Journal of Cell and Tissue 16(1), Spring (2025) 51-69

Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Protective effects of alpha-lipoic acid on oxidative stress-induced impairments on vital parameters of human sperm induced by cadmium

Ashena F[a], Momeni HR[b*], Etemadi T[a]

[a]M.Sc, Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
[b]Ph.D, Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Ashena F, Momeni HR, Tahereh Etemadi T. Protective effects of alpha-lipoic acid on oxidative stress-induced impairments on vital parameters of human sperm induced by cadmium. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(1):51-69.

https://doi.org/10.61882/JCT /16. 1. 51

KEYWORDS

Alpha-lipoic acid
Antioxidant
Cadmium
Human sperm
Oxidative stress

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress exerts destructive effects on sperm cells, leading to sperm dysfunction and male infertility. It occurs when there is an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the cell's antioxidant defense system. ROS are free radicals and peroxides that can damage cells. They can harm the sperm cell membrane, which is rich in polyunsaturated fatty acids, through lipid peroxidation, impairing sperm membrane fluidity. This affects motility and the sperm's ability to fuse with the egg. Additionally, ROS can directly damage sperm DNA, leading to DNA fragmentation and other abnormalities. Oxidative stress can also impair sperm motility by disrupting energy production in the mitochondria. Severe oxidative stress may result in sperm cell death (apoptosis or necrosis), reducing sperm viability. These negative effects ultimately decrease the chances of successful fertilization and a healthy pregnancy.

Cadmium, a pervasive environmental and industrial pollutant, induces significant toxic effects on human health, particularly on the male reproductive system. It is both a naturally occurring element and a widespread environmental pollutant generated from various industrial and agricultural activities. Its presence in soil, water, air, and food exert risks on human health. Exposure to cadmium is strongly linked to increased oxidative stress, which damages cellular components such as lipids, proteins, and DNA within sperm

* Corresponding author. Tel: 08632627234
E-mail address: h-momeni@araku.ac.ir
DOI: https://10.61882/JCT/16.1.51
Received: 29 Mar. 2025; Received in revised form: 25 May. 2025; Accepted: 7 Jun. 2025
Original Article
©Author

cells. This oxidative damage can lead to impairments in critical sperm parameters, including motility, viability, morphology, and DNA integrity, thereby compromising fertilization potential and contributing to male infertility. The severity of these effects underscores the need for effective strategies to mitigate cadmium-induced sperm damage.

Alpha-lipoic acid (ALA), a naturally occurring organosulfur compound, is produced in the body, obtained through dietary sources, and taken as a supplement or medication. ALA is a potent antioxidant with the unique ability to function in both aqueous and lipid environments. This versatility allows ALA to scavenge a wide range of free radicals and ROS, thereby protecting cells from oxidative damage. Furthermore, ALA can regenerate other endogenous antioxidants, such as glutathione, further amplifying its protective effects. Given ALA's well-documented antioxidant properties and its potential to mitigate oxidative stress, this study aims to investigate its protective effects on human sperm exposed to cadmium.

Aim: This research will explore the extent to which ALA can counteract the detrimental effects of cadmium-induced oxidative stress on vital sperm parameters. By evaluating the impact of ALA supplementation on sperm motility, viability, morphology, and DNA integrity in the presence of cadmium, this study seeks to determine the potential therapeutic role of ALA in preserving sperm function and improving male fertility outcomes. The results of this investigation will provide valuable insights into the efficacy of ALA as a protective agent against cadmium-induced reproductive toxicity and contribute to the development of strategies for mitigating the harmful effects of environmental pollutants on male reproductive health.

Materials and Methods: In this experimental study, human sperm samples were divided into five groups: 1) spermatozoa at 0 hours, 2) spermatozoa at 180 minutes (control group), 3) spermatozoa treated with cadmium chloride (10 µM) for 180 minutes, 4) spermatozoa treated with ALA (50 µM) + cadmium chloride (10 µM) for 180 minutes and 5) spermatozoa treated with ALA (50 µM) for 180 minutes.

Vital sperm parameters, including motility, viability, plasma membrane and acrosome integrity, mitochondrial membrane potential, and DNA fragmentation, as well as oxidative stress indices (total antioxidant capacity and lipid peroxidation), were examined in different groups. Data were expressed as mean ± standard deviation and analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Means with $p<0.05$ were considered significant.

Results: Cadmium, by increasing malondialdehyde levels and decreasing total antioxidant capacity, reduced motility, viability, plasma membrane and acrosome integrity, mitochondrial membrane potential, and DNA integrity in human spermatozoa. Interestingly, ALA was able to compensate for the destructive effects of cadmium on vital sperm parameters and oxidative stress indices.

Conclusion: Cadmium-induced oxidative stress has detrimental effects on human sperm parameters. However, ALA, with its antioxidant properties, mitigates these adverse effects. Therefore, ALA could be considered as a complementary treatment for male infertility caused by oxidative stress.

سلول و بافت، دوره ۱۶، شماره ۱، سال ۱۴۰۴، صفحات ۵۱ تا ۶۹

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

اثرات محافظتی آلفالیپوئیک اسید بر اختلال‌های ناشی از استرس اکسیداتیو بر روی پارامترهای حیاتی اسپرم انسان القاشده توسط کادمیوم

فاطمه آشنا[۱]، حمیدرضا مومنی*[۲]، طاهره اعتمادی[۳]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران، ایمیل (نویسنده اول)

[۲*] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران، h-momeni@araku.ac.ir

[۳] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران، t-etemadi@araku.ac.ir

واژگان کلیدی

آلفالیپوئیک اسید
آنتی‌اکسیدانت کادمیوم
اسپرم انسان
استرس‌اکسیداتیو

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۷

چکیده

هدف: استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از عوامل مهم اختلال عملکرد اسپرم و ناباروری شناخته شده است. آلاینده‌های زیست محیطی مانند کادمیوم می‌توانند با القای استرس اکسیداتیو بر پارامترهای اسپرم تأثیر منفی بگذارند. در پژوهش حاضر اثر محافظتی آلفا لیپوئیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی بر پارامترهای حیاتی اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** نمونه‌های اسپرم انسان به پنج گروه تقسیم شدند: ۱) اسپرم‌های لحظه صفر، ۲) اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (گروه کنترل)، ۳) اسپرم‌های تیمارشده با کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۴) اسپرم‌های تیمارشده با آلفالیپوئیک اسید (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه و ۵) اسپرم تیمار شده با آلفالیپوئیک اسید (۵۰ میکرومولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. پارامترهای حیاتی اسپرم (قابلیت تحرک، قابلیت حیات، تمامیت غشای پلاسمایی، تمامیت آکروزوم، پتانسیل غشای میتوکندری، شکستگی DNA، و شاخص‌های استرس اکسیداتیو (قدرت آنتی‌اکسیدانتی کل و میزان پراکسیداسیون لیپیدی) در گروه‌های مختلف بررسی شد. **نتایج:** کادمیوم کلراید با افزایش سطح مالون دی آلدئید و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل باعث کاهش قابلیت تحرک، قابلیت حیات، یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزوم، پتانسیل غشای میتوکندری و تمامیت DNA اسپرم شد، در حالی‌که آلفالیپوئیک اسید توانست اثرات مخرب کادمیوم کلراید بر پارامترهای حیاتی اسپرم و شاخص‌های استرس اکسیداتیو را جبران نماید. **نتیجه‌گیری:** استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم کلراید بر پارامترهای اسپرم انسان اثرات مخربی القا می‌کند. درحالی‌که آلفالیپوئیک اسید با خواص آنتی‌اکسیدانتی خود اثرات نامطلوب استرس اکسیداتیو بر اسپرم انسان را جبران می‌کند، که نشان می‌دهد آلفالیپوئیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک درمان مکمل در ناباروری مردان که ناشی از استرس اکسیداتیو است استفاده شود.

