ORIGINAL ARTICLE

The Protective Effect of Melatonin on Sperm Morphology and Histology of the Rat Testis Damage Induced by Cadmium Chloride

Masoumeh Sobhani[1],
Amrollah Rouzbehi[2],
Reza Mahmoodi[2],
Zahra Sobhani[3]

[1] MSc Student in Anatomy, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[2] Associate Professor, Department of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[3] MSc in Bioinformatics, Deputy of Research and Technology, Ministry of Health and Medical Education,

(Received January 28, 2014 ; Accepted April 5, 2015)

Abstract

Background and purpose: Cadmium, increases free radical production in cells and cell tissue damage. The best way to deal with this problem is increasing antioxidants. Melatonin has hydrophilic and lipophilic properties and can pass through cell membrane and reduces oxidative damage to lipids and aqueous environments which is acknowledged in different studies more than other antioxidants.

Materials and methods: Sixty four male Wistar rats (6-8 week old) were divided into 8 groups (two control groups and six experimental groups, n=8 per group). Group I, II, and III were injected with melatonin 10, 15, and 20 mg/kg/i.p./daily for 30 days, respectively. Group IV received cadmium chloride 2 mg/kg/i.p./daily/30 days. Group, V, VI, and VII were injected with cadmium chloride 2 mg/kg and melatonin 10, 15, and 20 mg/Kg /i.p./daily for 30 days, respectively. Group VIII received i.p. injection of physiological solution. Finally, testicular volume and weight measurements and cell counts were performed.

Results: Results showed a significant reduction in germinal layer thickness and number of germ cells in the group receiving cadmium chloride ($P < 0.05$) and this was significantly different between the groups receiving melatonin to increase the layer thickness and the number of germ cells ($P < 0.05$). Between the groups that received both drugs significant differences were seen in the group injected with melatonin 20 mg/Kg ($P < 0.05$).

Conclusion: The present study showed that melatonin could improve the sperm parameters and thickness of germinal layer, thereby boosting male rats' fertility.

Keywords: Sperm parameters, cadmium chloride, melatonin, antioxidants

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(123): 32-44 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۳ فروردین سال ۱۳۹۴ (۴۴-۳۲)

بررسی اثر محافظتی ملاتونین بر مورفولوژی اسپرم و بافت شناسی بیضه موش صحرائی در آسیب القاء شده با کلرید کادمیوم

معصومه سبحانی[۱]
امرالله روزبهی[۲]
رضا محمودی[۲]
زهرا سبحانی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: کادمیوم سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده به سلول‌ها آسیب می‌رساند. بهترین راه مقابله، افزایش آنتی‌اکسیدان می‌باشد. ملاتونین باخواص لیپوفیلیک و هیدروفیلیک که دارد به سرعت از غشائ بیولوژیک عبور و وارد اجزای درون سلولی شده و تخریب اکسیداتیو را در محیط‌های آبی و چربی کاهش می‌دهد و این ویژگی نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نقطه قوت آن در مطالعات است.

مواد و روش‌ها: ۶۴ سر موش صحرایی ویستار ۶ تا ۸ هفته به ۸ گروه ۸ تایی تقسیم شده وگروه‌ها داروها را به صورت تک دوز بر حسب mg/kg به روش داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز، روزانه دریافت نمودند. مقدار داروی تزریقی در گروه‌ها بدین شکل بود که گروه یک ۱۰، دو ۱۵ و سه mg/kg ۲۰ ملاتونین، چهار mg/kg ۲ کلریدکادمیوم، پنج mg/kg ۲ کلریدکادمیوم همراه با mg/kg ۱۰ ملاتونین، شش mg/kg ۲ کلریدکادمیوم همراه با mg/kg ۱۵ ملاتونین، هفت mg/kg ۲ کلریدکادمیوم همراه با mg/kg ۲۰ ملاتونین دریافت کردندوگروه هشت محلول فیزیولوژیک دریافت نمودند. حجم بیضه ها ، وزن و شمارش سلول‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: کاهش معنی داری درضخامت لایه ژرمینال و تعداد سلولها در گروه کلریدکادمیوم (p<۰/۰۵) و این تفاوت معنی دار در گروه ملاتونین در جهت افزایش ضخامت لایه ژرمینال و تعداد سلول‌ها (p<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل و در گروه دریافت کننده هر دو دارو همزمان تفاوت معنی دار بخصوص در گروه دریافت کننده ۲۰میلیگرم ملاتونین نسبت به گروه دریافت کننده کادمیوم به تنهائی بود (p<۰/۰۵) .

استنتاج: ملاتونین پارامترهای اسپرم و ضخامت لایه ژرمینال را بهبود و باروری را افزایش می‌دهد.

واژه های کلیدی: پارامترهای اسپرم، کادمیوم کلرید، ملاتونین، آنتی اکسیدان

مقدمه

با وجود ضروری بودن اکسیژن، اکسیژن مولکولی و مشتقات آن نظیر رادیکال هیدروکسیل (OH) آنیون و سوپراکساید (O2) بر عملکرد و ساختار بیوشیمیایی سلول‌ها تاثیر منفی می گذارد و بقاء موجود زنده را در

مولف مسئول: معصومه سبحانی– شیراز: چهارراه آبیاری، جنب سوپر کیانی، پلاک۶ E-mail: masoumeh.sobhani@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
۲. دانشیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
۳. کارشناس ارزشیابی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۱/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۱/۱۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱/۱۵

معرض خطر جدّی قرار می‌دهد. به همین علت اکسیژن را نوعی تیغ دو لبه در نظر می‌گیرند. مجموعه متابولیت‌های اکسیژن با نام انواع اکسیژن فعال[1] (ROS)، به عنوان یکی از عوامل ایجاد ناباروری یا عقیمی در انسان مطرح می‌باشند(۵-۱). در شرایط طبیعی به منظور جمع‌آوری و سپس خنثی‌سازی ROS در داخل و خارج سلول آنتی‌اکسیدان‌ها وارد عمل می‌شوند. سلول‌های اسپرم در طی روند اسپرماتوژنز مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را همراه مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از دست داده و بدین‌ترتیب در مقابل روند استرس اکسیداتیو[6](OS) حساس می‌گردند، اما به علت غوطه‌وری در مایع اسپرمی که محتوی آنتی‌اکسیدان‌های فراوانی نظیر اسید اسکوربیک، اورات‌ها، تورین، گروه‌های سولفیدریلی، تیولی، کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز است، به خوبی در مقابل روند استرس اکسیداتیو OS محافظت می‌گردند. در سال‌های اخیر نیز ثابت شده است که در پلاسمای مایع اسپرمی مردان نابارور مقدار کم‌تری از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها در مقایسه با مردان بارور وجود دارد(۸-۶).

