

اثر کور کومین بر تمامیت غشا و شاخص‌های استرس اکسیداتیو بیضه و سرم موش‌های تیمار شده

با کادمیوم کلراید

شیمایا چهرئی^۱ Ph.D.، حمیدرضا مومنی^۲ Ph.D.، زهرا اتابکی^۲ M.Sc.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی اراک، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Sh-chehrei@iau-arak.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۶

چکیده

هدف: پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تاثیر کور کومین بر تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم و بیضه موش‌های نر تیمار شده با کادمیوم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ موش نر بالغ نژاد NMRI به چهار گروه دسته‌بندی شدند: ۱- کنترل، ۲- کادمیوم کلراید (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ۳- کور کومین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ۴- کور کومین + کادمیوم کلراید. تیمارها به صورت تک‌دوز انجام شد و پس از ۲۴ ساعت اسپرم‌های اپی‌دیدیمی گروه‌های مختلف جهت بررسی تمامیت غشا مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این میزان مالون دی‌آلئوئید (MDA) و همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه شده با تست توکی انجام و تفاوت میانگین‌ها در حد معنی‌دار ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج: در این پژوهش کادمیوم کلراید باعث کاهش معنی‌دار تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. علاوه بر این کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار MDA سرم و بیضه و کاهش معنی‌دار قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه نسبت به گروه کنترل شد. در گروه کور کومین + کادمیوم کلراید، کور کومین توانست به طور معنی‌داری اثرات مخرب کادمیوم را بر روی این پارامترها در مقایسه با گروه کادمیوم جبران کند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که کور کومین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قادر است اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر روی تمامیت غشا اسپرم، پراکسیداسیون لیپید و قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: تمامیت غشا اسپرم، قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل، کادمیوم، کور کومین، مالون دی‌آلدئید

مقدمه

امروزه آلاینده‌های زیست‌محیطی، ضمن آلوده‌سازی محیط‌زیست وارد چرخه غذایی شده، آب‌ها را آلوده نموده و به‌طور مستقیم سلامت انسان‌ها را مورد تهدید قرار داده‌اند و ضمن شیوع بیماری‌های مختلف، موجب سرطان و حتی منجر به مرگ شده‌اند (۱). در عین حال در اکثر مناطق پر جمعیت، خصوصاً کشورهای صنعتی، منشأ اصلی آلاینده‌ها فعالیت‌های انسانی می‌باشد. این فعالیت‌ها رابطه نزدیکی با الگوهای مناسب زندگی داشته و محدود کردن آن‌ها تا حدی موجب تنزل کیفیت زندگی می‌شود. از جمله این آلاینده‌ها کادمیوم می‌باشد. از منابع طبیعی حاوی کادمیوم می‌توان به فعالیت‌های آتشفشانی، آتش‌سوزی در جنگل و انتقال ذرات خاک حاوی کادمیوم توسط باد اشاره کرد. همه این عوامل باعث افزایش میزان کادمیوم در چرخه اکولوژیکی می‌شوند (۲). تماس انسان با این آلاینده از راه‌های مختلف صورت می‌گیرد. از مهم‌ترین آن‌ها مواد غذایی مانند برنج، گندم و آب آشامیدنی است. بعضی ماهی‌ها مانند ماهی تن و صدف خوراکی می‌توانند مقادیر زیادی کادمیوم در خود ذخیره کنند (۳). از دیگر منابع حاوی کادمیوم کودهای فسفاته می‌باشد (۱). سیگار هم‌چنین یکی دیگر از منابع حاوی کادمیوم است (۴). بنابراین کادمیوم از جمله آلاینده‌های زیست‌محیطی است که در بافت‌های مختلف بدن انسان تجمع یافته و موجب بروز اختلال در سیستم‌های مختلف از جمله بینایی، کبد، ریه، سیستم عصبی مرکزی، سیستم کلیوی و ... می‌شود (۵، ۶، ۷، ۸). مشخص شده است که کادمیوم قادر است اثرات مخربی بر دستگاه تولید مثل ایجاد کند و منجر به ناباروری شود. از جمله کادمیوم سبب کاهش سطح تستوسترون، کاهش تعداد اسپرم و قابلیت تحرک اسپرم، کاهش وزن بیضه و اپی‌دیدیم و افزایش اسپرم‌های مرده و ناهنجار می‌شود (۹). کادمیوم از طریق آسیب میتوکندریایی موجب افزایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (Reactive oxygen species (ROS) و در نتیجه عدم توازن بین رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی طبیعی شده و باعث تولید استرس اکسیداتیو می‌شود. تجمع ROS با کاهش تعداد اسپرم و کاهش تحرک اسپرم ارتباط مستقیم دارد (۱۰). کادمیوم از طریق کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون

پراکسیداز و افزایش پراکسیداسیون لیپید، کربوکسیلاسیون پروتئین منجر به القای استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۱، ۱۲) و از این طریق سبب تغییر در بافت بیضه می‌گردد (۱۳، ۱۴، ۱۵). تمامیت غشا پلاسمایی و صلاحیت عملکردی آن برای متابولیسم اسپرم، ظرفیت یابی، اتصال به تخمک، واکنش آکروزومی و در نهایت نفوذ به تخمک ضروری است. از این‌رو ارزیابی غشای پلاسمایی می‌تواند برای پیش‌بینی توانایی باروری اسپرم مفید باشد (۱۶). با توجه به اینکه کادمیوم اثرات خود را از طریق القای استرس اکسیداتیو اعمال می‌کند، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌خصوص نوع گیاهی آن می‌تواند راهکار مناسبی برای جبران اثرات سمی کادمیوم باشد. کورکومین ترکیب اصلی و فعال زردچوبه (۱۷) رنگدانه فنولیک زرد رنگی است که طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی و فارماکولوژیک دارد (۱۸، ۱۹). مهم‌ترین اثرات بیولوژیک آن اثرات ضد التهابی و ضد-توموری و آنتی‌اکسیدانتی است (۲۰، ۲۱، ۲۲). مطالعات زیادی در رابطه با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی کورکومین و نقش آن در حفاظت از سیستم تولید مثلی در برابر آلاینده‌های محیطی انجام شده است (۲۳، ۲۴، ۲۵). بنابراین کورکومین ممکن است یک آنتی‌اکسیدانت قوی جهت جلوگیری از ناهنجاری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو کادمیوم کلراید و رادیکال‌های آزاد شده در بیضه و سرم باشد. به‌همین دلیل این پژوهش با هدف بررسی اثر کورکومین بر ارزیابی تمامیت غشا پلاسمایی اسپرم و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سرم و بافت بیضه در موش‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید انجام شده است.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی و تیمار حیوانات: در این مطالعه تجربی از ۲۴ رأس موش نر بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی 32 ± 5 گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند و در خانه حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری می‌شدند، استفاده شد. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. موش‌ها به ۴ گروه (n=6) در هر گروه) کنترل، کادمیوم کلراید (۵ میلی‌گرم بر

رنگ شدند ولی هسته اسپرم‌های زنده توسط هوشست آبی شدند (۲۹).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید سرم: ابتدا یک محلول تیو باربیتوریک اسید (TBA, 375 w/7,E.Merk) تهیه شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم با ۶۰۰ میکرولیتر از محلول TBA مخلوط شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری جوش ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از بن‌ماری، به سرعت با استفاده از آب سرد خنک شده تا واکنش تشکیل رنگ تثبیت گردد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور 1000 rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی به دقت جدا شد و جذب نوری آن در ۵۳۵ نانومتر Blank که حاوی تمام ترکیبات به جز نمونه بود به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر pg T8ouvis Spectrometer (Instruments Ltd) خوانده شد. غلظت مالون دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی آن که عبارت است از: $1/56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ CM}^{-1}$ محاسبه گردید و بر حسب nmol/ml بیان شد (۲۷).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید بافت بیضه: نمونه بافتی (۰/۱ گرم) در محلول KCl به نسبت ۱ به ۹ هموزنیزه شد. یک حجم از نمونه هموزنیزه شده با دو حجم از محلول تیوباربیتوریک اسید ترکیب شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و بعد از خنک شدن (به منظور تثبیت تشکیل رنگ) با دور 1000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لایه فوقانی شفاف به آرامی برداشته شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی $1/56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ CM}^{-1}$ بر حسب مولار محاسبه و MDA بر حسب nmol/gr بافت بیان شد (۳۰).

اندازه‌گیری میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بافت بیضه به روش احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی FRAP: این روش بر اساس توانایی سرم یا عصاره بافتی در احیای یون‌های Fe^{3+} (فریک) به Fe^{2+} (فرو) در حضور ماده‌ای به نام TPTZ استوار است. اندازه‌گیری FRAP به عنوان یک تست مستقیم برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل در نظر گرفته می‌شود به همین منظور منحنی استاندارد سولفات آهن رسم شد و سپس فرمول

کیلوگرم، شرکت سیگما آمریکا) کورکومین (۱۰۰ میلی-گرم برکیلوگرم، شرکت سیگما آمریکا) و کورکومین+ کادمیوم کلراید تقسیم شدند. تیمار موش‌ها با کورکومین به روش تزریق داخل صفاقی و کادمیوم کلراید به روش تزریق زیرجلدی و هر کدام به صورت تک‌دوز صورت گرفت (۱۵). کورکومین ۲۴ ساعت قبل از تجویز کادمیوم کلراید به موش‌ها تزریق شد. از آب مقطر به عنوان حلال کادمیوم و از دی‌متیل سولفوکسید Dimethyl Sulfoxide = DMSO به عنوان حلال کورکومین استفاده شد. از آنجا که تفاوت معناداری بین نتایج گروه‌های کنترل مشاهده نشد، داده‌های گروه آب مقطر به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از تیمار با کادمیوم کلراید، حیوانات توسط اتر کاملاً بی‌هوش شدند. بلافاصله خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام و از نمونه‌های خونی سرم تهیه شد. سرم‌ها در ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. هم‌چنین طی جراحی، بیضه چپ جهت اندازه‌گیری شاخص‌های پراکسیداسیون لیپید از بدن خارج شد.

به منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی و هم‌چنین قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل در سرم و بافت بیضه به ترتیب از سنجش مالون دی‌آلدئید و قدرت آنتی‌اکسیدانی/ احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی FRAP استفاده شد (۲۸، ۲۶، ۲۷).

ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی هم‌زمان هوشست ۳۳۳۴۲ و پروپیدیوم آیویداید: به هر یک از سوسپانسیون اسپرم گروه‌های چهارگانه، ۲/۵ میکرولیتر محلول رنگ هوشست (سیگما) اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از محلول رنگ پروپیدیوم آیویداید (سیگما) به سوسپانسیون اسپرم اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی لام گرم منتقل و لام توسط لامل پوشانده شد و توسط میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, DP71, Japan) مجهز به دوربین با فیلتر مناسب و بزرگنمایی $\times 1000$ به همراه روغن ایمرسیون، در ۵ میدان دید مختلف حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. هسته اسپرم‌های مرده توسط رنگ پرپیدیوم آیویداید قرمز

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی (Turkey's Test) استفاده شد. $p < 0.05$ به عنوان مرز معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

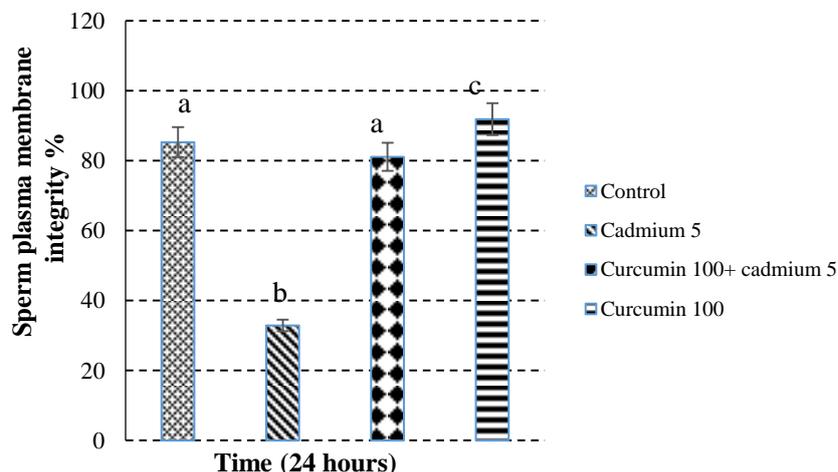
درصد تمامیت غشا پلاسمایی اسپرم در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (5 mg/kg به مدت 24 ساعت) نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) کاهش یافت. کاربرد مشترک کورکومین (100 mg/kg) و کادمیوم-کلراید (5 mg/kg) توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) تا حد گروه کنترل جبران کند. کاربرد کورکومین به مدت 24 ساعت موجب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) درصد تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کنترل شد (نمودار 1) (شکل 1).

رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد به دست آمد که برای سنجش FRAP سرم و بافت بیضه گروه‌های مختلف استفاده شد.

FRAP سرم: بعد از تهیه معرف FRAP، 100 میکرولیتر سرم به علاوه 100 میکرولیتر محلول استاندارد سولفات آهن در کووت‌ها ریخته سپس مقدار 1800 میکرولیتر از معرف FRAP به کووت‌ها اضافه و پس از 4 دقیقه جذب آن‌ها در طول موج 593 نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد و سپس با استفاده از معادله رگرسیون حاصل در منحنی استاندارد میزان FRAP سرم محاسبه و بر حسب nmol/l بیان شد.

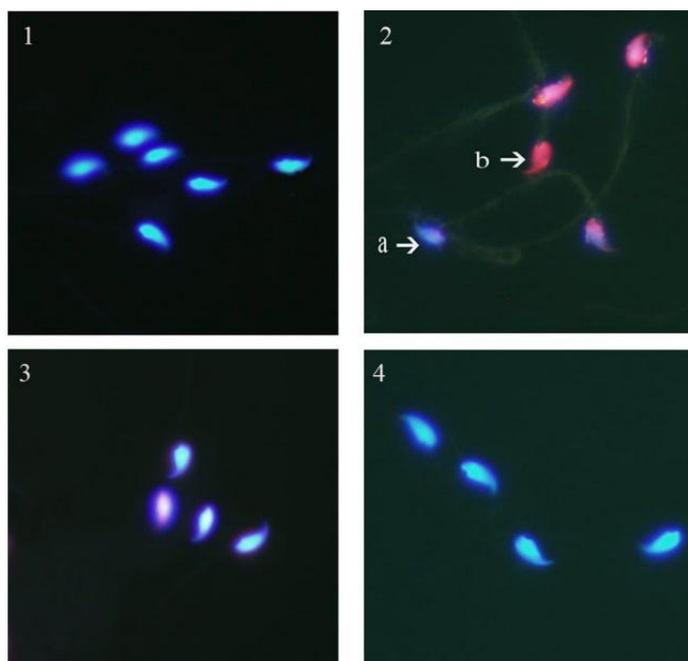
FRAP بافت: 100 میکرولیتر از عصاره بافتی در کووت ریخته و سپس مقدار 3 ml از معرف آماده FRAP به کووت‌ها اضافه و پس از 4 دقیقه جذب آن‌ها در طول موج 593 نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد سپس با استفاده از معادله رگرسیون حاصل در منحنی استاندارد میزان FRAP نمونه‌های بافتی بر حسب nmol/gr به دست آمد.

