اثر با افزایش غلظت MDA محیط به اثبات می‌رسد. در سال ۱۹۹۰ عنوان شد که کلرید جیوه در بافت‌های کبدی و کلیوی موش‌ها موجب گسترش روند پراکسیداسیون چربی شده و این اثر خود را از طریق پراکسیداسیون فسفولیپیدهای فسفاتیدیل سرین و فسفا تیدیل اتانول آمین غشاء این سلول‌ها به انجام رسانیده که خود مؤید حساسیت زیاد این دو فسفولیپیدها نسبت به جیوه است [۲۵]. در همین راستا مشخص شده که جیوه علاوه بر اتصال به گروه‌های تیولی پروتئین‌ها، به مجموعه‌ای از نقاط ویژه در مجموعه‌های فسفولیپیدی غشاء سلول‌ها نیز متصل گردیده و موجب کاهش سیالیت غشاء می‌شود [۲۶]. در یکی از جدیدترین پژوهش‌ها مشخص شده که جیوه از طریق فعال‌سازی فسفولیپاز A_2 موجود در غشاء لیزوزوم سلول‌ها موجب ناپایداری و تخریب غشاء این اندامک درون سلولی شده که نتیجه آن تخریب سلولی است [۲۷]. از سوی دیگر در سایر پژوهش‌ها به تولید مستقیم اکسیژن فعال توسط تأثیر جیوه

1- Programmed Cell Death

Archive of SID

www.SID.ir

بر بافت‌های بدن جانوران اشاره شده که موجب پیشبرد روند پراکسیداسیون چربی در سلول‌های آنان می‌شود [۳۰ – ۲۸]. نتایج قبلی به دست آمده در آزمایشگاه ما در مورد تأثیر یون‌های فلزی همانند جیوه و مس بر سلول‌های آبشش ماهی کپور معمولی نشان داد که جیوه به صورت وابسته به غلظت، موجب القاء پراکسیداسیون سلولی و افزایش تولید MDA در محیط می‌شود [۸]. بر طبق یک قاعده کلی، یون‌های فلزی با عمل واسطه‌ای خود قادر به تولید رادیکال پرقدرت هیدروکسیل به عنوان محرک اصلی روند پراکسیداسیون چربی از دیگر انواع اکسیژن فعال بوده که به نام معادلهٔ هابر– ویس معروف بوده و به صورت رابطهٔ زیر به انجام می‌رسد [۳۱]:

یون فلزی

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

کاربرد آنتی اکسیدان‌ها به عنوان مواد دور کنندهٔ رادیکال‌های آزاد به ویژه انواع اکسیژن فعال از محیط اطراف سلول‌ها موجب تقلیل میزان پراکسیداسیون چربی شده و بدین ترتیب ساختار بیوشیمیایی سلول‌ها نیز محفوظ خواهند ماند. در پژوهش حاضرمشخص گردید که کاربرد غلظت‌هایی معین از اسکوربات (۷۰۰ μM و۱۰۰۰) و آلبومین (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) موجب مهار روند پراکسیداسیون چربی شده اما در مقابل کاربرد غلظت‌های بیشتر از این دو آنتی‌اکسیدان واجد اثرات منفی بوده و باعث گسترش هر چه بیشتر پراکسیداسیون چربی خواهند گردید. نتایج آزمایشات ما در هم سویی نسبی با تحقیقی بود که در سال ۱۹۹۸ به انجام رسید و در آن مشخص گردید که اسکوربات تنها در غلظت‌های کم بین ۵۰ تا ۸۰۰ میکرومولار واجد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و موجب مهار روند پراکسیداسیون چربی در نمونه‌های اسپرم انسان گردیده و در غلظت‌های بیشتر (۱۰۰۰ میکرومولار به بالا) خاصیت پرواکسیدانی را از خود نشان می‌دهد [۱۷]. در سال ۲۰۰۴ نیز در آزمایشگاه ما به دنبال پژوهش بر روی سلول‌های آبشش کپور معمولی نشان داده شد که آلبومین در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ درصد و در حضور غلظت‌های زیاد از یون‌های فلزی، موجب گسترش هر چه بیشتر روند پراکسیداسیون چربی در محیط خواهد شد [۸]. اسکوربات نیز به عنوان یک عامل احیاء کننده، و در غلظت‌های زیاد، موجب رهاسازی یون‌های فلزی همانند آهن و مس از ساختار بیوشیمیایی غشاء سلول‌ها شده و بدین ترتیب با واردسازی این یون‌ها در مجموعه واکنش‌های موسوم به فنتون که طی آن آب اکسیژنه محیط به رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل تبدیل می‌گردد، موجبات گسترش پراکسیداسیون سلولی را فراهم خواهد نمود [۳۲]. در خصوص توجیه خاصیت پرواکسیدانی آلبومین در غلظت‌های زیاد می‌توان عنوان نمود که گروه تیولی موجود در ساختار آلبومین موجب اوتواکسیداسیون یون‌های فلزی شده و این روند در نهایت موجب عرضه یون‌های سوپراکسید به محیط شده، که خود عامل تشدیدکنندهٔ پراکسیداسیون سلولی خواهد بود [۳۳]. بنابراین، کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر استفاده از یک تیغ دو لبه بوده که در یک محدودهٔ بسیار ظریف از تغییرات غلظتی، ضمن تغییر ماهیت، تبدیل به مجموعه‌ای از عوامل خطرآفرین برای سلول‌ها خواهند شد.