سلول‌های اسپرم به علت دارا بودن مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء برای دریافت استرس اکسیداتیو OS بسیار مستعد می‌باشند. بدین ترتیب که واحدهای چربی در غشاء سلول که به راحتی دچار اکسیداسیونی موسوم به پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود با عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها تعدیل و یا خنثی می‌گردد. روند استرس اکسیداتیوOS موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در سلول‌های اسپرم شده و لذا به عنوان یکی از عوامل مهم بروز ناباروری در مردان مطرح می‌باشد(۷،۶،۳،۲،۱). کادمیوم تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در سلول القاء نموده و افزایش می‌دهد. از سوی دیگر کادمیوم با کاهش آنتی‌اکسیدان‌های درون سلول و برهم زدن تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل اکسیدکننده سلولی، به مولکول‌های حیاتی همانند آنزیم، پروتئین و لیپید غشایی آسیب می‌رساند(۹). مکانیسم اثر سمّی کادمیوم کاملاً مشخص نمی‌باشد. گفته می‌شود که این ترکیب از طریق ایجاد پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع موجب اختلال در فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها و در نتیجه باعث وقفه در سنتز پروتئین و اختلال در متابولیسم لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای امینه می‌شود(۱۱،۱۰). کلرید کادمیوم و کلرید جیوه قابلیت نفوذ اسپرم به موکوس دیواره را کاهش می‌دهند(۸). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تماس اسپرم با فلزات سنگین باعث کاهش شدید پارامترهای حرکتی اسپرم شده و غلظت های زیاد این فلزات در کم‌تر از یک دقیقه باعث توقف کامل حرکات اسپرم می‌شود(۱۳،۱۲). کادمیوم در جوامع امروزی پراکندگی گسترده‌ای دارد. این فلز یکی از فلزات سنگین است که در صنایع گالوانیزه، رنگرزی، پلاستیک‌سازی و باطری‌سازی به صورت گسترده مصرف می‌شود. ترکیبات این فلز از آلاینده‌های محیط زیست به شمار می‌آیند و آثار سمّی این فلز سنگین بر دستگاه تولید مثلی به اثبات رسیده است(۱۴،۱۳). نتایج بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که در میان آنتی‌اکسیدان‌های موجود ملاتونین یا ایندول آمین مترشحه از غده‌ی پینه آل به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد مطرح می‌باشد. بر خلاف برخی آنتی‌اکسیدان‌ها ملاتونین وارد چرخه احیا یعنی توانایی مولکول در اکسید و احیا شدن متوالی نمی‌شود. چرخه احیا ممکن است به سایر اکسیدان‌ها مانند ویتامین‌ها امکان دهد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را مجدداً به دست آورند اما ملاتونین وقتی اکسید شد نمی‌تواند احیا شده و به حالت قبل باز گردد زیرا بسته به واکنش با رادیکال آزاد شکل پایدار و محصول نهایی به خود می‌گیرد. بنا براین، ملاتونین یک آنتی‌اکسیدان نهایی یا انتحاری نامیده می‌شود(۱۶،۱۵).

1. Reactive oxygen space (ROS)
2. Oxidative stress

ملاتونین فاکتورهای استرس همچون کورتیکواستروئیدهای مترشحه از غدد فوق کلیوی را که استرس‌زا هستند کنترل و نابود می‌کند. ملاتونین از طریق سیستم عصبی مرکزی یک نقش حفاظتی ضد استرس برای بافت مخاطی معده ایفاء می‌کند. اسید امینه تریپتوفان، پیش ماده ملاتونین (هورمون عصبی)، سروتونین و ویتامین نیاسین (حاملان شیمیایی اطلاعات از یک سلول عصبی به سلول دیگر از طریق سیناپس‌ها) است. از آن‌جاکه کورتیزول باعث کاهش تریپتوفان و در نتیجه کاهش سروتونین و ملاتونین می‌شود، میزان تریپتوفان هنگام استرس کاهش می‌یابد. هورمون آدرنالین بازیگر مقابل ملاتونین و هورمون انرژی است و در تمام شرایط انرژی و نیروی مورد نیاز بدن را تامین می‌کند. در حالی که ترشح آدرنالین، فشارخون، ضربان قلب و مصرف قند را افزایش می‌دهد، ملاتونین با این مصرف بالای انرژی مقابله کرده، هورمون‌های استرس و فشارخون را کاهش می‌دهد و بدین ترتیب بدن را در برابر استرس محافظت می‌نماید(۱۷). هم‌چنین ملاتونین از تاثیرات رادیکال‌های ازاد شده توسط کلرید کادمیوم جلوگیری می‌نماید. میزان بالای ملاتونین در بدن از بروز پدیده پیری جلوگیری می‌کند چرا که ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و جمع کننده‌ی رادیکال‌های آزاد دارای نقش حفاظتی برای سلول‌های عصبی و نورون‌ها می‌باشد. قدرت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بیش‌تر از قدرت آنتی اکسیدانی ویتامین E,C و A است چرا که این هورمون در فاز آبی و چربی محلول است، درحالی که ویتامین E و A تنها در فاز چربی محلول هستند. افزایش ترشح و تولید ملاتونین باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان توتال در بدن می‌شود. ملاتونین و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها به سالم ماندن عضله‌ی قلب کمک بسیاری می‌کنند. هدف از انجام این مطالعه تعیین تأثیرات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بر میزان تحرک و تعداد اسپرم‌ها، مور فولوژی لوله‌های منی ساز و تعداد سلول‌های زایا در موش صحرایی نابارور شده با کلرید کادمیوم می‌باشد. باتوجه به شواهد متعدد در خصوص نقش مؤثر ملاتونین در تنظیم اختلالات اکسیداتیو، در این مطالعه تأثیر ملاتونین در دوز سوپرا فیزیولوژیک به طور درازمدت در پیشگیری از عوارض ناشی از کلرید کادمیوم بر آسیب‌های بیضه‌ای بررسی شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۶۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای خریداری شده از انسیتو رازی شیراز استفاده شد. موش‌ها پس از انتقال از شرایط حیوانخانه‌ای طبق استانداردهای شناخته شده (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، از آب و غذای کافی طبق دستورالعمل صادره در مورد حیوانات آزمایشگاهی (متد دانشگاه هیوگو)[1] برخوردار بودند. دلیل استفاده از موش صحرایی نژاد ویستار این بود که در این نژاد از موش‌های صحرایی دوره اسپرماتوژنز کوتاه (۳۰ روز) می‌باشد. حیوانات به ۸ گروه ۸ تایی تقسیم شدند (دو گروه کنترل وشش گروه تجربی) و درشرایط نوری طبیعی و رطوبت محیط قرار گرفتند. آب و غذا در اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت. موش‌ها با ترازوی دیجیتال وزن کشی‌شده و وزن آن‌ها یادداشت می‌شد. محدوده وزنی موش‌ها بین ۲۵۵ تا ۳۱۳ گرم بود. موش‌های هم وزن در یک قفس قرار گرفته و برای آن‌ها کارت شناسایی تهیه گردید که روی قفس‌ها چسبانده می‌شد. هر کارت شناسایی شامل شماره موش، وزن موش، مقدار ماده تزریق شده (در صورت لزوم)، سن موش (۶ تا ۸ هفته) و تاریخ‌های شروع تزریق بود.