۱- مقدمه

آلاینده‌های زیست محیطی به‌عنوان عوامل اصلی تعیین کننده بیماری‌ها از اختلالات متابولیک گرفته تا بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان شناخته می‌شوند. علاوه‌براین، تصور می‌شود که در طول ۵ دهه گذشته این عوامل با کاهش تدریجی نرخ باروری نیز رابطه مستقیم دارند. به‌ویژه در انسان‌ها، به‌نظر می‌رسد که مردان بیشتر از زنان مستعد اختلال در باروری به‌دلیل

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۸۶۳۲۶۲۷۲۳۴

آدرس پست الکترونیک: h-momeni@araku.ac.ir

قرارگرفتن در معرض آلودگی‌های زیست محیطی هستند. در میان این آلاینده‌های زیست محیطی که نقش موثری در باروری مردان دارند، فلزات سنگین، به‌ویژه کادمیوم جایگاه ویژه‌ای را به‌خود اختصاص داده است. کادمیوم، یک فلز سنگین و آلاینده زیست محیطی سمی، معمولاً به‌طور گسترده در محیط و به‌ویژه در سیستم آب و خاک یافت می‌شود (۱). این فلز به‌دلیل توانایی تجمع زیستی خود در گیاهان و آبزیان، در نهایت می‌تواند از طریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان شود و خطر قابل‌توجهی برای سلامت انسان ایجاد نماید (۲). مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در مردان نشان داده است که ارتباط قابل‌ملاحظه‌ای بین ناباروری و کیفیت ضعیف اسپرم ناشی از قرار گرفتن در معرض کادمیوم در شرایط مختلف شغلی یا محیطی وجود دارد. در انسان، داده‌های موجود نشان می‌دهند که مقدار کادمیوم در مایع منی با مصرف سیگار همبستگی مستقیم و با تعداد، تحرک و زنده ماندن اسپرم رابطه معکوس دارد (۳). سمیت تولیدمثلی کادمیوم توسط مکانیسم‌های متعددی القا می‌شود که در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی عمدتاً می‌توان به آسیب ساختاری عروق بیضه و سد خونی- بیضه‌ای، استرس اکسیداتیو و التهاب، سمیت سلول‌های سرتولی و لیدیگ، تنظیم اپی‌ژنتیکی ژن‌های دخیل در عملکرد تولیدمثلی مردان، اختلال غدد درون‌ریز محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بیضه و تداخل با یون‌های ضروری اشاره نمود (۴).

مطالعات نشان داده‌اند که کادمیوم با اثر بر سیستم اکسیداسیون سلول، از طریق اختلال مستقیم زنجیره تنفسی میتوکندری یا تغییرات اکسیداتیو برگشت ناپذیر به‌دلیل تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن اثرات مخرب خود را القا می‌نماید (۵). با این فرض که اثرات کادمیوم به‌دلیل استرس اکسیداتیو القا شود، استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌تواند یک استراتژی مناسب در جهت کاهش اثرات این آلاینده زیست محیطی در نظر گرفته شود. تاکنون مطالعات فراوانی در جهت استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها در بهبود آسیب‌های وارد شده به بیضه و اسپرم در اثر استرس اکسیداتیو انجام شده است. بااین‌حال، اثرات آلفالیپوئیک اسید (ALA) بر روی استرس اکسیداتیو القاشده توسط کادمیوم بر اسپرم انسان به‌طور کامل مشخص نشده است.

ALA که با نام‌های لیپوئیک اسید (LA) و نیز تیوکتیک اسید شناخته می‌شود، یک ترکیب ارگانوسولفور مشتق شده از اسید کاپریلیک (اسید اکتانوئیک) است. این ترکیب معمولاً در میتوکندری یافت می‌شود و برای عملکردهای مختلف آنزیمی ضروری است. در انسان، ALA در کبد و سایر بافت‌ها سنتز می‌شود و هم‌چنین از منابع حیوانی و گیاهی در رژیم غذایی به‌دست می‌آید (۶). ALA در جوانه گندم، مخمر آبجو، کلم، اسفناج، گوجه فرنگی، بروکلی، شلغم، گوشت قرمز و... یافت می‌شود (۷). هر دو نوع اکسید شده و احیا شده ALA اسید آنتی‌اکسیدانت‌های قدرتمندی هستند که عملکرد آن‌ها عبارتند از: پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن، بازسازی آنتی‌اکسیدانت‌ها از جمله ویتامین‌های C و E و گلوتاتیون، کلیت نمودن یون‌های فلزی، ترمیم پروتئین‌های اکسید شده و تنظیم رونویسی ژن (۸). این آنتی‌اکسیدانت در مطالعات فراوانی باعث بهبود پارامترهای حیاتی اسپرم شده است. در این خصوص، اثرات محافظتی ALA بر عملکرد اسپرم انسان در حین انجماد و ذوب، منجر به بهبود قابل توجهی در درصد تحرک اسپرم، آسیب کمتر DNA و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شده است (۹). همچنین نشان داده شده است که میزان تحرک اسپرم انسان پس از انکوباسیون با ALA بهبود یافته است (۱۰). علاوه‌براین، تجویز داروئی ALA به مردان به‌مدت ۸۰ روز باعث کاهش استرس اکسیداتیو، آسیب DNA و کروماتین شد (۱۱).

با توجه به دخالت مسیرهای اکسیداتیو در سمیت کادمیوم، و اثرات محافظتی ALA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، مطالعه حاضر با هدف روشن نمودن اثرات محافظتی ALA در سمیت القا شده توسط کادمیوم کلراید بر روی پارامترهای حیاتی اسپرم انسان انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

گروه‌بندی و تیمار نمونه‌های اسپرم انسان: به‌منظور انجام این پژوهش آزمایشگاهی از نمونه‌های نرمال اسپرم مراجعه کنندگان به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری امید رویان اراک، ایران استفاده شد. نمونه‌های اسپرم تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه اراک منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ابتدا نمونه‌های اسپرم از لحاظ تعداد و کیفیت بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهان (۱۲) مورد بررسی قرارگرفتند و سپس نمونه‌های مناسب برای انجام آزمایش‌ها انتخاب شدند. این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه اراک بررسی و با کد اخلاق IR.ARAKU.REC.1401.037 مورد تصویب قرار گرفت. به منظور شستشو، نمونه‌های اسپرم به نسبت ۱ به ۱ با محیط کشت Ham's F10 (ایده زیست نوترکیب، ایران) مخلوط شده و سپس با دور ۳۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس درون هر میکروتیوپ میزان ۲۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت قرار گرفت (سوسپانسیون اسپرم) و نمونه‌ها به ۵ گروه تقسیم بندی شدند: ۱) اسپرم‌های لحظه صفر، ۲) اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳) اسپرم‌های تیمارشده با کادمیوم کلراید (سیگما، آمریکا) با غلظت ۱۰ میکرومولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۴) اسپرم‌های تیمارشده با ALA (مرک، آلمان) با غلظت ۵۰ میکرومولار و کادمیوم کلراید با غلظت ۱۰ میکرومولار (ALA ۱۵ دقیقه پیش از کادمیوم کلراید اضافه شد) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۵) اسپرم‌های تیمارشده با ALA با غلظت ۵۰ میکرومولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. پس از گروه‌بندی نمونه‌ها، میکروتیوپ‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و آزمایش‌های مورد نظر بر روی اسپرم‌ها انجام گرفت (برای هر آزمایش، ۶ بار تکرار در هر گروه از اسپرم‌های افراد مختلف). به‌منظور یافتن غلظت موثر کادمیوم کلراید نمونه‌های اسپرم به‌صورت جداگانه با غلظت‌های ۵، ۱۰و ۲۰ میکرومولار کادمیوم کلراید به‌مدت ۳ ساعت تیمار شدند (۹). سپس تحرک و قابلیت حیات نمونه‌ها مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم کلراید به‌عنوان غلظت موثر در نظر گرفته شد. به‌منظور یافتن غلظت موثر ALA نمونه‌های اسپرم با غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ALA (۷) به‌مدت ۱۵ دقیقه تیمار و پس از آن کادمیوم کلراید با غلظت ۱۰ میکرومولار اضافه شد. سپس، نمونه‌های اسپرم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه درون انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از بررسی تحرک و قابلیت حیات، غلظت ۵۰ میکرومولار برای ALA به‌عنوان غلظت موثر انتخاب شد. غلظت‌های موثر سپس برای بررسی سایر پارامترهای اسپرم مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش تحرک اسپرم: به‌منظور ارزیابی قابلیت تحرک اسپرم، طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۱۲)، ۱۰میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم را بر روی لام گذاشته و لامل بر روی آن قرار داده شد. سپس با کمک میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و بزرگنمایی ×۴۰۰ چندین میدان دید مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. در هر میدان دید تعداد اسپرم‌های پیش‌رونده، درجا و ساکن یادداشت و در نهایت درصد اسپرم‌های با تحرک پیش رونده گزارش شد.

سنجش قابلیت حیات اسپرم: جهت سنجش قابلیت حیات اسپرم، براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۱۲)، از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. بدین‌منظور نسبت یک حجم از سوسپانسیون اسپرم و دو حجم از رنگ ائوزین (۱٪، مرک، آلمان) درون میکروتیوپ مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ ثانیه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن، نسبت سه حجم از رنگ نیگروزین (۱۰٪، مرک، آلمان) به میکروتیوپ اضافه و سپس گسترش نازکی بر روی لام ایجاد شد. پس از خشک شدن گسترش، لام با بزرگنمایی ×۱۰۰۰ و توسط میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مشاهده و پس از

شمارش تعداد ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده گزارش شد. در این رنگ‌آمیزی سر اسپرم‌های مرده به‌رنگ قرمز، در حالی‌که اسپرم‌های زنده به‌رنگ سفید مشاهده می‌شوند.