میزان قدرت تحرک سلول‌های اسپرم به عنوان عاملی تعیین کننده و مهم در باروری مطرح بوده و تضمین کننده فرآیند لقاح است. در گزارش‌های زیادی عنوان شده که قدرت تحرک اسپرم‌ها در زمان افزایش رادیکال‌های آزاد و محصولات نهایی روند پراکسیداسیون چربی در محیط، به طور معنی‌دار دچار افت شده و علت اصلی آن ایجاد اختلال در فرآیندهای تبادل یونی غشاء و آنزیم‌های دخیل در اجرای آنان است [۶، ۳۴ و۳۵]. از سوی دیگر، رادیکال‌های آزاد به ویژه انواع اکسیژن فعال

Archive of SID

www.SID.ir

موجب مهار آنزیم‌های درون سلولی نیز گردیده و بدین ترتیب اسپرم‌ها از منابع آنزیمی دخیل در تأمین ATP مورد نیاز جهت تحرک محروم خواهند گردید [۲ و ۳۴]. در پژوهش حاضر نیز اضافه‌سازی جیوه به نمونه‌های اسپرم گاو موجب کاهش معنی‌دار قدرت تحرک اسپرم‌ها گردید. در مجموعه‌ای از پژوهش‌های گذشته نیز به اثبات رسیده که تیمار جیوه موجب کاهش قدرت تحرک و کاهش دریافت اکسیژن توسط سلول‌های اسپرم می‌شود [۲۲، ۳۶ و۳۷]. در این بخش از تحقیق حاضر نیز میان کنش آنتی‌اکسیدانی اسکوربات و آلبومین با تیمار جیوه مشابه با رفتار و عملکرد این دو آنتی‌اکسیدان در آزمایش سنجش پراکسیداسیون چربی بود. در این قسمت اسکوربات از غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار به بالا و آلبومین در غلظت بیشتر از ۰/۵ درصد نه تنها هیچ بهبودی را در میزان قدرت تحرک اسپرم‌های تیمار شده با جیوه باعث نگردیدند، بلکه موجب کاهش بیشتری در میزان قدرت تحرک اسپرم‌ها شده که این اثر منفی را می‌توان در ارتباط با پیدایش خاصیت پرواکسیدانی این دو ترکیب ارزیابی نمود که غشاء اسپرم‌ها را تحت تأثیر قرار داده است. در همین راستا نیز در گزارش دیگری عنوان شده که اسکوربات در نمونه‌های اسپرم انسان واجد تیمار آهن و در غلظت‌های ۴۰۰۰ –۱۰۰۰ میکرومولار، موجب افت شدیدی در قدرت تحرک اسپرم‌ها می‌شود [۱۷].