موش‌های صحرایی نری که برای بررسی اثر ملاتونین مورد بررسی قرار گرفتند، به شرح زیر تقسیم‌بندی گردیدند: گروه اول (G1) دوز واحد روزانه ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز، گروه دوم (G2) دوز واحد

1. University of Hyogo

روزانه ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز، گروه سوم (G3) با دوز واحد روزانه ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز و گروه چهارم (G4) به عنوان گروه کنترل مثبت دوز واحد روزانه ۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم کادمیوم را به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. گروه پنجم (G5) دوز واحد روزانه ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم کادمیوم به صورت داخل صفاقی همراه با دوز واحد روزانه ۱۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز، گروه ششم (G6) دوز واحد روزانه ۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم کادمیوم به صورت داخل صفاقی همراه با دوز واحد روزانه ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز، گروه هفتم (G7) دوز واحد روزانه ۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم کادمیوم به صورت داخل صفاقی همراه با دوز واحد روزانه ۲۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم ملاتونین به صورت داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز و گروه هشتم (G8) به عنوان گروه کنترل منفی فقط محلول فیزیولوژیک به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. قابل ذکر است که جهت حل کردن پودر ملاتونین و کادمیوم از محلول نرمال سالین استفاده گردید. بعد از ۳۰ روز تزریق بر روی حیوانات (به علت دوره اسپرماتوژنز ۳۰ روزه در موش‌های صحرایی) بیهوشی عمومی توسط اتر انجام گرفت. سپس برش‌های لازم جهت جدا کردن اپیدیدیم و وازدفران داده شد و ۲۰ میکرولیتر منی با فشار ملایم از انتهای اپیدیدیم خارج شده و با ۲۰ سی‌سی محلول نرمال سالین که در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود، رقیق گردید. بلافاصله پس از این مرحله، این محلول توسط لوله‌های موئین روی لام‌هایی که قبلاً روی صفحه گرم به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بودند، منتقل گردید و بلافاصله میزان تحرک اسپرم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای شمارش اسپرم‌ها از لام نئوبار و محلول فیکس و رقیق کننده استفاده گردید. بر اساس این که برای شمارش اسپرم از چه رقّتی استفاده شود از مربع‌های مختلف در شمارش اسپرم استفاده می‌شود. مثلاً اگر مایع منی را ۱:۲۰ یا ۱:۵ رقیق نماییم از مربع شماره ۵ (و در موارد لزوم از مربع‌های ۶ و ۴) استفاده می‌شود، در حالی که اگر مایع منی ۱:۲ رقیق شود همه مربع‌ها (۱ تا ۹) در شمارش منظور می‌گردند. در هنگام شمارش فقط اسپرم‌هایی شمارش می‌شوند که دارای سر و دم هستند (اسپرم کامل). مرز هر کدام از مربع‌های ۹ گانه دارای سه خط می‌باشد. در صورتی که سر اسپرم داخل مربع یا روی دو خط داخلی حاشیه آن باشد آن اسپرم را در شمارش منظور می‌نماییم. در این تحقیق از رقت 1:20 استفاده شد(۱۹).

زنده بودن اسپرم‌ها

جهت تعیین زنده بودن اسپرم‌ها از رنگ ائوزین نیگروزین[1] استفاده شد. استفاده از نیگروزین در این روش باعث می‌شود که کنتراست بین سر اسپرم و زمینه لام بیش‌تر شده و لذا اسپرم‌ها را بتوان بهتر تشخیص داد. همچنین با این رنگ‌آمیزی می‌توان لام‌ها را بایگانی نمود تا در صورت لزوم برای ارزیابی مجدد و کنترل کیفی مورد استفاده قرار گیرند.

بررسی حرکت اسپرم

از یک سیستم درجه بندی بر اساس تحرک اسپرم استفاده شد. در این سیستم حداقل ۵ میدان میکروسکوپی بررسی می‌گردد. در این روش جهت طبقه‌بندی ۲۰۰ اسپرماتوزوآ بررسی می‌شود. تحرک هر اسپرماتوزوآ به صورت a، b، c ، و d بر حسب این که چه تحرکی را نشان دهد به صورت ذیل درجه‌بندی می‌گردد:

a: تحرک پیشرونده سریع

b : تحرک پیشرونده کند یا آهسته

c : تحرک بدون پیشروندگی

d : عدم تحرک.

1. Eosin-nigrosin

ابتدا اسپرم‌های با درجه a و b (اسپرم های با تحرک سریع وپیشرونده) و سپس درجه c و d (اسپرم های بدون پیشروندگی و بی تحرک) شمارش شدند. مقدار نمونه برداشت شده ۱۰ میکرولیتر بود و از هر نمونه ده لام تهیه و بررسی انجام شد(۲۰).