آنالیز آماری



نمودار 1: ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم موش در گروه تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم آبوداید.

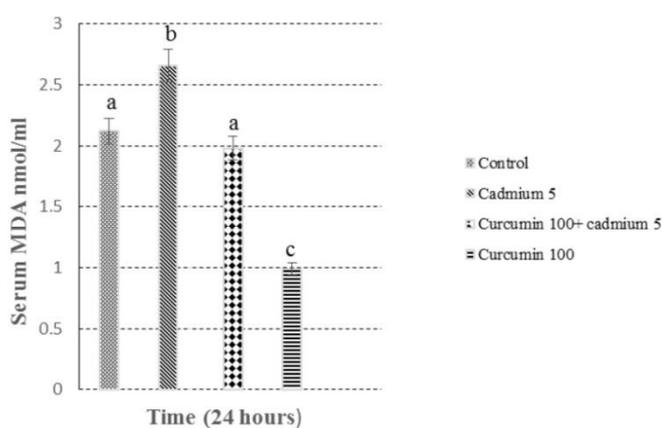
گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید: 5 mg/kg، کورکومین: 100 mg/kg، مدت تیمار: 24 ساعت. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، $n=6$ برای هر گروه $p < 0.05$). مقادیر تیمارها به صورت mg/kg می‌باشند.



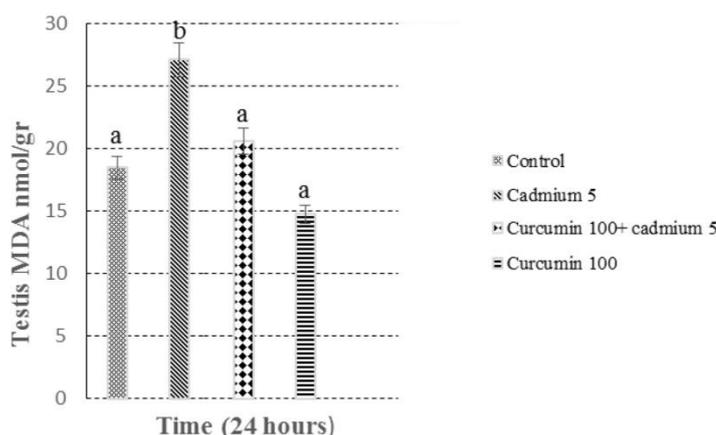
شکل ۱: ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط رنگ آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید. ۱) اسپرم‌های گروه کنترل (۲) اسپرم‌های گروه کادمیوم کلراید (۵ mg/kg) (۳) اسپرم‌های گروه کورکومین (۱۰۰ mg/kg) + کادمیوم کلراید (۵ mg/kg) (۴) اسپرم‌های گروه کورکومین (۱۰۰ mg/kg). a- اسپرم زنده با غشای پلاسمایی سالم، فقط رنگ هوخست را جذب کرده و هسته آبی شده b- اسپرم مرده با غشای پلاسمایی آسیب دیده، علاوه بر هوخست رنگ پروپیدیوم آیوداید را نیز جذب کرده، در نتیجه هسته قرمز شده است. بزرگنمایی $\times 1000$

به‌طور معنی داری ($p < 0.001$) افزایش یافت (نمودار ۳ و ۲).

میزان MDA سرم و بافت بیضه در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید با غلظت ۵ mg/kg نسبت به گروه کنترل



نمودار ۲: ارزیابی پراکسیداسیون لیپید سرم موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط سنجش مالون دی آلدئید (MDA). گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید ۵ mg/kg، کورکومین: ۱۰۰ mg/kg، کاربرد مشترک کورکومین ۱۰۰ mg/kg + کادمیوم کلراید ۵ mg/kg. مدت تیمار ۲۴ ساعت. مقادیر به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، $n = 6$ برای هر گروه ($p < 0.05$). مقادیر تیمارها به‌صورت mg/kg می‌باشند.



نمودار ۳: ارزیابی پراکسیداسیون لیپید بافت بیضه موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید توسط سنجش مالون دی آلدئید (MDA).

گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید ۵ mg/kg، کورکومین ۱۰۰ mg/kg، کاربرد مشترک کادمیوم کلراید ۵ mg/kg + کورکومین ۱۰۰ mg/kg - مدت تیمار ۲۴ ساعت. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، $n = 6$ برای هر گروه $p < 0.05$) مقادیر تیمارها به صورت mg/kg می‌باشند.