در ادامهٔ کار ضمن استفاده از روش رنگ‌آمیزی با ائوزین جهت تعیین درصد اسپرم‌های زنده محیط، مشخص گردید که اضافه‌سازی جیوه به نمونه‌های اسپرم گاو، به طور وابسته به زمان، موجب کاهش معنی‌دار در درصد اسپرم‌های زنده محیط می‌شود. در سال ۲۰۰۱ در دو پژوهش مجزا یکی بر روی سلول‌های اسپرم و دیگری برروی سلول‌های عصبی مشخص شد که تیمار جیوه موجب کاهش درصد سلول‌های زنده در محیط آزمایش می‌شود [۲ و ۳۸]. نتایج حاصله از کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در این بخش از تحقیق حاضر درست مشابه با عملکرد آنان در دو آزمایش قبل بوده، به طوری که کاربرد غلظت‌های زیاد از اسکوربات و آلبومین منجر به کاهش درصد سلول‌های اسپرم زنده گردیدند. بنابراین می‌توان عنوان داشت که پراکسیداسیون سلولی با تأثیر منفی بر ساختار بیوشیمیایی غشاءهای اسپرمی همانند ایجاد اختلال در عبور و مرور یون‌ها، نه تنها باعث غیرفعال شدن این سلول‌ها می‌گردد بلکه با گذشت زمان، موجبات مرگ این سلول‌ها را نیز فراهم خواهد آورد.

گلوتاتیون احیاء شده به عنوان یک تری پپتید فعال در انواع سلول‌ها (با حداکثر غلظت ۱۰ میلی‌مولار) واجد گروه تیول در ساختار خود بوده که با رادیکال‌های آزاد محیط واکنش خنثی کننده می‌دهد [۳۹]. در صورت بروز هرگونه اختلال در تولید و ذخیره گلوتاتیون احیاء شده، شاهد گسترش هر چه بیشتر روند پراکسیداسیون سلولی خواهیم بود [۳۹ و۴۰]. نتایج آزمایش‌های ما نشان می‌دهد که تیمار جیوه موجب کاهش قابل ملاحظه و معنی‌دار میزان گلوتاتیون احیاء شده نمونه‌های اسپرم گاو می‌گردد. در سال ۲۰۰۱ نیز مشخص گردید که گلوتاتیون احیاء شده توسط میان کنش مستقیم با عناصر فلزی سمی همانند جیوه (اتصال یک یون جیوه به روش کوئووالانسی با دو مولکول از گلوتاتیون احیاء شده)، موجب خنثی‌سازی و سپس دورسازی آنان از اطراف سلول‌ها شده و بدین ترتیب ضمن کاهش غلظت گلوتاتیون احیاء شده سلول، از سمیت جیوه در درون سلول‌ها نیز کاسته می‌شود [۴۱]. از سوی دیگر، با توجه به القاء پراکسیداسیون چربی توسط جیوه که به طور یقین از مسیر تولید اکسیژن فعال عبور نموده، کاهش میزان گلوتاتیون احیاء شده محیط در ارتباط با اثر قوی آنتی‌اکسیدانی آن بوده که ضمن خنثی‌سازی اکسیژن فعال محیط، به