به منظور اندازه گیری حجم بیضه، بیضه سمت چپ را از حفره شکم خارج کرده و توسط سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده و با استفاده از یک استوانه مدرج ۱۰ میلی‌لیتری که به مقدار ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی در آن ریخته شده بود حجم بیضه‌ها اندازه‌گیری شدند. به طور معمول، اندازه‌گیری وزن بر اساس واحد گرم است که نیازمند تبدیل به یک واحد حجم مانند میلی متر مکعب است. سپس به وسیله کولیس caliper digital 150mm قطر کوچک و بزرگ بیضه‌ها اندازه‌گیری شدند(۲۱) نمونه بیضه‌ها که در حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم بودند هر کدام در یک ظرف پتری که از قبل در آن‌ها حدود ۲ میلی لیتر Ham's F10 medium ریخته شده بود، قرار داده شدند. سپس بیضه‌ها داخل محلول فیکساتیو فرمالدئید ۱۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق غوطه ور شدند. برای ارزیابی لوله های سمی نیفروس پس از گذشت سه روز از ثابت نمودن و اطمینان از ثبوت بافتی بیضه‌ها، نمونه‌ها پا ساژ بافتی شدند. به منظور مطالعه با پاساژ از اتانول با درجات صعودی، گزیلن و پارافین مذاب استفاده شد. برای به حداکثر رساندن تعداد برش‌های مناسب لوله‌های سمی نیفروس در مقطع عرضی، بیضه‌ها در جهت محور طولی در پارافین قالب‌گیری شدند. در هنگام انتخاب مقطع‌گیری برش‌های مناسب لوله‌های سمی نیفروس در مقطع عرضی، بیضه‌ها پس از این که ثبوت بافتی پیدا کردند، جهت تهیه برش مناسب از قانون isotropic and uniform random,IUR sections استفاده گردید. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوّار مقاطعی به ضخامت بیست و پنج میکرون تهیه شد(۲۲). از هر بیضه حدود ۲۰۰ برش سریال تهیه و با تناوب یک به ده ۲۰ برش بر روی اسلاید قرار گرفته و به طریقه هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور مطالعه بلوغ و کیفیت لوله‌های سمی نیفروس از روش جانسون استفاده می‌شود(۲۰). جدول جانسون بلوغ و به عبارتی دیگر کیفیت لوله‌ها را نشان می دهد. این جدول دارای نمره‌بندی ۱ تا ۱۰ است.

ارزیابی کمّی پارامترهای لوله سمی نیفروس

جهت ارزیابی کمّی پارامترهای لوله سمی نیفروس (اندازه‌گیری تفاوت قطر)، از میکروسکوپ invert مدل DPI و نرم‌افزار اندازه گیری اقطاراستفاده شد. از هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ لوله سمی نیفروس در مقطع عرضی گرد و یا تقریباً گرد انتخاب و مطالعه شدند. لوله‌هایی که بیضوی بودند یا برش مایل داشتند مورد مطالعه قرار نمی‌گرفتند. اقطار لوله‌های سمی نیفروس، یعنی از غشاء پایه یک طرف لوله تا غشاء پایه طرف دیگر لوله، براساس میکرومتر محاسبه گردید. ابتدا دو قطر عمود بر هم محاسبه و سپس میانگین اقطار در هر لوله محاسبه شد. هم‌چنین به طریق مشابه، میانگین قطر مجرای داخل لوله سمی نیفروس و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال براساس میکرومتر محاسبه گردید(۲۳).

یافته ها

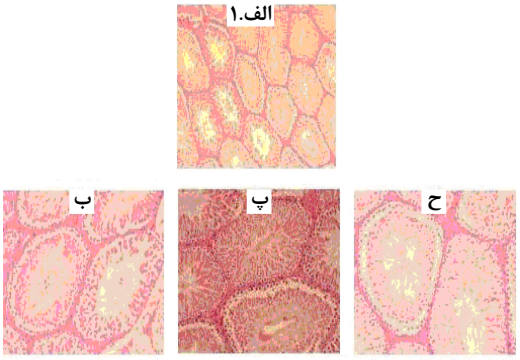
نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه کنترل که فقط محلول فیزیولوژیک به صورت داخل صفاقی دریافت می کردند اسپرماتوژنز فعال در لوله‌های سمی نیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد در این لوله‌ها اپیتلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود (جدول شماره ۱). در گروه۴ که تحت درمان روزانه با *mg/kg* ۲ کلرید کادمیوم بودند، تخریب اسپرماتوژنز به وضوح قابل مشاهده بود. در اغلب لوله‌ها تعداد زیادی از سلول‌های زایا از بین رفته بودند و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال به

جدول شماره ۱: میانگین وانحراف‌معیار تعداد سلول‌های اسپرم دراپیدیدیم چپ، تحرک اسپرم در اپیدیدیم چپ، ضخامت اپیتلیوم، قطر لوله اسپرم‌ساز (میکرون) در گروه‌های مختلف

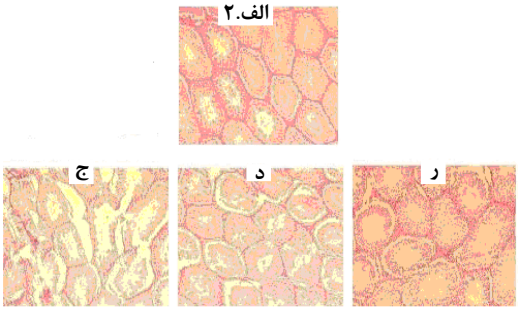
متغیر	وزن بدن (گرم)	وزن بیضه (گرم)	حجم بیضه cm^3	تعداد اسپرم دراپیدیدیم چپ (10^6)	تحرک اسپرم دراپیدیدیم چپ (درصد)	ضخامت اپیتلیوم (درصد)	قطر لوله (میکرون)
کنترل	۲۹۵/۸۸±۷/۶۴	۰/۰۳±۱/۸۵	۰/۲۴۲±۵/۶۷	۳/۹۱±۲۲۲/۸۹	۳/۷۷±۹۳/۳۲	۰/۵۲±۹۴/۹۸	۱/۶۲±۳۴۲/۵۹
ملاتونین 10mg	۲۹۵/۴۲±۸/۰۴	۰/۰۳±۱/۸	۰/۲۴±۵/۶۹	۲/۵۲±۲۳۷/۲۱	۲/۹۸±۸۷/۳۳	۰/۵۸±۹۵	۱/۸۲±۳۴۹/۷۳
ملاتونین 15mg	۲۹۶/۴۲±۸/۰۴	۰۲۹۰±۱/۸۱	۰/۲۴۰±۵/۶۹	۲/۵۲±۳۵۷/۵۵	۹۸/۲±۸۶/۹۳	۰/۴۷۵±۹۵/۶۱	۱/۸۲±۳۵۱/۱۲
*ملاتونین 20mg	۲۹۶/۴۲±۸/۰۴	۰/۰۲۹±۱/۸۳۲	۰/۲۴۴±۵/۶۸۶	۲/۵۲±۵۱۸/.۰۴۹*	۲/۹۸±۹۳/.۳۸*	۰/۴۷۵±۹۷/۰۲*	۱/۸۲±۳۴۸/۵۲
*کلرید کادمیوم 2mg	۲۹۵/۸۸±۷/۶۷	۰/۰۲۶±۱/۸۰	۰/۲۴۴±۵/۴۱۵	۲/۵۲±۳۵/۶۰۲*	/۹۸±۴۵/۷۳۳*	۰/۵۱۵±۶۸/۷*	۱/۶۲±۳۴۷/۱۶۲
*ملاتونین 10mg و کلرید کادمیوم 2mg	۲۹۵/۸۸±۷/۶۷	۰/۰۲۶±۱/۸۵	۰/۲۴۴±۵/۴۸۵	۲/۵۲±۴۵/۶۰۲	۲/۹۸±۴۵/۷۳۳	۰/۵۱۵±۷۸/۷۹	۱/۶۲±۳۴۷/۱۶۲
*ملاتونین 15mg و کلرید کادمیوم 2mg	۲۹۴/۴۲±۸/۰۴	۰/۰۲۶±۱/۸۶	۰/۲۴۴±۵/۴۸۵	۲/۵۲±۵۷/۵۷۵	۲/۹۸±۶۳/۴۰۵	۰/۴۷۵±۸۴/۵۴	۱/۸۲±۳۵۰/۶۵۳
*ملاتونین 20mg و کلرید کادمیوم 2mg	۲۹۴/۴۲±۸/۰۴	۰/۰۲۶±۱/۸۶	۰/۲۴۴±۵/۴۸۵	۲/۵۲±۵۸/۵۷۵	۲/۹۸±۶۴/۴۰۵	۰/۴۷۵±۸۶/۸۴	۱/۸۲±۳۵۰/۶۵۳
سطح معنی داری	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۵	<۰/۰۰۰۱