سنجش تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم: به‌منظور بررسی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم از رنگ‌آمیزی هوخست (Hoechst) و پروپیدیوم آیوداید (Propidium Iodide) استفاده شد. طبق روش ارائه شده توسط Sutradhar و همکاران (۱۳) ابتدا به ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم، ۵ میکرولیتر رنگ هوخست (سیگما، امریکا) افزوده شد و ۱۵ دقیقه در تاریکی درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در مرحله بعد، ۵۰ میکرولیتر از رنگ پروپیدیوم آیوداید (سیگما، امریکا) به نمونه اسپرم اضافه شد و به‌مدت یک دقیقه در تاریکی نگه‌داری شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر روی لام قرارگرفت و روی آن لامل‌گذاری شد. لام موجود با کمک میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, Japan) با فیلتر UV و بزرگنمایی ×۱۰۰۰ مشاهده شد. در میدان دیدهای مختلف تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌ها با غشای پلاسمایی سالم گزارش شد. در این رنگ‌آمیزی اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالم دارند به‌رنگ آبی، در حالی‌که سر اسپرم‌ها با غشای پلاسمایی آسیب دیده به‌رنگ قرمز دیده می‌شوند.

سنجش تمامیت آکروزوم اسپرم: جهت بررسی ارزیابی تمامیت آکروزوم از رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو (سیگما، امریکا) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط ژانگ و همکاران استفاده شد (۱۴). بدین منظور ابتدا از نمونه‌های اسپرم هر گروه گسترش نازکی بر روی لام تهیه شد. لام‌های مذکور به‌مدت ۱۵ دقیقه درون محلول پارافرمالدهید قرار گرفت. پس از خشک شدن، لام‌ها با محلول بافر فسفات سالین (Phosphate buffer saline: BPS) شست‌وشو شدند و سپس به‌مدت ۷ دقیقه درون جار حاوی محلول کوماسی بریلیانت بلو قرار گرفتند و پس از آن با آب مقطر شست وشو شدند. سپس لام‌ها با بزرگنمایی ×۱۰۰۰ توسط میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مشاهده، ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌هایی با آکروزوم سالم گزارش شد. در این رنگ‌آمیزی ناحیه آکروزوم در اسپرم‌های با آکروزوم سالم به‌رنگ آبی مشاهده می‌شوند، درحالی‌که آکروزوم-های آسیب دیده که قادر به جذب رنگ نیستند بی‌رنگ باقی می‌مانند.

بررسی میزان شکست DNA اسپرم: جهت بررسی یکپارچگی DNA و کروماتین اسپرم، تست (Sperm Chromatin SCD Dispersion) انجام شد. به‌منظور انجام این تست از کیت SCD (ایده ورزان فردا، ایران) استفاده شد. طبق دستوالعمل کیت نمونه‌ها آماده و سپس لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و با بزرگنمایی ×۱۰۰۰بررسی شد. سپس ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌ها با شکستگی DNA محاسبه و گزارش شد. در این تست اسپرم‌های بدون شکست DNA هاله‌ی بزرگ یا متوسط در اطراف خود داشتند. درحالی‌که اسپرم‌ها با شکست DNA بدون هاله یا با هاله‌هایی بسیار کوچک مشاهده شدند.

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم: به‌منظور بررسی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم از رنگ‌آمیزی رودامین ۱۲۳ (سیگما، امریکا) استفاده شد. جهت انجام این تست از دستورالعمل ارائه شده توسط Modica-Napolitano و همکاران (۱۵) استفاده شد. به‌طور خلاصه، بر روی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپرم، ۲ میکرولیتر رنگ رودامین ۱۲۳ اضافه و در دمای اتاق و تاریکی به‌مدت ۱۰ دقیقه نگه‌داری شد. سپس سوسپانسیون حاصل ۲ مرتبه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول PBS به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل با ۲۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون گردید. یک قطره از سوسپانسیون روی لام قرار گرفت و پس از تهیه گسترش با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, Japan) و با فیلتر مناسب ۲۰۰ اسپرم در

میدان دیدهای مختلف شمارش و درصد اسپرم‌هایی با میتوکندری سالم به تعداد کل اسپرم‌ها گزارش شد. در این رنگ آمیزی اسپرم‌های دارای غشای میتوکندری سالم با گردنی سبز درخشان و اسپرم‌ها با غشای میتوکندری آسیب دیده با گردنی فاقد رنگ مشاهده شدند.

سنجش سطح مالون دی آلدئید (MDA): محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی MDA می‌باشد. به‌منظور سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های حاوی ۲۰ میلیون اسپرم از کیت سنجش مالون آلدهید (نوند سلامت، ایران) و بر اساس دستورالعمل کیت استفاده شد. میزان جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (شرکت PG-T80، انگلستان) خوانده شد. با توجه به عدد جذب به‌دست آمده از محلول‌های استاندارد، منحنی استاندارد رسم و معادله رگرسیون (y=0.023x+0.0203؛ که در آن y غلظت و x جذب می‌باشد) به‌دست آمد. سپس با استفاده از جذب‌های به‌دست آمده از نمونه‌های گروه‌های مختلف و معادله رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد، غلظت MDA در اسپرم گروه‌های مختلف محاسبه و بر حسب $\mu M/2\times10^7$ spermatozoa برای هر نمونه گزارش شد.

سنجش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی (TAC) اسپرم: به‌منظور سنجش سطوح ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی (Total Antioxidant Power: TAC) در نمونه‌های حاوی ۲۰ میلیون اسپرم از کیت TAC (نوند سلامت، ایران) و طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت PG-T80، انگلستان) در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. باتوجه به میزان جذب به‌دست آمده برای محلول‌های استاندارد، منحنی استاندارد رسم و معادله رگرسیون (y= 0.0036x + 0.0035؛ که در آن y غلظت و x جذب می‌باشد) به‌دست آمد. سپس با استفاده از جذب‌های به‌دست از نمونه‌های گروه‌های مختلف و معادله رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد، میزان TAC در اسپرم گروه‌های مختلف محاسبه و بر حسب$\mu M/2\times10^7$ spermatozoa برای هر نمونه گزارش شد.

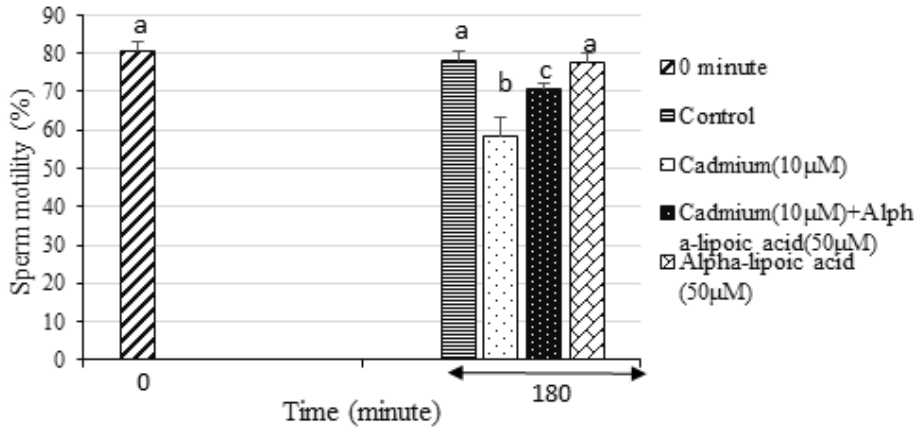
۳- آنالیز آماری

در این مطالعه داده‌های حاصل به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارائه شد. داده‌ها توسط نرم-افزارSPSS نسخه ۱۶ و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One- way ANOVA) و تست توکی (Tukey's Test) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

ارزیابی تحرک اسپرم

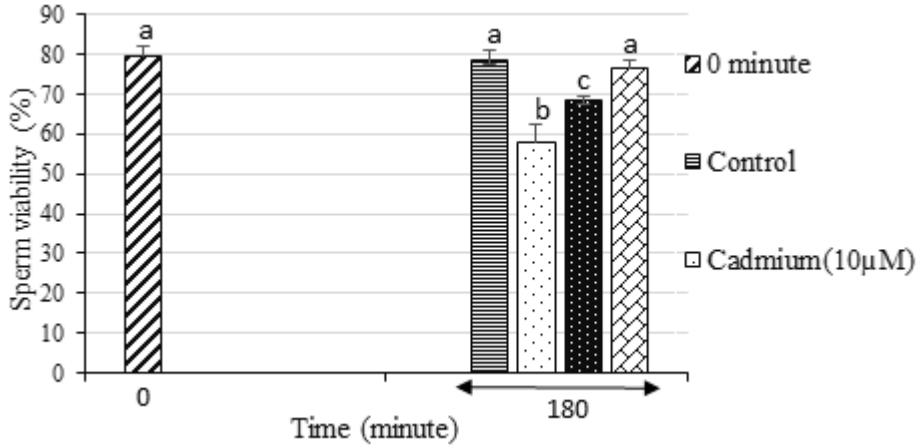
بررسی تحرک پیش‌رونده اسپرم‌های انسان در گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه) تفاوت معنی‌داری با گروه لحظه صفر نشان نداد ($p>۰/۰۵$). در اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) تحرک نسبت به گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کاهش یافت. درحالی‌که در گروه تیمار هم‌زمان اسپرم‌ها با ALA (۵۰ میکرومولار) و کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ALA توانست تحرک اسپرم‌ها را نسبت به گروه کادمیوم کلراید به‌صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) افزایش دهد. کاربرد ALA (۵۰ میکرومولار) به‌تنهایی تغییر معنی‌داری در تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد ($p>۰/۰۵$) (نمودار ۱).