Archive of SID

www.SID.ir

گلوتاتیون اکسید شده[1] تبدیل می‌شود. نتایج سایر پژوهش‌ها نیز حاکی از کاهش میزان گلوتاتیون احیاء شده در تیمارهای مختلف با جیوه است [۲۴، ۳۸ و ۴۲]. در این قسمت از پژوهش نیز الگوی آنتی‌اکسیدانی اسکوربات و آلبومین در غلظت‌های کم، مشابه با آزمایش‌های قبلی بوده بدین صورت که این مواد موجب افزایش ذخیره گلوتاتیون احیاء شده سلول‌ها شده که تنها تفسیر این پدیده مواجهه این آنتی‌اکسیدان‌ها (در غلظت‌های کم) با شرایط پراکسیداسیون سلولی و دورسازی رادیکال‌های آزاد از محل‌های استقرار واحدهای گلوتاتیون احیاء شده در سلول است. از سوی دیگر، به دلیل خاصیت پرواکسیدانی که این آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت‌های زیاد (اسکوربات از غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار به بالا و آلبومین در غلظت بیشتر از ۰/۵ درصد) کسب می‌کنند، موجب کاهش میزان ذخیره گلوتاتیون احیاء شده سلول گردیدند. نکته قابل توجه در این قسمت از پژوهش آن بود که طی ساعت دوم از انکوباسیون میزان گلوتاتیون احیاء شده محیط به جای کاهش (نسبت به تیمار مربوطه جیوه)، دچار افزایش ($p<0/001$) شد که جهت توجیه آن می‌توان فرضیه آزاد شدن واحدهای کمکی گلوتاتیون احیاء شده از ذخایر درون سلولی (در میتوکندری‌ها) را به هنگام رویارویی با شرایط اکسیداسیون سلولی، عنوان نمود [۴۳].

خلاصه آن که، جیوه به عنوان یک آلایندهٔ محیطی، پس از ورود به بدن جانوران قادر به ایجاد تغییرات پایدار بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلف در سلول‌های حساسی همانند اسپرم‌ها بوده و بدین ترتیب موجب کاهش قدرت تولیدمثل در جانوران و یا در نهایت ناباروری در آنان خواهد شد. در راستای استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها نیز به پژوهشگران علوم زیستی توصیه می‌گردد که در کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها بسیار محتاط عمل نموده و محدوده‌های ظریف غلظتی هر آنتی‌اکسیدان را به طور جدی مد نظر قرار داده تا این که پژوهش‌های آنان در برگیرنده حداقل آسیب‌های سلولی باشد.

1- GSSG

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مساعدت جناب آقای دکتر بهزاد شارقی رئیس محترم دانشکدهٔ علوم، و همکاری فراوان سرکار خانم دکتر نها افتخاری و جناب آقای مهندس سید رسول صیدایی، در دانشگاه شهرکرد، تشکر و قدردانی می‌گردد.

مراجع

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

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

[3] Anand, R.J.K, Arabi, M., Rana, K.S. and Kanwar, U., Role of vitamin C and E with GSH in checking the peroxidative damage to human ejaculated spermatozoa. Int. J. Urol. suppl. 7 (2000) 53.

[4] Arabi, M., Anand, R.J.K. and Kanwar, U., 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, (2001) 365-369.

Archive of SID

www.SID.ir

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

[6] Arabi, M., Sanyal, S.N., Kanwar, U. and Anand, R.J.K., 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, (2003) 250-267.

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

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

[9] Aitken, R.J., Free radicals, lipid peroxidation and sperm function .Reprod. Fertil. Dev. 7 (1995) 65-70.

[10]Donnelly, E.T., McClure, N. and Lewis, S.E.M., Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. Fertil. Steril. 72, 3 (1999) 484-495.

[11]Jacob ,R.A., Pianalto, F.S. and Agee, R.E., Cellular ascorbate depletion in healthy men J. Nutr. 122 (1992) 1111-1118.

[12]Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Free radical in biology and medicine, z2nd edition, Clarendon Press,Oxford, (1989) 372-390.

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

[14]World health organization (WHO). Mercury-Environmental aspects. Environmental health criteria 86, WHO Publications, Geneva, Swiss, (1989).

[15]Porcella, D.B., Mercury pollution, integration and synthesis, (eds.: Watras, C.J., Huckabee, J.W.) Boca Raton, Lewis Publishers, Florida, USA, (1994) 3-19.

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

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

[18]Blom, E., A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin . Fertil. Steril. 1 (1950) 176-177.

[19]Sedlak, J. and Lindsay, R.H., Estimation of total, protein-bound and non- protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem. 25 (1968) 192-205.