* شانه اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل است (p <۰/۰۵).

طور معنی‌داری کاهش یافته بود (جدول شماره ۱). در گروه ۱ (تصویر شماره۱- ب) که تحت درمان روزانه با ۱۰ *mg/kg* ملاتونین بودند، تغییرات ریخت‌شناسی خاصی در مقایسه با گروه کنترل (تصویر شماره۱- الف.۱) مشاهده نشد (به‌جز یک تغییر بسیار جزئی در ضخامت لایه ژرمینال)(جدول شماره ۱). درگروه۲ (تصویر شماره۱- پ) که به میزان ۱۵ *mg/kg* روزانه ملاتونین دریافت کرده بودند، تغییرات ریخت‌شناسی حاکی از افزایش ضخامت لایه ژرمینال در مقایسه با گروه کنترل (تصویر شماره۱- الف) بود ولی در قطر لوله‌های سمی نیفروس تغییرات خاصی مشاهده نشد (جدول شماره ۱). در گروه ۳ (تصویر شماره۱- ح) که به میزان ۲۰ *mg/kg* روزانه ملاتونین تزریق شده بود، تعداد اسپرم افزایش یافته و تغییرات ریخت‌شناسی این گروه درمقایسه با گروه‌کنترل (تصویر شماره۱- الف) حاکی از افزایش قابل ملاحظه ضخامت لایه ژرمینال بود اما در قطر لوله‌های سمی نیفروس تغییرات خاصی دیده نشد (جدول شماره ۱). تعداد و تحرک اسپرم در اپیدیدیم چپ به طور معنی‌داری در گروه‌های ۱،۲ و ۳ (تصویرشماره۲- پ،ح،ج) دریافت‌کننده ملاتونین نسبت به گروه کنترل (تصویر شماره۲- الف) افزایش نشان می‌داد (جدول شماره ۱). در گروه ۴ (تصویر شماره۲- ب) که دریافت‌کننده کلرید کادمیوم بودند، کاهش معنی‌داری در تعداد و تحرک اسپرم در اپیدیدیم چپ نسبت به گروه کنترل (تصویر شماره۲- الف) مشاهده شد (جدول شماره ۱) (نمودار شماره ۱و۲و۳و۴). در گروه‌های ۵، ۶ و۷ (تصویر شماره۱- ج،د،ر) که دریافت کننده ملاتونین و کلرید کادمیوم به‌طور همزمان بودند، روند بهبود در ضخامت لایه ژرمینال در مقابل اثرات سوءکلرید کادمیوم به وضوح مشاهده شد و تعداد و تحرک اسپرم در اپیدیدیم چپ (تصویر شماره ۲- د،ر،س) نسبت به گروه ۴ دریافت‌کننده کادمیوم (تصویر شماره۲- ب) به تنهایی افزایش معنی‌داری داشت (جدول شماره ۱) (نمودار شماره ۱و۲و۳و۴). افزایش ضخامت لایه ژرمینال نیز به طور معنی‌داری در گروه‌های ۱،۲و۳ (تصویر شماره ۱- ب،پ،ح) دریافت‌کننده ملاتونین نسبت به گروه کنترل (تصویر شماره۱- الف) مشاهده شد (جدول شماره ۱) (نمودار شماره ۱و۲و۳و۴).



تصویر الف.۱- لوله‌های سمی نیفروس گروه کنترل (بزرگ‌نمایی ۲۰X)
تصویر ب- لوله‌های سمی نیفروس گروه ملاتونین ۱۰ میلی‌گرم (بزرگ‌نمایی ۲۰X)
تصویر پ- لوله‌های سمی نیفروس گروه ملاتونین ۱۵ میلی‌گرم (بزرگ‌نمایی ۲۰X)
تصویر ح- لوله‌های سمی نیفروس گروه ملاتونین ۲۰ میلی‌گرم (بزرگ‌نمایی ۲۰X)

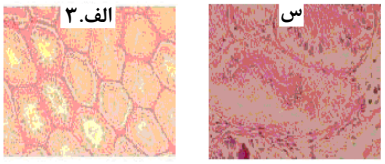


تصویر الف.۲-لوله‌های سمی نیفروس گروه کنترل (بزرگ‌نمایی ۲۰X)

تصویر ج-لوله‌های سمی نیفروس گروه ملاتونین ۱۰میلی گرم و کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم (بزرگ‌نمایی ۲۰X).

تصویر د-لوله‌های سمی نیفروس گروه ملاتونین ۱۵ میلی گرم وکلرید کادمیوم ۲ میلی گرم (بزرگ‌نمایی ۲۰X).

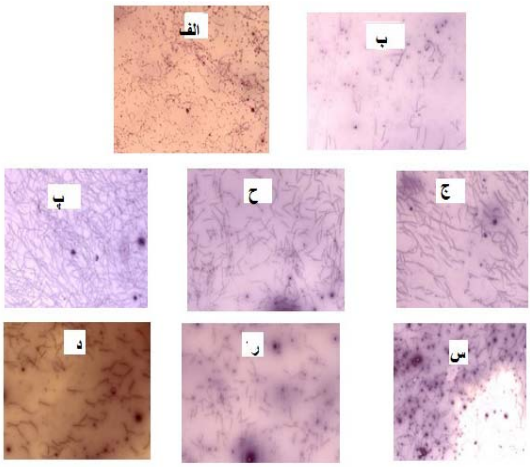
تصویر ر-لوله‌های سمی نیفروس گروه ملاتونین ۲۰ میلی گرم و کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم (بزرگ‌نمایی ۲۰X).



