

بررسی تاثیر غلظت های مختلف جیوه بر پارامترهای حرکت و اولترامرفولوژیک اسپرم ماهی

دکتر منصور ابراهیمی

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به آلودگی منابع مختلف به فلزات سنگین و عوارض شناخته شده آنها و کاستی هایی که در تحقیقات قبلی برای سنجش پارامترهای موثر بر حرکت اسپرم ها وجود داشته است، این تحقیق به منظور تعیین تاثیر غلظت های مختلف جیوه بر پارامترهای حرکت و اولترامرفولوژیک اسپرم ماهی انجام گرفت.

مواد و روش ها: تحقیق به روش تجربی روی اسپرم ۶ ماهی با وزن متوسط 1018 ± 73 گرم انجام گرفت. اسپرم ها در غلظت های ۰، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام جیوه مجاورت داده شدند و تاثیر این تماس با جیوه بر پارامترهای حرکتی اسپرم ها بر حسب میکرومتر بر ثانیه تعیین و مورد قضاوت آماری قرار گرفت. به علاوه بررسی های مرفولوژی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکن نیز انجام گرفت.

یافته ها: تحقیق نشان داد که جیوه تغییرات مرفولوژی قابل ملاحظه ای را در اسپرم ها ایجاد نکرد، ولی قطع کامل دم در غلظت های ۵ پی پی ام جیوه به بالا مشاهده گردید. در اثر تماس اسپرم حتی با غلظت ۰/۱ پی پی ام اختلاف معنی داری در عوامل موثر بر حرکت اسپرم ها نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

نتیجه گیری و توصیه ها: سم فلز جیوه حتی در غلظت های کم نیز ممکن است بر حرکت اسپرم ها تاثیر بگذارد. به علاوه از طریق مهار سیستم های تنفسی سلول می تواند تغییرات مرفولوژی قابل مشاهده ای را ایجاد کند. بنابراین توقف کامل و سریع فعالیت حرکتی اسپرم ها در اثر تماس با جیوه باعث می شود که اسپرم قادر به یافتن تخمک، ورود به آن و بارور کردن آن نباشد.

واژگان کلیدی: اسپرم، پارامترهای حرکتی، آلودگی جیوه.

می‌دهند که استفاده از سیستم آنالیز اسپرم با کمک کامپیوتر (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)، برای بررسی پارامترهای حرکتی اسپرم و به خصوص برای بررسی تأثیرات فلزات سنگین بر روی پارامترهای حرکت اسپرم می‌تواند دقت و تکرارپذیری آزمایشات انجام شده را بیشتر کرده و اطلاعات مناسب‌تری نسبت به روش‌های سنتی و دستی را در اختیار قرار دهد (۱۴). اگر چه در مطالعات قبلی اختلال در برخی از عوامل مؤثر بر حرکت اسپرم در نتیجه تماس با فلزات سنگین گزارش شده است (۱۵)، ولی برای بررسی دقیق‌تر پارامترهای حرکتی مختل شده در اسپرم و بررسی تغییرات مرفولوژیک ناشی از تماس اسپرم با جیوه این مطالعه طراحی و انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تحقیق با طراحی تجربی انجام گرفت. ۶ ماهی *Clarias gariepinus* با وزن متوسط 1018 ± 73 گرم تهیه گردیده و با قطع سر، اسپرم داخل بیضه‌ای مستقیماً جمع‌آوری شد.

اسپرم‌ها با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام جیوه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای جلوگیری از فعال شدن اسپرم‌ها در اثر تماس با آب، اسپرم همراه با جیوه در محیط نگهدارنده (*extender*) نگهداری شدند (۱۶). برای فعال کردن اسپرم‌ها باید به آنها آب اضافه کرد که این عمل در زیر میکروسکوپ (BX 50 Olympus) دارای فاز کنتراست و با لنز ۴۰ چشمی و دوربین‌دار (ICD 290, Ikegami) انجام گرفت و تا زمان توقف کامل اسپرم حرکات آنها فیلم‌برداری گردید. سپس فیلم‌ها با استفاده از دستگاه ردیاب اسپرم هابسون (*Hubson Sperm Tracker*) مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای حرکتی