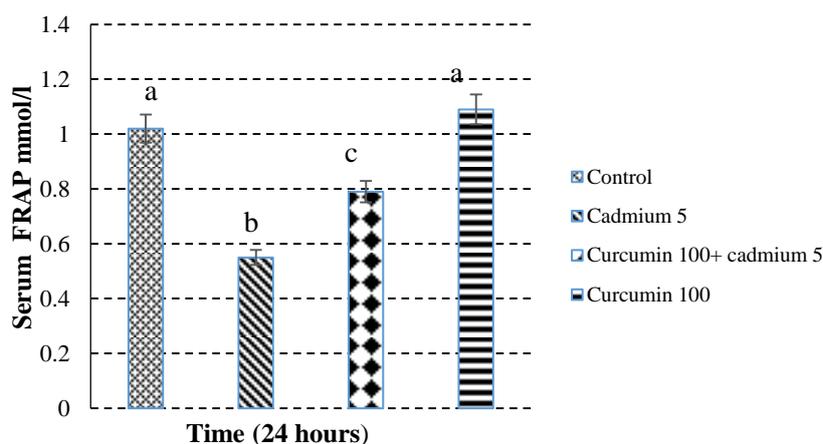
گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۵ mg/kg) به مدت ۲۴ ساعت) نسبت به گروه کنترل، به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) کاهش یافت. کاربرد مشترک کورکومین (۱۰۰ mg/kg) + کادمیوم کلراید (۵ mg/kg) به طور معنی‌داری توانست میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم ($p < 0.05$) و کل بیضه ($p < 0.001$) را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید به طور معنی‌داری تا حد گروه کنترل جبران کند.

کاربرد کورکومین به تنهایی به مدت ۲۴ ساعت موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و بیضه نسبت به گروه کنترل گردید. اما تفاوت معنی‌دار نبود (نمودار ۴ و ۵).

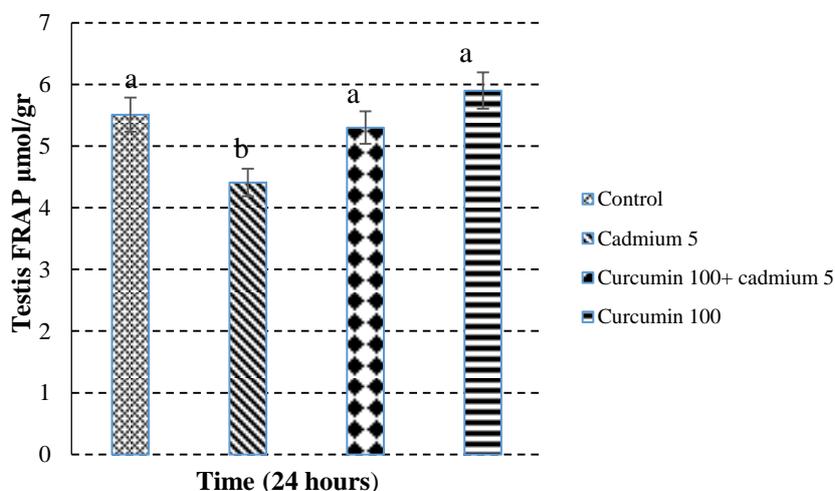
کاربرد مشترک کورکومین (۱۰۰ mg/kg) و کادمیوم (۵ mg/kg) به طور معنی‌داری میزان MDA سرم ($p < 0.001$) بیضه ($p < 0.01$) را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید تقریباً تا حد گروه کنترل جبران کرد (نمودار ۳ و ۲).

همان‌طور که در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است در گروه تیمار شده با کورکومین (۱۰۰ mg/kg) به تنهایی به مدت ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) در میزان MDA سرم نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (نمودار ۲) و همچنین موجب کاهش میزان MDA بیضه نسبت به گروه کنترل گردید اما تفاوت معنی‌دار نبود (نمودار ۳).

میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم و کل بیضه در



نمودار ۴: ارزیابی میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل سرم موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید به روش FRAP. گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید: ۵mg/kg، کورکومین: ۱۰۰mg/kg، مدت تیمار: ۲۴ ساعت. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، $n=6$ برای هر گروه $P<0/05$). مقادیر تیمارها به صورت mg/kg می‌باشند.



نمودار ۵: ارزیابی میزان قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل بیضه موش در گروه‌های تیمار شده با کورکومین و کادمیوم کلراید به روش FRAP. گروه‌های تیمار شامل: کادمیوم کلراید ۵mg/kg، کورکومین: ۱۰۰mg/kg، مدت تیمار: ۲۴ ساعت. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، $n=6$ برای هر گروه $P<0/05$). مقادیر تیمارها به صورت mg/kg می‌باشند.

تست‌های ارزیابی غشای پلاسمایی اسپرم متعددند که اخیراً استفاده از رنگ‌های حیاتی فلورسنت توسعه یافته است از جمله استفاده همزمان از پروپیدیوم آیواید و هوخست ۳۳۳۴۵. پروپیدیوم آیواید یک رنگ فلورسنت

بحث

تمامیت غشا پلاسمایی و صلاحیت عملکردی آن برای پیش‌بینی توانایی باروری اسپرم مفید است (۱۸).

واکنش با گروه تیول گلوکوتاتیون مدافع داخل سلولی بزرگ باعث استرس اکسیداتیو شود (۳۹). کادمیوم باعث از بین رفتن توانایی غشای پلاسمایی می‌شود (۱۱). همچنین اسپرم به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع فراوان در سطح غشای پلاسمایی و به دلیل کمبود آنزیم‌های محافظتی در سیتوپلاسم، در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد (۴۰).