تصویر الف.۳-لوله‌های سمی نیفروس گروه کنترل (بزرگنمایی ۲۰X).

تصویر س-لوله‌های سمی نیفروس گروه کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم (بزرگنمایی ۲۰X).

تصویر شماره ۱: ضخامت اپیتلیوم، قطر لوله اسپرم‌ساز (میکرون) در گروه‌های مختلف



تصویر الف- گروه کنترل

تصویر ب- گروه دریافت کننده کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم

تصویر پ- گروه دریافت کننده ملاتونین ۱۰ میلی گرم

تصویر ح- گروه دریافت کننده ملاتونین ۱۵ میلی گرم

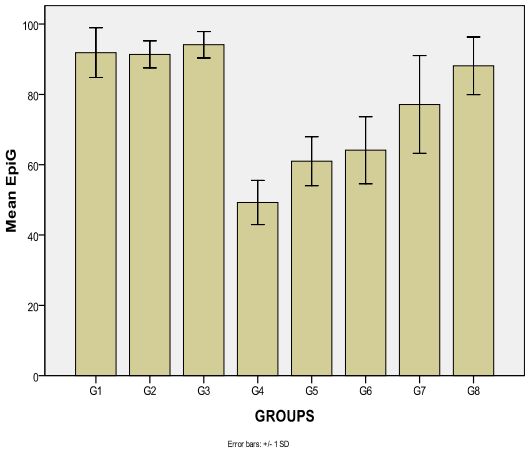
تصویر ج- گروه دریافت کننده ملاتونین ۲۰ میلی گرم

تصویر د- گروه دریافت کننده ملاتونین ۱۰ میلی گرم و کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم

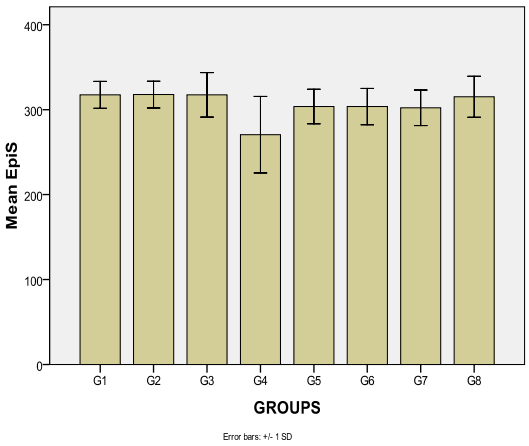
تصویر ر- گروه دریافت کننده ملاتونین ۱۵ میلی گرم و کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم

تصویر س- گروه دریافت کننده ملاتونین ۲۰ میلی گرم و کلرید کادمیوم ۲ میلی گرم

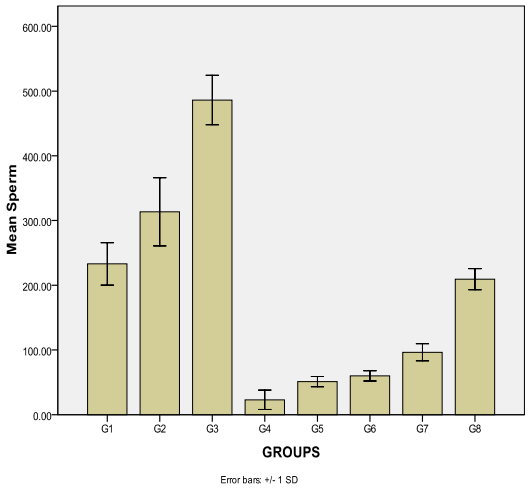
تصویر شماره ۲: تصاویر رنگ‌آمیزی شده توسط رنگ نیگروزین جهت مشاهده تعداد و تحرک اسپرم‌ها



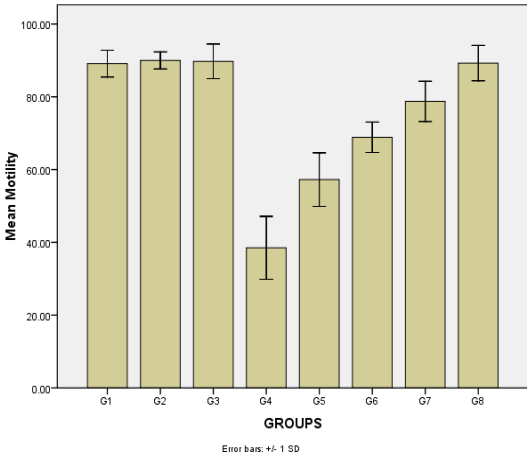
نمودار شماره ۱: میانگین و انحراف معیارمیزان قطر لوله سمی نیفروس در گروه‌های مختلف



نمودار شماره ۲: میانگین وانحراف معیارمیزان ضخا مت لایه ژرمینال لوله سمی نیفروس در گروه‌های مختلف



نمودار شماره ۳: میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های اسپرم در گروه‌های مختلف



نمودار شماره ۴: میانگین و انحراف معیار میزان تحرک اسپرم در گروه های مختلف

بحث

شایع‌ترین علت ناباروری مردان عدم توانایی آنان در تولید تعداد کافی اسپرم‌های سالم و فعال است(۲۳). عوامل متعددی می‌توانند تولید اسپرم را تحت تاثیر قرار دهند و در بروز ناباروری دخیل باشند. از میان این عوامل می‌توان به داروهای شیمی درمانی، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد سمّی، آفت‌کش‌ها، تشعشعات، استرس، آلودگی هوا و عدم دریافت کافی ویتامین‌ها اشاره نمود. مشخص شده است که عوامل ذکر شده می‌توانند با ایجاد رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون سلول‌های ژرمینال جنسی در بافت بیضه غلظت اسپرم را کاهش دهند(۲۵،۲۴) تحقیقات نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند از طریق کاهش آسیب‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد در تقویت و استحکام سدخونی- بیضه‌ای، حفاظت و ترمیم DNA اسپرم‌ها در مردان نابارور موثر باشند(۲۷،۲۶).