مقدمه

یکی از عواقب ناخوشایند صنعتی شدن و تمایل به کسب درآمدهای بیشتر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، افزایش آلودگی‌های محیط و در نتیجه بروز فجایع زیست محیطی است. آلودگی محیط‌های آبی با فلزات سنگین در فرآیند های ذوب و ریخته‌گری فلزات، سوخت‌های فسیلی و عملیات اکتشاف و استخراج معادن حاصل می‌شود و با گسترش روزافزون صنایع، آلودگی‌های فوق رو به افزایش است. بروز مشکلات حاد بهداشتی ناشی از تجمع فلزات سنگین در گیاهان و سایر حیوانات زنجیره غذایی گزارش شده است (۱). در آلودگی‌های حاد، تماس موجود زنده با مقادیر زیادی از فلزات سنگین در زمان کوتاهی، سریعاً باعث مرگ می‌شود؛ ولی در صورتی که تماس با مقادیر کم و برای مدت طولانی باشد (مثلاً تماس طولانی مدت با مقادیر کم فلزات سنگین موجود در آب آشامیدنی و یا مواد غذایی)، فلزات سنگین به مرور جذب بدن شده و در برخی بافتها نظیر بیضه‌ها تجمع یافته (۲ و ۳) و پدیده تجمع بافتی (*bioaccumulation*) به وقوع می‌پیوندد (۱). جیوه یکی از فلزات سنگین بسیار سمی برای اسپرم است (۴-۶) و مطالعات نشان می‌دهد که تماس با جیوه می‌تواند باعث برهم زدن فعالیتهای طبیعی و اختلال در پارامترهای حرکتی اسپرم گردد (۶-۸).

گزارش شده است در افرادی که در تماس مداوم با جیوه بوده‌اند، احتمال بروز ناباروری افزایش یافته است (۹-۱۲) که ممکن است در اثر کاهش قابلیت و ضریب نفوذ اسپرم باشد که با فاکتور نفوذ موکوس اندازه‌گیری می‌شود (۴). هم‌چنین افزایش ضایعات کلیوی نیز در این زمینه گزارش شده است (۱۳). مطالعات اخیر نشان

درجه سانتی گراد شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها برای مرتبه دوم برای یک ساعت در محلول ۲ درصد اسمیوم تتراکسید در دمای اتاق فیکس شده و سپس برای مدت ۱۵ دقیقه در هر محلول از سری استون (۳۰ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵، ۹۵، ۱۰۰، و ۱۰۰ درصد) کاملاً خشک شده و بر روی یک غربال مولکولی آبیگری شدند.

سپس نمونه‌ها توسط خشک‌کننده نقطه بحرانی با استفاده از دی‌اکسیدکربن به عنوان مایع انتقالی خشک شدند. پس از خشک شدن نمونه‌ها، آنها بر روی انتهای چسبناک یک چوب کوچک چسبانده شده و با حدود ۳۰-۲۵ نانومتر از طلا در اسپوتر کوتر پوشانده شدند و با میکروسکوپ الکترونی اسکن (فیلیپس، ۵۰۱ ب، ایندهون، هلند) مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز عکس‌های میکروسکوپی: همه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی اسکن مورد مطالعه قرار گرفتند و از حالت‌های طبیعی و غیرطبیعی بعضی از اسپرم‌ها عکس تهیه شد. تعداد کل اسپرم‌های غیر طبیعی در ۱۰۰ نمونه اسپرم شمارش شد. برای بیان تغییرات مرفولوژیک از اندازه‌گیری‌های مرفولوژیک (از قطر سر هر ۱۰ اسپرم) استفاده شد.

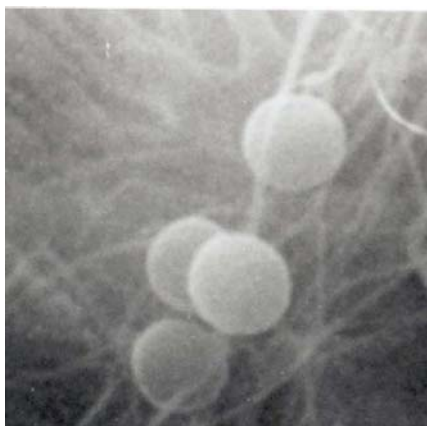
یافته‌ها

تعداد اسپرم‌های متحرک و سرعت حرکت اسپرم‌های در تماس با جیوه از زمان شروع ثبت حرکات نسبت به گروه شاهد (غلظت صفر پی‌پی‌ام جیوه) با گذشت زمان کاهش یافت و حداکثر فعالیت ضبط شده اسپرم‌ها پس از فعال کردن آنها سه دقیقه طول کشید. تعداد اسپرم‌های متحرک و سرعت حرکت آنها با افزایش غلظت جیوه کاهش چشمگیری را نشان داد و حتی در غلظت ۰/۱ پی‌پی‌ام جیوه، فاکتورهای حرکتی اسپرم کاهش

اسپرم‌ها شامل *VCL*, *VSL*, *VAP*, *ARE*, *LIN*, *MAD*, *MOC*, *STR*, *ALH*, *BCF*, *LIM* توسط دستگاه اندازه‌گیری شدند. اما با توجه به مشابه بودن الگوی همه پارامترها، در این مقاله فقط نمودار مربوط به سه پارامتر میانگین سرعت مسیر (*Average Path Velocity*, *VAP*)، سرعت خط مستقیم (*Straight Line Velocity*, *VSL*) و سرعت حرکت منحنی (*Curvilinear Velocity*, *VCL*) ارائه می‌گردد.