استرس اکسیداتیو باعث آسیب غشای پلاسمایی شده و احتمالاً در فعالیت اسپرم تاثیرگذار است (۴۱) و کادمیوم با القای استرس اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپید غشا می‌شود (۴۲).

نتایج به دست آمده از آزمایش‌های MDA و FRAP نشان داد که کادمیوم کلراید موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید و کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل می‌شود.

Abarikwu و همکاران (۴۳) نشان دادند که در رت‌های نر نژاد ویستار تحت تأثیر کورکومین با دوز ۱۰۰ mg/kg برای چهار هفته، کورکومین تولید اسپرم، تعداد اسپرم، سطح تستوسترون پلاسمای، سطح گلوکوتاتیون و فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپرا اکسید دیسموتاز در بیضه رت را افزایش می‌دهد. همچنین کورکومین با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی روی بیان سیتوکین‌های التهابی اثر می‌گذارد.

همچنین ما در این پژوهش نشان دادیم که کورکومین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی می‌تواند کاهش تمامیت غشا پلاسمایی را در گروه تیمار شده با کورکومین + کادمیوم کلراید به طور معنی‌داری جبران کند. علاوه بر این کاربرد کورکومین به تنهایی موجب افزایش تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کنترل شد.

کورکومین با جلوگیری از تخلیه گلوکوتاتیون سلولی و حتی افزایش میزان آن و افزایش آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی درونی (۱۱) از جمله افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مانع پراکسیداسیون لیپیدی شده و از تولید ROS جلوگیری می‌کند (۳۳).

بنابراین کورکومین می‌تواند از تغییرات اکسیداتیو غشای اسپرم به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانتی ذاتی خود جلوگیری کند (۳۹). اثرات حفاظت سلولی کورکومین وابسته به خواص آنتی‌اکسیدانتی و حذف رادیکال‌های آزاد آن می‌باشد که سبب جلوگیری از هرگونه ناهنجاری در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت نرمال غشا

قرمز مخصوص DNA است که قادر به نفوذ در غشای پلاسمایی سالم نیست و تنها از طریق غشای پلاسمایی آسیب‌دیده به اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، از این رو می‌تواند به صورت هم‌زمان با رنگ‌های فلورسنت قابل نفوذ به غشای پلاسمایی سالم از جمله رنگ فلورسنت هوخست که معرف اسپرم‌های زنده هستند برای تمایز هم‌زمان اسپرم‌های زنده از مرده استفاده شود.

نتایج نشان داد که درصد تمامیت غشا پلاسمایی اسپرم در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های تیمار شده با کادمیوم با دوز ۵ mg/kg به مدت ۳۵، ۲۵ و ۱۵ روز صورت گرفت، مشخص شد که افزایش پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم القا شده به وسیله کادمیوم باعث افزایش ناهنجاری‌های اسپرم‌ها و تغییر ویژگی‌های طبیعی غشا و همچنین از دست رفتن باروری بالقوه اسپرم‌ها می‌شود (۳۱).

کادمیوم کلراید با القای استرس اکسیداتیو (۱۱) ممکن است سبب پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب به تمامیت غشا شود. اگرچه غلظت فیزیولوژیکی ROS برای بلوغ اسپرم، ظرفیت‌یابی و نفوذ به تخمک ضروری است (۳۲). اما غلظت بالای آن با توجه به حساسیت اسپرم سبب پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۳۳). میزان آسیب‌پذیری با ROS تحت تاثیر سیستم حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد و میزان مواد قابل پراکسیداسیون مثل اسیدهای چرب غیراشباع و غلظت اسید چرب قرار دارد (۳۴، ۳۵). کادمیوم با تولید نیتریک اکساید و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) از قبیل رادیکال‌های هیدروکسیل، رادیکال‌های آنیون سوپرا اکسید و هیدروژن پراکسید در نهایت باعث افزایش سطح پراکسیداسیون لیپید (MDA) در بیضه می‌شود. کادمیوم همچنین اثرات شدیدی بر روی فعالیت آنزیم‌ها دارد و موجب ایجاد اختلال در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌شود (۳۶).

از طرفی اسپرم بالغ دارای سیستم آنتی‌اکسیدانتی ضعیفی است که احتمالاً به علت محدود بودن سیتوپلاسم آن است و از طرف دیگر اسیدهای چرب غیر اشباع ۴۵ درصد کل اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهد (۳۷). یکی از اسیدهای چرب غیر اشباع عمده decosahexanoic acid است که سوبسترای اصلی برای پراکسیداسیون لیپیدی است (۳۸). سمیت کادمیوم می‌تواند به وسیله

and applied pharmacology. 2009; 238: 258-265.

5. Gonic KH. C. Nephrotoxicity of cadmium and Lead. J Med Res. 2008; 128: 335-352.

6. Paniague-Costro M, Escalona-cafdoso C, Mmadrigal-Bujaide E, Martinez – Galaero E, et al. protection against cadmium-induced Teratogenicity in vitro by glycine. Toxicol in Vitro. 2008; 22(5): 75-79.