در مطالعه حاضر تغییرات کمّی، کیفی و بلوغ اسپرم‌ها که مارکرهای مهمی برای کیفیت اسپرماتوژنز هستند و می‌توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با باروری حیوانات ارائه دهند، در روند اثرات کلرید کادمیوم و ملاتونین بررسی شد. کلرید کادمیوم باعث بروز سمّیت تولید مثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود که با تجویز هم‌زمان آنتی‌اکسیدان‌ها این سمّیت کاهش می‌یابد. توانایی کلرید کادمیوم در تولید رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون چربی و بروز استرس اکسیداتیو گزارش شده است(۲۸) بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد که دوز پایین و استفاده طولانی مدت از کلرید کادمیوم در موش‌های نر می‌تواند بر بدن و ارگان‌های تناسلی آن‌ها تاثیر گذارد(۲۹) و در میزان باروری این موش‌ها اختلال ایجاد کند(۳۰).

در این مطالعه تجویز تک دوز *mg/kg* ۲ کلرید کادمیوم باعث کاهش بلوغ اسپرماتوژنز و عمده پارامترهای کمّی بیضه شد. مصرف کلرید کادمیوم از بین رفتن کلیه سلول‌های زایای بیضه را در پی داشت که این اثر ناشی از خاصیت اکسیدکنندگی شدید کلرید کادمیوم است که دارای اثرات مخربی بر روی سلول‌های در حال تکثیر می‌باشد(۱۰). عده‌ای دیگر نیز بر این عقیده‌اند که مصرف کلرید کادمیوم می‌تواند باعث توقف تقسیم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و یا مرگ آن‌ها گردد. کلرید کادمیوم به علت تولید رادیکال‌های آزاد شده سبب افت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شده و کاهش میزان سلول‌ها و تخریب بافت بیضه را به دنبال دارد. بنابراین، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش قابل توجهی در کاهش آسیب‌های ناشی از کلرید کادمیوم دارند.

در مطالعه‌ای که فلورا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی فلزات سنگین روی، کادمیوم، مس و جیوه انجام دادند چنین نتیجه گرفتند که کادمیوم حتی در غلظت‌های کم نیز به شدت برای اسپرم سمّی بوده و باعث کاهش سریع حرکات اسپرم و کاهش مصرف اکسیژن در آن‌ها می‌شود. هم‌چنین آن‌ها دریافتند که با افزایش میزان کادمیوم سرم خون، نقص در قطعه میانی اسپرم‌های نابالغ و کاهش در حجم اسپرم افزایش نشان می‌دهد(۳۱).

در مطالعه حاضر تعداد زیادی از سلول‌های زایا در گروه دریافت‌کننده کلرید کادمیوم از بین رفته بودند، ولی در داخل لوله‌ها و بر روی غشاء پایه هنوز اسپرماتوگونی‌ها قابل مشاهده بودند. احتمالاً باقی ماندن

اسپرماتوگونی‌ها می‌تواند دلیلی بر این باشد که این سلول‌ها می‌توانند پس از مدتی با تقسیم خود سلول‌های زایایی را در لوله اسپرم ساز ایجاد نمایند(۳۲). نتایج مطالعه حاضر در گروه دریافت‌کننده کلرید کادمیوم کاهش بلوغ اسپرم‌ها، تعداد و تحرک این سلول‌ها و پارامترهای کمّی لوله اسپرم‌ساز را نشان داد. در این مطالعه اثر تجویز ملاتونین به تنهایی و به صورت توأم با کلرید کادمیوم بر روی اسپرماتوژنز نیز مورد بررسی قرار گرفت.

ملاتونین به عنوان مهم‌ترین ترشح غده اپی‌فیز، آنتی‌اکسیدانی بسیار مؤثر و خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد است. این هورمون توسط غده پینه آل در غده اپی‌فیز (اپی تالاموس یا صنوبری) مغز، شبکیه و گلبول‌های خون تولید می‌شود. در حالی که تابش و پرتوی نور روز به چشم از تولید ملاتونین جلوگیری می‌کند، تاریکی شب تولید این هورمون را در خون افزایش داده و خواب‌آور است(۳۳). درمیان طیفی از اعمال، ملاتونین جمع‌کننده مستقیم رادیکال‌های آزاد بوده و یک آنتی‌اکسیدان غیر مستقیم نیز محسوب می‌شود ملاتونین به‌طور مستقیم رادیکال‌های هیدروکسیل، پر اکسید هیدروژن (OH)، نیتریک اکسید، آنیون‌های پراکسی نیترات، اسید پراکسی نیتروس و اسید هیپوکلریک را سم‌زدایی می‌کند(۳۴). ملاتونین سیستم آنتی‌اکسیدانی داخلی را تحریک می‌کند و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون S- ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و دیگر تیول‌ها را در خون، کبد و کلیه افزایش می‌دهد. هم‌چنین ملاتونین فعالیت گلوتاتیون پروکسیداز و کاتالاز را در بیضه افزایش می‌دهد(۳۵).

در این مطالعه تاثیر مهم و قابل توجه ملاتونین در کاهش اثرات سو کلرید کادمیوم مشاهده شد. بنابراین، ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و جمع کننده‌ی رادیکال‌های آزاد با استفاده از خاصیت آنتی‌اکسیدا نی خود، چه به صورت یک پاک کننده‌ی رادیکالی و چه به صورت فعال‌کننده‌ی بعضی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، باعث مهار و کاهش اثرات سوء کلرید کادمیوم می شود. در مطالعه حاضر و با توجه به جدول شماره ۱، در گروه‌های دریافت‌کننده ملاتونین به تنهایی افزایش تحرک، تعداد و قدرت پیشروندگی اسپرم‌ها مشاهده می‌شود و در گروه دریافت کننده دوز ۲۰ میلی‌گرم ملاتونین تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل وجود دارد. اگرچه در گروه‌های دریافت کننده ملاتونین همراه با کلرید کادمیوم نسبت به گروه کنترل کاهش تحرک، تعداد و قدرت پیشروندگی اسپرم‌ها مشاهده می‌شود، در مقایسه با گروه دریافت کننده کلرید کادمیوم افزایش تحرک، تعداد و قدرت پیشروندگی اسپرمها قابل ملاحظه است که این روند در گروه دریافت کننده دوز ۲۰ میلی‌گرم ملاتونین و ۲ میلی‌گرم کلرید کادمیوم تفاوت معنی‌داری در جهت افزایش تحرک، تعداد و قدرت پیشروندگی اسپرم‌ها با گروه دریافت کننده کلرید کادمیوم دارد. در این مطالعه در دوز ۲۰ میلی‌گرم ملاتونین افزایش قابل توجه میزان سلول‌ها، تحرک و تعداد اسپرم‌ها، و ازدیاد لایه ژرمینال به وضوح مشاهده شد که نشان‌دهنده مناسب بودن و در عین حال بی خطر بودن این دوز از دارو جهت افزایش قدرت باروری می باشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف ملاتونین می تواند در بهبود برخی پارامترهای اسپرم از قبیل تعداد، تحرک غیر پیشرونده و مورفولوژی طبیعی اسپرم موثر بوده و این پارامترها را به طور معنی‌داری بهبود بخشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، مصرف ملاتونین می‌تواند احتمالاً با مداخلات آنتی‌اکسیدانی خود از آسیب‌های رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و در دوزهای به کار برده شده سمّیت داروی کلرید کادمیوم را کاهش دهد. هم‌چنین مصرف ملاتونین ممکن است شدت آسیب‌های ناشی از مواد یا داروهای با خاصیت تولید رادیکال‌های آزاد را کاهش داده و تخریب بافتی را تقلیل دهد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد بوده و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شده است. از مرکز توسعه پژوهش‌های بالینی بیمارستان نمازی شیراز به خاطر ارایه راهنمایی و مشاوره آماری تشکر و قدر دانی می گردد.