[20]Crinnion, W.J., Environmental medicine, part three, Long-term effects of chronic low dose mercury exposure . Altern. Rev. Med. 5 (2000) 209-223.

Archive of SID

www.SID.ir

[21]Schurz, F., Sabater-Vilar, M. and Fink-Gremmels, J., Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role metal-binding proteins. Mutagenesis 15, 6 (2000) 525-530.

[22]Rao, M.V. and Sharma, P.S., Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. Reprod. Toxicol. 15 (2001) 705-712.

[23]Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M. and Sato, M, Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. Toxicology 184 (2003) 1-9.

[24]Sener, G., Sehirli, A.O. and Ayanoglu-Dulger, G., Melatonin protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. Pharmacol. Toxicol. 93 (2003) 290-296.

[25]Shinada, M., Takizawa, Y. and Muto, H., Effect of mercuric chloride on phospholipid peroxidation in rat . Nippon. Koshu. Eisei. Zasshi. 37, 12 (1990) 1010-1014.

[26]Delnomdedieu, M. and Allis, J.W., Interaction of inorganic mercury salts with model and red cell membrane: importance of lipid-binding sites. Chem. Biol. Interact. 88 (1993) 71-87.

[27]Marchi, B., Burlando, B., Moore, M.N. and Viarengo, A., Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on $[Ca2+]_i$ dependent phospholipase A2 activation. Aquat. Toxicol. 66 (2004) 197-204.

[28]Lund, B.A, Miler, D.M. and Woods, J.S., Mercury-induced H2O2 formation and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria .Biochem. Pharmacol. 42 (1991) s181-s187.

[29]Nath, K.A., Croatt, A.J., Likely, S., Behrens, T.W. and Warden, D., Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. Kidney Int. 50 (1996) 1032-1043.

[30]Ariza, M.E., Bijur, G.N. and Williams, M.V., Lead and mercury metagenesis: Role of H2O2, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. Environ. Mol. Mutagen 31 (1998) 352-361.

[31]Halliwel, B., and Gutteridge, J.M.C., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219 (1984) 1-14.

[32]Gutteridge, J.M.C., Antioxidants, nutritional supplements and life-threatening diseases. Br. J. Biomed. Sci. 51 (1994) 288-295.

[33]Tien, M., Bucher, J.R. and Aust, S.D., Thiol-dependent lipid peroxidation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1 (1982) 279-285.

[34]Engel, S., Schreiner ,T. and Petzoldt, R., Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. Andrologia 31 (1999) 17-22.

[35]Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A, Role of reative oxygen species in the

Archive of SID

www.SID.ir

pathophysiology of human reproduction. Fertil. Steril. 79 (2003) 829-843.

[36]Alabi, N.S., Whanger, P.D. and Wu, A.S., Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility in vitro. Biol. Reprod. 33 (1985) 911-919.

[37]Ernst, E. and Lauristen, J.G., Effect of organic and inorganic mercury on human sperm motility. Pharmacol. Toxicol. 68 (1991) 440-444.

[38]Lee, Y.W., Ha, M.S. and Kim, Y.K., Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells . Neurochem. Res. 26 (2001) 1187-1193.

[39]Meister, A. and Anderson, M.E., Glutathione. Ann. Rev. Biochem. 52 (1983) 711-760.

[40]Sarafian, T.A., Methylmercury induced generation of free radicals:biological implications. Met. Ions. Biol. Syst. 36 (1999) 415-444.

[41]Hultberg, B., Anderson, A. and Isaksson, A., Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol.Toxicology 156 (2001) 93-100.

[42]Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dorr, A.J. and Mantilacci, L., Antioxidant responses and bioaccumulation in Ictalurus melas under mercury exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55 (2003) 162-167.

[43]Britten, R.A., Green, J.A. and Winenius, H.M., The relationship between nuclear glutathione levels and resistance to mephlalan in human ovarian tumor cells. Biochem. Pharmacol. 41 (1991) 647-649.

Archive of SID

www.SID.ir