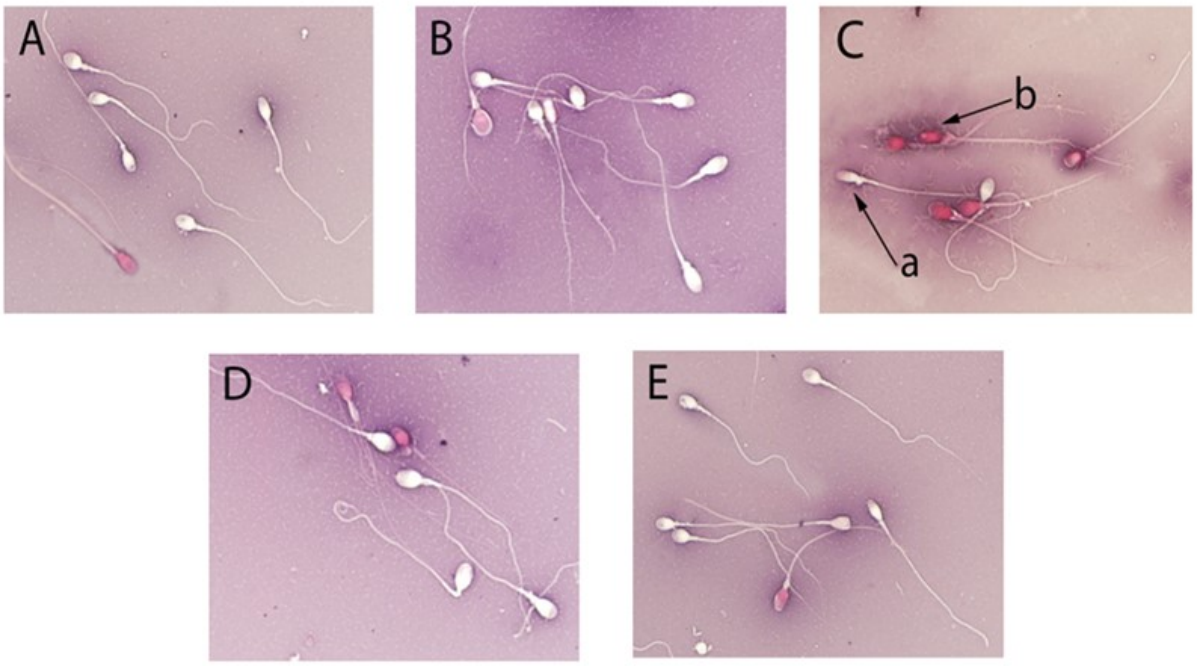
نمودار ۱: ارزیابی قابلیت تحرک اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه p<۰/۰۵).

ارزیابی قابلیت حیات اسپرم

بررسی قابلیت حیات در اسپرم‌های گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه) نسبت به لحظه صفر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵). نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) قابلیت حیات اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) بود. استفاده همزمان ALA (۵۰ میکرومولار) با کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار) توانست اثرات کادمیوم کلراید را به‌صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کادمیوم کلراید جبران کند و قابلیت حیات اسپرم‌ها را افزایش دهد. استفاده از ALA (۵۰ میکرومولار) به‌تنهایی، نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در میزان حیات اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل نبود (p>۰/۰۵) (نمودار ۲ و شکل ۱).



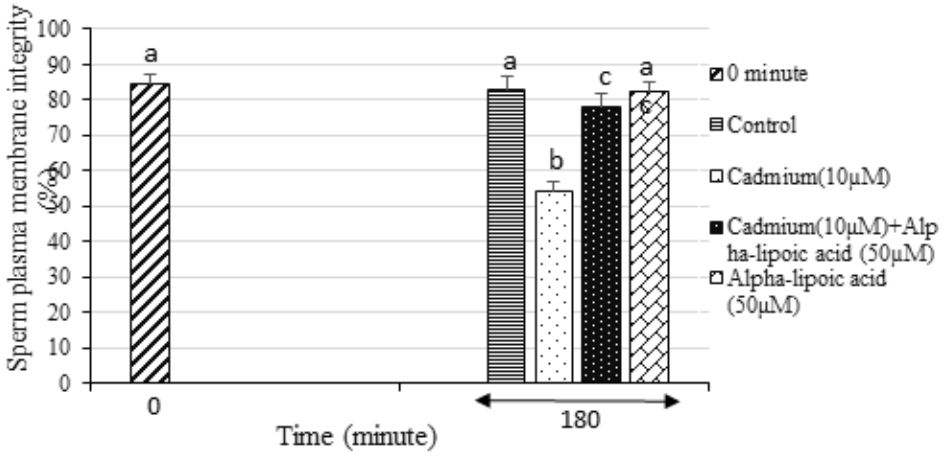
نمودار ۲: ارزیابی قابلیت حیات اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه p<۰/۰۵).



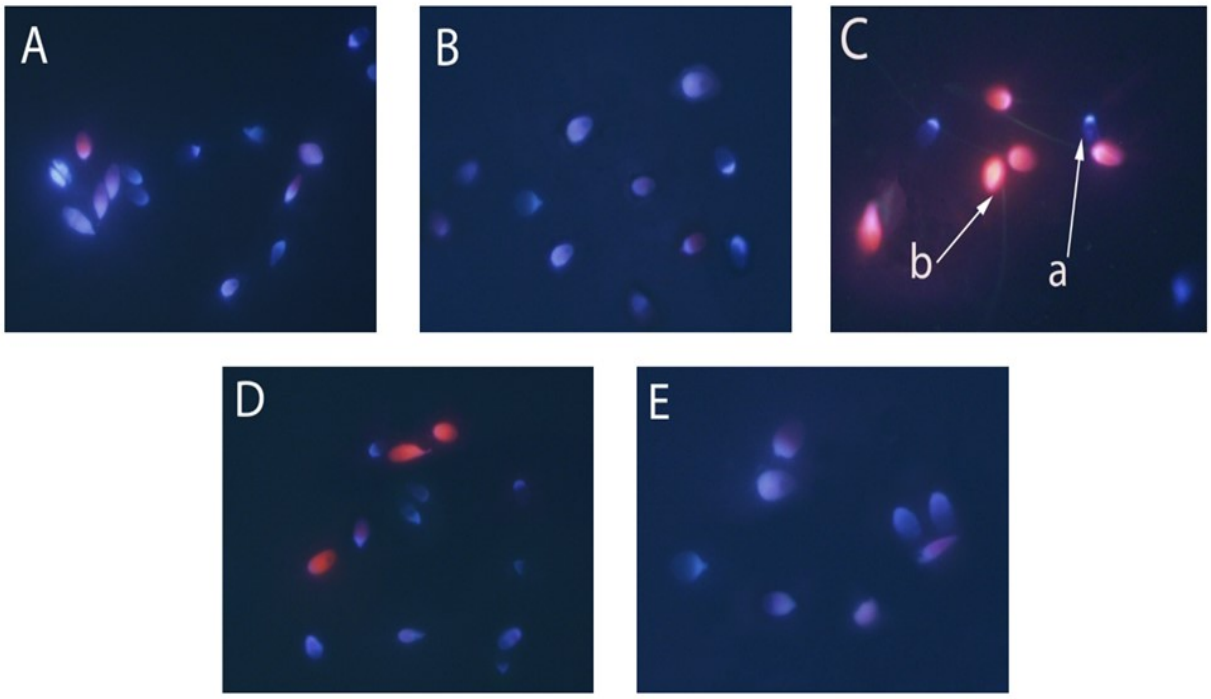
شکل ۱: ارزیابی قابلیت حیات اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین. A: اسپرم‌های گروه لحظه صفر؛ B: اسپرم‌های گروه کنترل ۱۸۰ دقیقه؛ C: اسپرم‌های گروه تیمارشده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه D: اسپرم‌های گروه تیمارشده با ALA (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه؛ E: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار). (a: اسپرم‌های زنده با سر سفید، b: اسپرم‌های مرده با سر قرمز)؛ بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.

ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم

با توجه به نتایج به‌دست آمده، تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم‌های گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه) اختلاف معنی‌داری نسبت به اسپرم‌های لحظه صفر نشان نداد ($p>0/05$). درگروه تیمارشده با کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار) تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه) دارای کاهش معنی‌داری ($p<0/001$) بود. درگروه ALA (۵۰ میکرومولار) به‌همراه کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)، ALA توانست اثرات مخرب کادمیوم کلراید را جبران کند و سبب افزایش معنی‌دار ($p<0/001$) تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کادمیوم کلراید شود. استفاده از ALA (۵۰ میکرومولار) به‌تنهایی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد ($p>0/05$) (نمودار ۳ و شکل ۲).



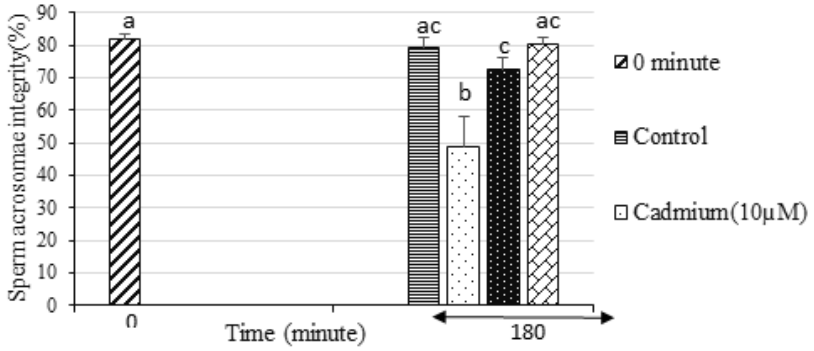
نمودار۳: ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه، p<۰/۰۵).



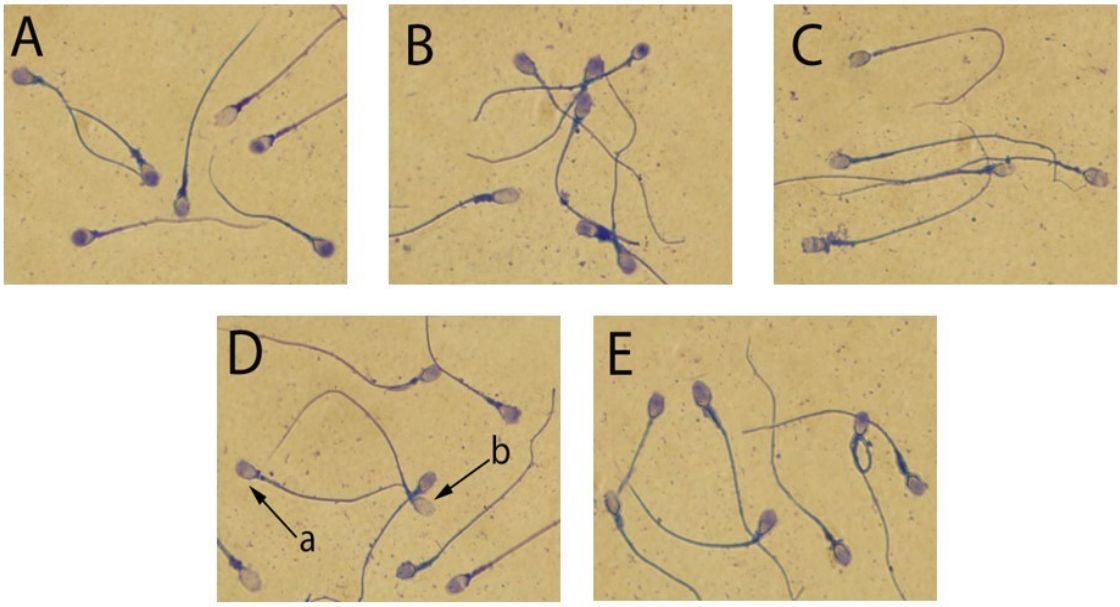
شکل ۲: ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف با استفاده از رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید. A: اسپرم‌های گروه لحظه صفر؛ B: اسپرم‌های گروه کنترل لحظه ۱۸۰ دقیقه؛ C: اسپرم‌های گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)؛ D: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)؛ E: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار). (a: اسپرم با سر آبی دارای غشای پلاسمایی سالم، b : اسپرم با سر قرمز دارای غشای پلاسمایی آسیب دیده). بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.

ارزیابی تمامیت آکروزوم اسپرم

براساس نتایج به‌دست آمده، تمامیت غشای آکروزوم در گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) تفاوت معنی‌داری نسبت به لحظه صفر نداشت ($p>۰/۰۵$). بررسی اسپرم‌های تیمارشده با کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار) نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) تمامیت آکروزوم نسبت به گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه) بود. در تیمار هم زمان با ALA (۵۰ میکرومولار) و کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار)، ALA توانست تمامیت آکروزوم را به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کادمیوم کلراید افزایش دهد و اثرات کادمیوم کلراید را تا حد گروه کنترل بهبود بخشد ($p<۰/۰۵$). کاربرد ALA (۵۰ میکرومولار) به‌تنهایی تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد ($p>۰/۰۵$) (نمودار ۴ و شکل ۳).



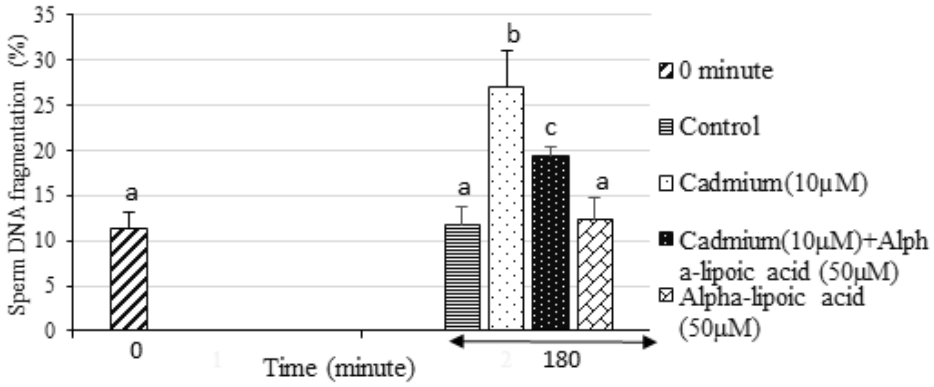
نمودار۴: ارزیابی تمامیت آکروزوم اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، $n=۶$ برای هر گروه، $p<۰/۰۵$).



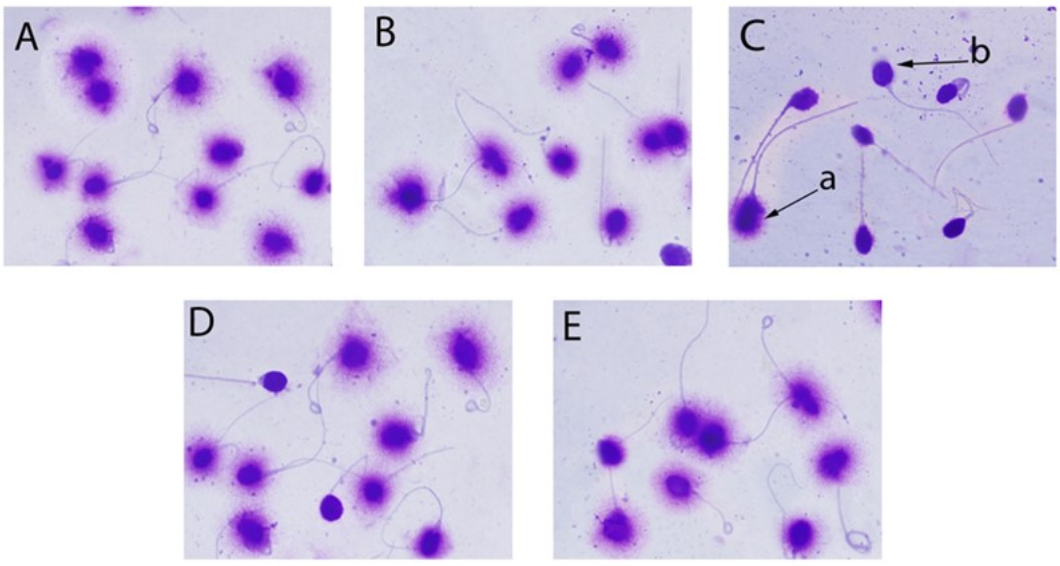
شکل ۳: ارزیابی تمامیت آکروزوم اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف با استفاده از رنگ‌آمیزی کوماسی بریلینت بلو. A: اسپرم‌های گروه لحظه صفر؛ B: اسپرم‌های گروه کنترل لحظه ۱۸۰ دقیقه؛ C: اسپرم‌های گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)؛ D: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)؛ E: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار). (a: اسپرم با سر آبی رنگ، دارای آکروزوم سالم، b: اسپرم با سر بدون رنگ، دارای آکروزوم آسیب دیده). بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.