7. Gulisano M, Pacini S, Punzi T, Morocci G, et al. Cadmium modulates proliferation and differentiation of human Neuroblast. J of neuroscience research. 2009; 87: 228-237.

8. Godt J, scheidig F, Grosse-fiestrup C, Esche v, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J occp med Toxicol. 2006; 1: 22.

9. Momeni HR, Chehrei Sh, Atabaki Z, Eskandari N. Study of the effect of curcumin on sperm parameters dysfunction induced by cadmium in mice. Pajouhandeh. 2015; 20(2); 54-62.

10. Arabi M. Cadmium as an etiology of sperm dysfunction in Holstein bulls. Iranian journal of reterinary research. 2006; 7(3): 29-36.

11. Ognjanovic BI, markovic SD, Ethordevic NZ, Trbojevic Is, et al. Cadmium induced Lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q (10) and vitamin E. Reprod Toxicol. 2010; 29: 191-7.

12. Cristiano C, Spizzi, Vanusa Manfredini, Fabiana E, Barcellos da silva, Erico M.M, et al. Soares, Francielli W. Santos . y-oryzanol Protects Against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes. Food and chemical Toxicology. 2013; 55: 526-532.

13. Ong C.N, Shen H.M. Chia SE. Biomarkers for male productive health hazards: are they available. toxicol let. 2002; 134(1-3): 17-30.

14. Prasenjit Manna, Mahua Sinha, paramesc, sil.Ccadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. Reproductive toxicology. 2008; 26(3-4): 282-291.

می‌شود و بنابراین توانایی باروری حفظ می‌شود. نتایج MDA و FRAP اثر آنتی اکسیدانته کورکومین را تایید کرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش به کارگیری کادمیوم کلراید موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید و همچنین کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانته کل در سرم و بافت بیضه موش‌ها شد و کورکومین در گروه کورکومین+کادمیوم کلراید باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید و همچنین افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانته کل سرم و بافت بیضه نسبت به گروه کادمیوم کلراید شد. کادمیوم کلراید تمامیت غشا اسپرم موش را کاهش داد و کورکومین در گروه کورکومین+کادمیوم کلراید باعث جبران پارامتر مذکور گردید.

به نظر می‌رسد که کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانته قادر است اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر اکسیداسیون لیپید و قدرت آنتی‌اکسیدانته کل سرم و بیضه و تمامیت غشا اسپرم مهار نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اراک موضوع قرارداد شماره ۹۳/۲۸۰۵ مورخ ۱۳۹۳/۰۴/۰۲ انجام شده است که بدین‌وسیله از مسئولین مربوطه تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Bernard A. Cadmium and its adverse effects on human health. Indian J med res. 2008; 128: 557-64.
2. wiasberg M, joseph p, Hale B, Beyersmann D. Molecular and Cellular of Cadmium carcinogenesis. Toxicology. 2003; 192(2-3): 117-95.
3. Eck P.C, Wilson L. Cadmium toxicology. Alice-Phonix Arizona 85021 Usa, 2005.
4. Bhattacharyya mlt. cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanism and relationship to human exposures. Toxicology

- rats. Food and chemical toxicology. 2012; 50: 3243-3250.
16. Brito L, Barth A, Bilodeau – Goeseels S, Panich P, et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rat. Theriogenology. 2003; 60(8): 1539-1551.
17. Yum SS, kim sp, kang my, Nam Sh. Inhibitory effect of curcumin on liver injury in a murine model of exdotoxemic shock. Biotechnol. 2010; 23: 209-14.
18. EL-wakf am, Elhabiby EM, El-Kholy wm, Abd El-Ghany E. Use of turmeric and curcumin to alleviate adverse reproductive outcomes of water nitrate pollution in male rats. Nat Sci. 2011; 9(7): 229-39.
19. Hbeyyo, ozbek E, cekmen M, simsek A, otunctemur A, somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activate protein kinase and nuclear factor-kappa B Signaling pathways. Hum reprod. 2009; 24(7): 1717-25.
20. Anand p, Thomas S, Kunnumakkara. Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. Biochemical pharmacology. 2008; 76(11): 1590-1611.
21. FAO, curcumin chemical and Technical assessmen F (CTA) First dra ft prepared by Ivan stankovic, chemical and Technical assessment. 2004.
22. Wen-Guang YU, Gang UX, Gui-Jie Ren, Xia XU, et al. Preventive action of curcumin in experimental acute pancreatitis in mouse. Indian j Med Res. 2011; 134: 717-24.
23. Aktas C, Kantar M, Erboga M, Ozturk S. Anti apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testes. Toxicol Ind Health. 2012; 28(2): 122-30.
24. Momeni H.R, Eskandari N, effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. Iranian journal of Reproductive Medicine. 2012; 10.
25. Singh, preeti, Deora, Kanchan, Sankhla, Vandana, Mogra, Priya. curcumin rendered protection against cadmium chloride induced
15. Wenxiang wang, yan sun, jin Liu, Jieying wang, et al. Protective effect of theaflavin on cadmium-induced testicular toxicity in male testicular damage in swiss albino mice. Journal of cell and molecular biology. 2012; 10: 32-38.
26. Sanocka, karpism, Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod Biology Endocrinal. 2004; 2: 12-19.
27. Turki, Ameen (M. B. Ch. B. C), Majeed Moayed, Naji. Measurment of serum malondialdehyde (MDA) levels as marker of Lipid peroxidation in neonatal sepsis. Thi-Qar Medical Journal (TQMJ). 2011; 5(2): 9-17.
28. Katalinica V, Modunb D, Musicb 1, Bohan M, Gender. differences in antioxidant capacity of rat tissues defermined by Z, ZV-azzinobis (3 ethylbenzothiazoline sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. Comparative Biochemistry and physiology, partc. 2005; 140(1): 47-52.
29. Sutradhar B.C, Park J, Hong G, Choi S.H, et al. Effects of trypsinization on viability of equine chondrocytes in cell culture. Pakistan veterinary journal. 2010; 30(4): 232-238.
30. Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Rafiei Alavi E, et al. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. Blank well verlag GmbH. Andrologia. 2009; 41: 335-340.
31. Ren XM, Wang GG, Xu Da, Luo K, et al. The Protection of Selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. Food and chemical toxicology. 2012; 50: 3221-3229.
32. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis ss. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian J Exp Biol. 2010; 48(5): 425-435.
33. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Sakine F, Atessahind A. Kulak size R, et al. The Effect of antioxidant on post-thawed angora goat (capra hircus ancryrensis) sperm parameters, Lipid peroxidation and antioxidant activates. Small Ruminant Res. 2010; 89: 24-30.