References

1. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996; 48(6): 835-850.
2. Arabi M, Anand RJK, Kanwar U. Analysis of the impact of caffeine on membrane integrity, redox ratio and GST in human ejaculated sperm: effectiveness of antioxidants. J Androl 2001; 93: 365-369.
3. Arabi M, Sanyal SN, Kanwar U, Anand RJK. The Effect of antioxidants on nicotine and caffeine induced changes in human sperm - An in vitro Study. *In:* Male fertility and lipid metabolism. De Vriese SR, Christophe AB, (eds). Urbana(USA): AOCS; 2003. p. 250-267.
4. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Antioxidant supplementation in vitro does improve human sperm motility. Fertil Steril 1999; 72(3): 484-495.
5. Hida H, Coudray C, Calop J, Favier A. Effect of antioxidants on adriamycin-induced microsomal lipid peroxidation. Biol Trace Elem Res 1995; 47(1-3): 111-116.
6. Arabi M. Analyses of impact of metal ion contamination on Carp (*Cyprinus carpio* L.) gill cell suspensions. Biol Trace Elem Res 2004; 100(3): 229-246.
7. Iwasaki A, Gagnon A. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57(2): 409-416.
8. Eggert Kruse W, Rohr G, Jochum R, Adolph M, Runnebaum B. The effect of heavy metals on the in vitro interaction between human sperm and cervical mucus. Dtsch Med Wochenschr 1992; 117(37): 1383-1389.
9. Atli G, Alptekin O, Tukel S, Canli M. Response of catalase activity to Ag (+), Cd(2+), Cr(6+), Cu (2+) and Zn(2+) in five tissues of freshwater fish Oreochromis niloticus. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2006; 143(*2*): 218-224.
10. Bobillier-Chaumont S, Maupoil Y, Berthelot A. Metallothionein induction in the liver, kidney, heart and aorta ofcadmium and isoproterenol treated rats. J App Toxicol 2006; 26(1): 47-55.
11. Tandon SK, Singh S, Dhawan M. Preventive effect of vitamin E in cadmium intoxication. Biomed Environ Sci 1992; 5(1): 39-45.
12. Ebrahimi M, Scott AP, Kime DE. Extragonadal production of 17, 20-dihydroxy-4-pregnen-3-ones in vitro in cyprinid fish. Gen Comp Endocrinol 1996; 104(3): 296-303.
13. Kime DE, Ebrahimi M, Nysten K, Roelants I, Moore HDM, Ollever F, et al. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; Applicationt to effects of heavy metals. Aquat Toxicol 1996; 36(3-4): 223-237.
14. Siu1 ER, Mruka DD, Portob CS, Chenga CY. Center for Biomedical Research, Population Council, Toxicol Appl Pharmacol. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 238(3): 240–249.

15. Azevedo RA, Gratão PL, Monteiro CC, Carvalho RF. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? Food and Energy Security 2012; 1(2): 133-140.
16. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. J Biomed Sci 2000; 7(6): 444-458.
17. Parlaktas BS, Ozyurt B, Ozyurt H, Tunc AT, Akbas A. Levels of oxidative stress parameters and the protective effects of melatonin in psychosis model rat testis. Asian Journal of Andrology 2008; 10(2): 259-265.
18. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC, et al. The oxidant/ antioxidant network: role of melatonin. Biol Signals Recept 1999; 8(1-2): 56-63.
19. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, er al. Robert Chapin, Oct 27, 2014. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. Reprod Toxicol 1996; 10(3): 237-244.
20. Eridani S. HbS Protection from P. falciparum Infection. British Journal of Medicine & Medical Research 2013; 3(4): 790-801.
21. Johnsen SG. Evaluation of gonadotrophin analyses in male hypogonadism. Acta Endocrinol 1971; 67: 756-766.
22. Mesquita SFP, Barbieri MF, Fernandes EV, Andrade FG, Arrebola NR. Effects of swimming on the testicular histomorphology of alcoholized rats. Acta Scientiarum. Health Science 2011; 35(1): 37-42.
23. Aitken RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115(1): 1-7.
24. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. Fertil Steril 1991; 56(2): 192-193.
25. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen andSemen-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press; 1999.
26. Brooks DE. Activity of androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymal spermatozoaof the rats. Biochem J 1976; 156(3): 527-537.
27. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol Pathol 2002; 30(4): 524-533
28. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspectives. Hum Reprod Update 2008; 14(3): 243-258.
29. Adegbesan BO, Adenuga GA. Effect of lead exposure on liver lipid peroxidative and antioxidant defense systems of protein-undernourished rats. Biol Trace Elem Res 2007; 116(2): 219-225.
30. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversalby chelation therapy. Indian J Med Res 2008; 128(4): 501-523.
31. Chiba M, Shinohara A, Matsushita K, Watanabe H, Inaba Y. Indices of lead exposure in blood and urine of lead exposed workers and concentration of major and trace element and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. Tohoku J Exp Med 1996; 178(1): 49-62.
32. Järup L, Äkesson A. Current status of cadmium as an environmental health

problem. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 3: 201-208.

33. Sanchez-Hidalgoa M, de la Lastrab CA, Carrascosa-Salmoralc MP, Naranjoc MC, Gomez-Corverac A, Caballerod B, et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. Exp Gerontol 2009; 44(5): 328-334.

34. Paskologlu K, Sener G, Ayanğolu-Dülger G. Melatonin treatment protects against diabetes induced functional and biochemical changes in rat aorta corpus cavermosum. Eur J Pharmacol 2004; 499(3): 345-354.

35. Nishidia S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. Endocrine 2005; 27(2): 131-136.