ارزیابی میزان شکست DNA اسپرم (SCD)

مقایسه تمامیت DNA اسپرم در گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) با گروه لحظه صفر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵). درصد شکست DNA اسپرم‌ها در گروه تیمارشده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) داشت. درگروه‌های تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار) به همراه کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار)، ALA توانست اثرات کادمیوم کلراید را به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه تیمار با کادمیوم کلراید جبران نماید و باعث کاهش شکست DNA اسپرم شود (p<۰/۰۵) . ALA (۵۰ میکرومولار) به‌تنهایی اثرات قابل ملاحظه‌ای بر DNA اسپرم به نسبت گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) نداشت (p>۰/۰۵) (نمودار ۵ و شکل ۴).



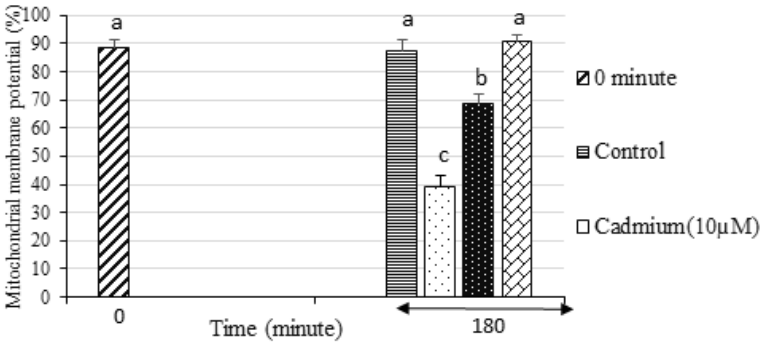
نمودار۵: ارزیابی میزان شکست DNA اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه، p<۰/۰۵).



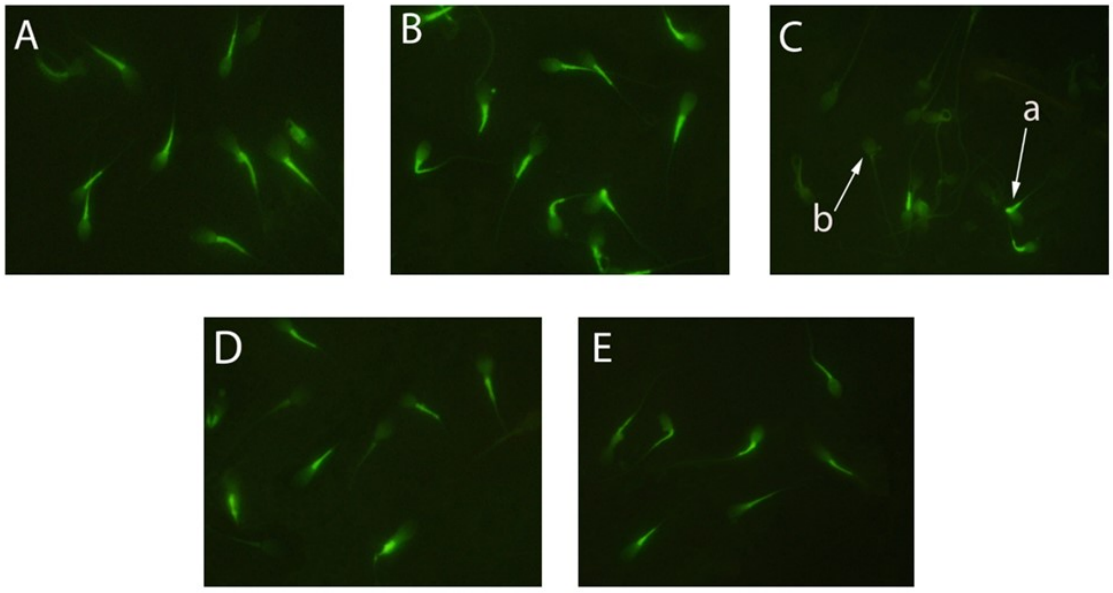
شکل ۴: ارزیابی میزان شکست DNA اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. A: اسپرم‌های گروه لحظه صفر؛ B: اسپرم‌های گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه)؛ C: اسپرم‌های گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) D: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)؛ E: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار). (a: اسپرم با هاله‌ی بزرگ و متوسط دارای DNA سالم؛ b: اسپرم با هاله‌ی کوچک و بدون هاله، دارای شکستگی DNA)؛ بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.

ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم

مقایسه پتانسیل غشای میتوکندری در گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) و گروه لحظه صفر نشان‌گر تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین این دو گروه نبود (p>۰/۰۵). بررسی اسپرم‌های تیمارشده با کادمیوم کلراید (۱۰میکرمولار) بیان‌گر کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) پتانسیل غشای میتوکندری در این گروه نسبت به گروه کنترل بود. تیمار هم‌زمان اسپرم‌ها با ALA (۵۰ میکرومولار) و کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) باعث افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) پتانسیل غشای میتوکندری نسبت به گروه کادمیوم کلراید بود. استفاده از ALA (۵۰ میکرومولار) به‌تنهایی سبب افزایش در تمامیت غشای میتوکندری نسبت به گروه کنترل شد ولی این افزایش معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵) (نمودار ۶ و شکل ۵).



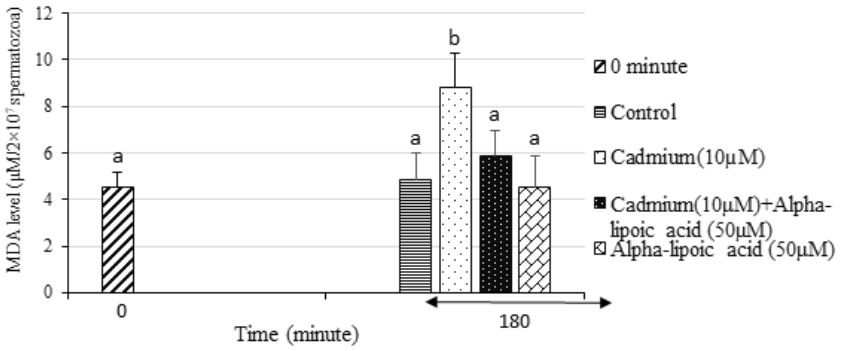
نمودار ۶: ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه، p<۰/۰۵).



شکل ۵: ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختف با استفاده از رنگ‌آمیزی رودامین ۱۲۳. A: اسپرم‌های گروه لحظه صفر؛ B: اسپرم‌های گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه)؛ C: اسپرم‌های گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)؛ D: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) E: اسپرم‌های گروه تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار). (a: اسپرم‌ها با گردن سبز درخشان دارای میتوکندری سالم، b: اسپرم‌ها با گردن غیر درخشان دارای میتوکندری معیوب)؛ بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.

ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی - سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA)

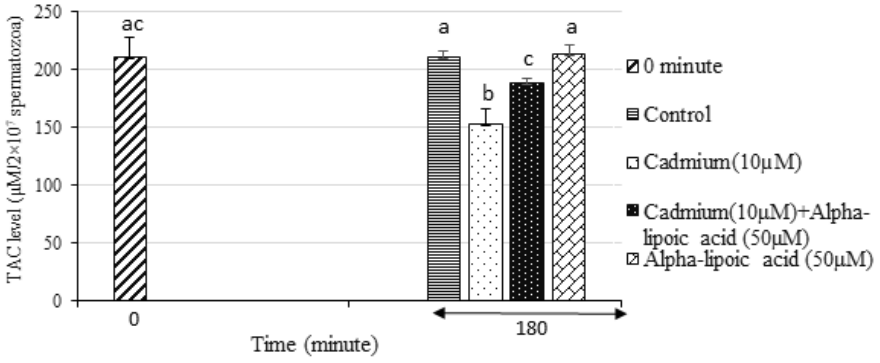
میزان MDA در گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) نسبت به لحظه صفر تفاوت معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). میزان MDA در اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) را نشان داد. تیمار همزمان اسپرم‌ها با ALA (۵۰ میکرومولار) و کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) باعث کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) میزان MDA نسبت به گروه کادمیوم کلراید شد و میزان آن را تا حد گروه کنترل کاهش داد. میزان MDA اسپرم‌های تیمار با ALA (۵۰ میکرومولار) تغییرات قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل نشان نداد (p>۰/۰۵) (نمودار ۷).