34. Ollero M, Gil Guzman E, Lopez Mc, Sharma Rk, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum reprod.* 2001; 16(9): 1912-21.
35. Bielski B.H, Arudi R.L, Sutherland M.W. A study of the reactivity of HO_2/O_2 – with unsaturated fatty acids. *Journal of biological chemistry.* 1983; 258(8): 4759-4761.
36. Ognjanovic B, Markovic N, Trbojevic I. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology.* 2010; 29(2): 191-197.
37. castellanos P, Mateo R, Reglero NM, Estes MC, et al. In vitro effects of lead on fatty acid composition, oxidative stress biomarkers and quality of ram spermatozoa *toxicol environ chem.* 2008; 90: 1163-75.
38. Jones R, Mann T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous Phospholipids. *Journal of reproduction and fertility.* 1977; 50: 261-268.
39. Salama AF, El-Bahr SM. Effect of curcumin on cadmium-induced oxidative testicular damage in rats. *J Med Res Ins.* 2007; 28(2): 167-73.
40. Zoran B, Vidmar G, Meden-vrtovec H. Sperminal reactive oxygen species as predictors of fertilization embryo quality pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intra cytoplasmic sperm injection. *International journal of andrology.* 2003; 26: 279-285.
41. Aitken RJ, De Iulis GN, Sharma R.K, Alvarez JG, et al. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Bjomed on line.* 2007; 14: 727-33.
42. Hammadeh M.E, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, et al. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reproductive biomedicine online.* 2006; 13: 696-706.
43. Sharma Pk. Physiology of male gametogenesis. *Clinical reproductive medicine and surgery.* 2007; 4: 73-83.
44. Abarikwu S, Akiri O, Durojaiye M, Alabi A. Combines administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output antioxidant defenses and inflammatory responsive genes. *Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2014; 143: 49-60.

Effect of curcumin on plasma membrane integrity and stress oxidative and serum in mice treated with cadmium chloride factors testis

Chehrei SH, Ph.D.^{1*}, Momeni HR, Ph.D.², Atabaki Z, M.Sc.²

1. Department of biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
2. Department of Biology, Faculty of science, Arak University, Arak, Iran

* Email corresponding author: Sh-chehrei@iau-arak.ac.ir

Received: 28 Aug. 2017

Accepted: 25 Feb. 2018

Abstract

Aim: The current research was done to investigate the sperm plasma membrane integrity, oxidative stress factors of sperm and testis in male mice treated with cadmium.

Material and Methods: 24 adult NMRI mice were divided into four groups: 1. Control group 2. Treated with cadmium chloride (5 mg/kg) 3. Treated with Curcumin (100 mg/kg) 4. Treated with curcumin + cadmium chloride. The treatments were performed as a single dose and after 24 hours, epididymal spermatozoa of different groups were used to evaluate the plasma membrane integrity. In addition, the amount of malondialdehyde (MDA) and the anti-oxidant activity of serum and testis were evaluated. Data were analyzed using ANOVA test followed by Turkey's test ($p < 0.05$).

Results: findings showed that cadmium chloride caused a significant decrement in plasma membrane integrity compared to the control groups. In addition, cadmium chloride induced a significant increment of MDA in serum and testis and a significant decrement in total antioxidant activity of serum and testis as compared to the group. In curcumin + cadmium chloride- treated group, curcumin could significantly compensate the toxic effect of cadmium on these parameters compared to the cadmium-treated group.

Conclusion: it seems that curcumin as a potent antioxidant is able to ameliorate the adverse effects of cadmium chloride on sperm plasma membrane integrity, lipid oxidation and total antioxidant activity of serum and testis.

Keywords: cadmium, curcumin, malondialdehyde, plasma membrane integrity, total antioxidant activity.