نمودار۷: ارزیابی میزان مالون دی آلدئید (MDA) اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه، p<۰/۰۵).

ارزیابی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل اسپرم (TAC)

میزان TAC در گروه کنترل (۱۸۰دقیقه) تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه لحظه صفر نداشت (p>۰/۰۵). در گروه کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) میزان TAC اسپرم کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) را نسبت به گروه کنترل نشان داد. در گروه ALA (۵۰ میکرومولار) + کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)، ALA توانست اثرات کادمیوم کلراید را بهبود بخشد و میزان ظرفیت TAC را نسبت به گروه کادمیوم کلراید به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) افزایش دهد و به حد گروه کنترل برساند. تفاوت معنی‌داری در میزان TAC اسپرم‌های تیمار شده با ALA (۵۰ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار ۸).



نمودار ۸: ارزیابی میزان ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی (TAC) اسپرم‌های انسان در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت Mean±SD نشان داده شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌هم می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n= ۶ برای هر گروه، p<۰/۰۵).

۵- بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کادمیوم کلراید به‌عنوان یک فلز سنگین و یک آلاینده زیست محیطی باعث کاهش قابلیت تحرک، حیات، تمامیت غشای پلاسمایی، تمامیت آکروزوم و افزایش شکستگی DNA و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در اسپرم‌های انسان شد و ALA توانست با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود اثرات مخرب کادمیوم کلراید بر روی این پارامترهای حیاتی اسپرم را جبران نماید.

مطالعات نشان داده‌اند که افزایش غلظت فلزات سنگین از جمله کادمیوم در مایع منی افراد نابارور بیانگر رابطه مستقیم این آلاینده زیست محیطی با ناباروری مردان است (۱۶). بر اساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی قابلیت تحرک و حیات اسپرم از پارامترهای کلیدی در باروری محسوب می‌شوند و اختلال در این پارامترها باروری مردان را به‌شدت به‌مخاطره می‌اندازد (۱۷). در توافق با نتایج قبلی ما بر روی اسپرم موش و قوچ، کادمیوم کلراید موجب کاهش قابلیت تحرک و حیات اسپرم‌ها شد (۱۹، ۱۸). میتوکندری یکی از اندامک‌های مهم در تحرک اسپرم انسان می‌باشد که با تولید ATP انرژی لازم برای تحرک و بنابراین حیات اسپرم را فراهم می‌کند (۲۰). مطالعات نشان داده است که میتوکندری اولین اندامی است که تحت تاثیر سمیت کادمیوم قرار می‌گیرد. کادمیوم با آسیب مستقیم بر میتوکندری و مختل نمودن مسیرهای میتوکندریایی باعث کاهش تولیدATP شده که متعاقباً قابلیت تحرک و حیات اسپرم را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، از آن‌جا که کادمیوم قادر است نقش کلسیم در سلول را تقلید کند، بر سر جایگاه‌های اتصال با کلسیم رقابت می‌کند، که ممکن است افزایش این فلز سنگین در سلول باعث راه‌اندازی بسیاری از مسیرهای وابسته به کلسیم شود. به‌علاوه، کادمیوم با اثر مستقیم بر روی کانال‌های یونی ازجمله پمپ Na/k ATPase و ایجاد اختلال در عملکرد آن‌ها باعث تجمع سدیم در داخل سلول شده و در نتیجه موجب معکوس شدن عملکرد پمپ سدیم-کلسیم می‌شود. این امر به‌نوبه خود تجمع بیش از اندازه سطح کلسیم در داخل سلول و میتوکندری را به‌دنبال دارد که متعاقباً باعث مختل شدن عملکرد میتوکندری و کاهش قابلیت حیات اسپرم می‌شود (۲۱).

یکی دیگر از مکانیسم‌های مطرح در خصوص سمیت ناشی از کادمیوم القای استرس اکسیداتیو در سلول می‌باشد. بنابراین این امکان وجود دارد که کادمیوم با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و غیرفعال کردن آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی باعث القای استرس اکسیداتیو در اسپرم‌ها شده باشد (۲۲). این احتمال وجود دارد که استرس اکسیداتیو با افزایش پراکسیداسیون غشای میتوکندری، تمامیت غشای میتوکندری را مختل کرده و با آزاد نمودن فاکتورهای آپوپتوژنیک از جمله سیتوکروم c و فاکتور القاکننده آپوپتوزیس (Apoptosis inducing factor: AIF) از میتوکندری باعث افزایش شکستگی DNA، القای آپوپتوزیس و کاهش قابلیت حیات اسپرم شده باشد (۲۳). در این خصوص مطالعه قبلی ما نشان داد که کادمیوم موجب القای شکستگی DNA و آپوپتوزیس در اسپرم‌های انسان شد (۲۴).

کادمیوم ممکن است با افزایش کلسیم داخل سلولی و تقلید نقش این یون آندونوکلئازهای وابسته به کلسیم که باعث تکه تکه شدن DNA می‌شوند را فعال کند. علاوه بر این، افزایش سیتوزولی سطح کلسیم و تجمع آن در میتوکندری می تواند با اختلال در عملکرد منافذ انتقالی نفوذپذیری میتوکندری (mitochondrial permeability transition pore: MTP)، عوامل آپوپتوژنیک مانند فاکتور القاکننده آپوپتوزیس (AIF) و اندونوکلئاز G از میتوکندری را آزاد نماید. جابجایی این پروتئین‌ها به هسته باعث تکه تکه شدن DNA می‌شود (۲۵).

القای استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم احتمالاً می‌تواند به‌عنوان یکی از فرضیه‌های مطرح در خصوص اختلالات ایجاد شده در تمامیت غشای پلاسمایی و القای زودرس واکنش آکروزومی نیز باشد. کادمیوم با القای استرس اکسیداتیو موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌شود که با افزایش سطح MDA، کاهش ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی اسپرم (که با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل و فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانتی مشخص می‌شود) قابل تشخیص است (۲۶). بنابراین در پژوهش حاضر این احتمال وجود دارد که کادمیوم کلراید با القای استرس اکسیداتیو توانسته است اثرات سمی خود را بر روی غشای پلاسمایی و آکروزوم و سایر پارامترهای حیاتی اعمال نموده باشد.

نتایج ما نشان داد که کادمیوم کلراید باعث افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در اسپرم‌ها شد. این نتایج می‌تواند احتمال این‌که اثرات سمی کادمیوم کلراید بر روی پارامترهای اسپرم از طریق استرس اکسیداتیو القا شده باشد را افزایش می‌دهد. اگر این فرضیه درست باشد، کاربرد یک آنتی‌اکسیدانت می‌تواند اثرات منفی کادمیوم کلراید بر روی این پارامترها را برعکس نماید. نتایج ما نشان داد که در گروه کادمیوم کلراید + ALA، ALA نه تنها توانست اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر روی این پارامترها جبران نماید بلکه همچنین توانست پراکسیداسیون لیپید را کاهش و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی را افزایش دهد. بنابراین این نتایج ممکن است تایید کند که کادمیوم کلراید اثرات سمی خود را بر روی این پارامترها به وسیله القای استرس اکسیداتیو و همچنین تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانتی اسپرم اعمال کرده باشد.

ALA یک ترکیب آنتی‌اکسیدانتی گوگردی است که دارای خواص مهار مستقیم رادیکال‌های آزاد است. اثر آنتی‌اکسیدانتی ALA را می‌توان به توانایی آن در مهار مستقیم گونه‌های اکسیژن فعال، توانایی کیلاسیون یون‌های فلزی و بازیابی آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی نسبت داد. علاوه بر خواص آنتی اکسیدانتی، ALA سایر آنتی‌اکسیدانت‌های قوی مثل ویتامین C، ویتامین E، گلوتاتیون و کوآنزیم Q را نیز بازسازی می‌کند (۲۷). اگرچه مکانیسم دقیق آن شناخته شده نیست اما پیشنهاد می‌شود که ALA ترکیبات تیول یا گوگرد را که بعضی پروتئین‌ها برای انجام دادن وظایفشان از دست داده‌اند، را برای آن‌ها فراهم می‌کند و سبب بازسازی آن‌ها می‌شود. ALA همچنین می‌تواند بیان پروتئین کینازC و پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK) را که آنزیم‌های کلیدی در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ سلولی هستند، را تعدیل کند (۲۸).

در پژوهشی که برروی سلول‌های کبد آلوده به کادمیوم کلراید انجام شده مشخص شده است که کادمیوم سبب نقص در عملکرد گلوتاتیون از طریق غیر فعال کردن مسیر وابسته به فاکتور هسته‌ای E2 (Nrf2) می‌شود. افزودن ALA به سلول‌های تیمار شده با کادمیوم سبب فعال شدن مجدد Nrf2 و بازسازی گلوتاتیون از طریق مسیرهای پایین دست Y-GCL (آنزیم کلیدی برای سنتز گلوتاتیون) می‌شود (۲۹). همچنین ALA یک کوفاکتور اصلی برای بخش E2 کمپلکس آلفا کتواسیددهیدروژناز است و به آن برای کاهش استرس اکسیداتیو میتوکندری کمک می‌کند. ALA، هم‌چنین به‌عنوان یک کوآنزیم مهم در چرخه کربس عمل می‌کند و در تولید انرژی میتوکندری، به‌خصوص در اسپرم که یک سلول متحرک است نقش دارد. در واقع یکپارچگی غشا و تامین انرژی فاکتورهای مهمی هستند که تحرک اسپرم به آن‌ها بستگی دارد. ALA، با کنترل متابولیسم، افزایش آنزیم‌های میتوکندری و افزایش حفاظت در برابر رادیکال‌های آزاد موجب جلوگیری از غیرفعال شدن میتوکندری‌ها می‌شود و در نتیجه تامین میزان انرژی کافی جهت تحرک اسپرم را تضمین می‌کند (۳۰). پیشنهاد شده است که افزودن ALA به محیط کشت سلول در شرایط آزمایشگاه سبب می‌شود که این آنتی‌اکسیدانت یک لایه‌ی محافظ در اطراف غشای سلول به‌واسطه ساختار خاص خود ایجاد کند و باعث حفاظت سلول در مقابل آسیب اکسیدانت‌های خارجی شود. این فرایند به‌صورت غیرمستقیم باعث عدم

شکل‌گیری منافذ و شکست و نفوذ رادیکال‌های آزاد محیطی به‌درون سلول می‌شود و درنتیجه سلول می‌تواند مقادیر بالاتری از حمله رادیکال‌های آزاد را تحمل کند (۳۱).

۶- نتیجه‌گیری

القای استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های مهم آسیب‌زایی کادمیوم کلراید به‌عنوان یک آلاینده زیست محیطی است که می‌تواند اثرات جبران ناپذیری بر سلامت سلول‌ها داشته باشد. مطالعه ما نشان داد ALA به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند اثرات مخرب ناشی از استرس اسیداتیو را جبران نماید. آن‌جا که استرس اکسیداتیو و افزایش مارکرهای اکسیداتیو در بدن و مایع منی یکی از دلایل ناباروری در مردان شناخته شده است، ALA با حمایت مثبت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی سلول می‌تواند به‌عنوان یک داروی کمکی در درمان ناباروری‌های ناشی از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد.

۷- حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه اراک انجام شده است.

۸- تعارض در منافع

نویسندگان مقاله هیچگونه تعارض منافعی ندارند. نتایج این مطالعه مورد تایید همه نویسندگان مقاله می‌باشد.

۹- تشکر و قدردانی

ازمسئولین محترم مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری امید رویان اراک که درتحویل نمونه در این پژوهش ما را یاری نمودند کمال سپاسگزاری را داریم.

۱۰- منابع

1. Li Y, Tao H, Cao H, Wan X, Liao X. Achieving synergistic benefits through integrated governance of cultivated cadmium contamination via multistakeholder collaboration. Nature Communications. 2024;15(1):9817.

2. Liu J, Wang E, Xi Z, Dong J, Chen C, Xu P, et al. Zinc mitigates cadmium-induced sperm dysfunction through regulating Ca2+ and metallothionein expression in the freshwater crab Sinopotamon henanense. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2024;279:109860.

3. Ali W, Ma Y, Zhu J, Zou H, Liu Z. Mechanisms of Cadmium-Induced Testicular Injury: A Risk to Male Fertility. Cells. 2022;1.

4. Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tumer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, et al. Insights on the use of α-lipoic acid for therapeutic purposes. Biomolecules. 2019;9(8):356.

5. Singh U, Jialal I. Retracted: Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. Nutrition reviews. 2008;66(11):646–57.

6. Shaygannia E, Ghandehari-Alavijeh R, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. The protective effects of alpha lipoic acid on human sperm function during freezing-thawing. Cryoletters. 2020;41(6):344–50.

7. Ibrahim SF, Osman K, Das S, Othman AM, Majid NA, Rahman MPA. A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. Clinics. 2008;63:545–50.

8.Sanità O mondiale della. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization; 2010.

9. Marchiani S, Tamburrino L, Farnetani G, Muratori M, Vignozzi L, Baldi E. Acute effects on human sperm exposed in vitro to cadmium chloride and diisobutyl phthalate. Reproduction (Cambridge, England). 2019 Sep;158(3):281–90.

10. Sutradhar BC, Park J, Hong G, Choi SH, Kim G. Effects of trypsinization on viability of equine chondrocytes in cell culture. Pak Vet J. 2010;30(4):232–8.

11. Zhang Y, Xie QX, Pan SP, Zhang CX, Xiao LJ, Peng YL. Comparison of three methods for evaluating acrosome reaction in human spermatozoa. Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology. 2005;11(6):419–21.

12. Modica-Napolitano JS, Aprille JR. Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. Cancer research. 1987;47(16):4361–5.

13. Zhang Y, Li S, Li S. Relationship between cadmium content in semen and male infertility: a meta-analysis. Environmental science and pollution research. 2019;26:1947–53.

14. Sati L, Huszar G. Sperm motility and viability: overview of the cellular and physiological aspects that support these functions. eur med j. 2015;1:74–80.

15. Khavari A, Momeni HR, Khodaee M, Choobineh T. The effect of silymarin on motility and viability of ram sperm treated with cadmium. 2013;32.

16. Momeni HR, Chehrei S, Atabaki Z, Eskandari N. Study of the effect of curcumin on sperm parameters dysfunction induced by cadmium in mice. Pajoohandeh Journal. 2015;20(2):54–62.

17. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. International journal of andrology. 2012;35(2):109–24.

18. Mao W, Zhang N, Zhou F, Li W, Liu H, Feng J, et al. Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells. Human & Experimental Toxicology. 2011 Aug;30(8):920–9.

19. Li R, Luo X, Li L, Peng Q, Yang Y, Zhao L, et al. The protective effects of melatonin against oxidative stress and inflammation induced by acute cadmium exposure in mice testis. Biological trace element research. 2016;170(1):152–64.

20. Ge J, Zhang C, Sun YC, Zhang Q, Lv MW, Guo K, et al. Cadmium exposure triggers mitochondrial dysfunction and oxidative stress in chicken (Gallus gallus) kidney via mitochondrial UPR inhibition and Nrf2-mediated antioxidant defense activation. Science of the Total Environment. 2019;689:1160–71.

21. Etemadi T, Momeni HR, Ghafarizadeh AA. Impact of silymarin on cadmium-induced apoptosis in human spermatozoa. Andrologia. 2020;52(11):e13795.

22. Wang S, Ren X, Hu X, Zhou L, Zhang C, Zhang M. Cadmium-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial oxidative stress and the JNK signaling pathway in TM3 cells, a model of mouse Leydig cells. Toxicology and applied pharmacology. 2019;368:37–48.

23. El-Taieb MA, Ali MA, Nada EA. Oxidative stress and acrosomal morphology: A cause of infertility in patients with normal semen parameters. Middle East Fertility Society Journal. 2015;20(2):79–85.

24. Lee SR, Jeong MH, Lim SY, Hong SN, Kim KH, Sohn IS, et al. The effect of alpha lipoic acid (Thioctacid HR®) on endothelial function in diabetic and hypertensive patients. Korean circulation journal. 2006;36(8):559–64.

25. Ajith TA. Alpha-lipoic acid: A possible pharmacological agent for treating dry eye disease and retinopathy in diabetes. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2020;47(12):1883–90.

26. Zhang J, Zhou X, Wu W, Wang J, Xie H, Wu Z. Regeneration of glutathione by α-lipoic acid via Nrf2/ARE signaling pathway alleviates cadmium-induced HepG2 cell toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2017;51:30–7.

27. Ghandehari Alavijeh R, Shaygannia E, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Effect of alpha-lipoic acid antioxidant on sperm parameters and treatment of infertile men. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2020;30(1):16–24.

28. Haghighian HK, Haidari F, Mohammadi-Asl J, Dadfar M. Randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial examining the effects of alpha-lipoic acid supplement on the spermatogram and seminal oxidative stress in infertile men. Fertility and sterility. 2015;104(2):318–24.