تنظیمات آنالیز تصویر با بزرگنمایی ۲۰ به صورت *video, predict - off, search radius = 8.50 μm filter weightings, threshold = +10/-50, refresh time = 1 second, aspect = 1.49 = pal 1 = 2, immotile process = normal* و *2=3, 3=3, 4 3* تنظیم گردید. میانگین سرعت اسپرم‌ها در هر غلظتی از فلزات سنگین با میانگین سرعت حرکت اسپرم‌ها در گروه کنترل (غلظت صفر فلز سنگین) توسط آزمون *T-test* مقایسه شد و وجود اختلاف معنی‌دار بین این گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از برنامه *SPSS (SPSS Inc., Chicago Illinois, USA) version 11* برای آنالیز آماری استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ الکترونی / اسکن: اسپرم‌های موجود در ویالهای انکوبه شده با گلوترآلدئید ۳ درصد با ۰/۱ مولار فسفات بافر مخلوط شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای سه ساعت نگهداری شدند. سپس اسپرم و مواد فیکس‌کننده از طریق فیلترهای کاغذی با قطعه ۵/۵ سانتی‌متر صاف شدند. لبه‌های کاغذ صافی به پایین خم شده و به وسیله گیره کاغذی نگه داشته شده و سپس فیلترها در ویال شیشه‌ای برای انجام قسمتهای بعد قرار داده شدند. فیلترهای کاغذی سه مرتبه با فسفات بافر ۰/۱ مولار حاوی ۱۰ درصد سوکروز به فواصل یک ساعت در دمای ۴

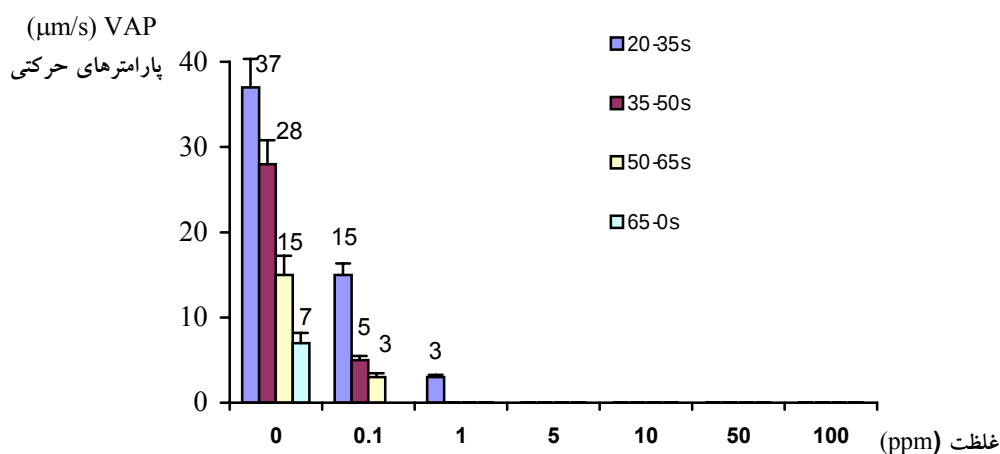


تصویر ۱- شکل طبیعی اسپرم مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن (بزرگنمایی ۵۰۰۰۰)

اسپرم در هر سه گونه از یک سر گرد، یک قطعه میانی و یک دم تشکیل شده بود. ولی در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ پی‌پی‌ام جدا شدن دم از قطعه میانی در تعدادی از اسپرم‌ها مشاهده گردید. در غلظت ۰/۱ پی‌پی‌ام فلز جیوه، میانگین تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی ۸۰ درصد بود که در غلظت‌های ۱ پی‌پی‌ام و بالاتر به ۱۰ درصد رسید.

شدید و اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل نشان داد. در غلظت‌های بالاتر از ۱ پی‌پی‌ام اثرات سمی جیوه شدیدتر شد و حرکات اسپرم‌ها کاملاً متوقف گردید. در غلظت‌های بالاتر از ۱ پی‌پی‌ام هیچ اسپرم متحرکی مشاهده نشد و توقف کامل حرکات اسپرم‌ها گزارش گردید. با استفاده از دستگاه ردیاب اسپرم هابسون الگوی مشابهی برای همه پارامترهای حرکتی اسپرم مشاهده گردید که اطلاعات فقط برای پارامترهای سرعت میانگین مستقیم بر حسب میکرومتر بر ثانیه (Average Path Velocity, VAP) در اینجا ارائه شده است.

تغییرات مرفولوژیک اسپرم در اثر تماس با فلزات سنگین: در بررسی با میکروسکوپ الکترونی اسکن، ساختار اسپرم در نمونه‌ها از نظر شکل کاملاً طبیعی بود و هیچگونه برآمدگی آکروزومی در آنها مشاهده نشد (شکل ۱).



نمودار ۱- میزان حرکت اسپرم بر حسب غلظت‌های مختلف جیوه و به تفکیک زمان‌های مورد بررسی

کمتر از سه دقیقه کلیه حرکات خود را از دست می‌دهد و غیر متحرک می‌شود (۱۷). اسپرم ماهیان در بیضه و لوله‌های اسپرم بر بی حرکت بوده و پس

بحث

بر خلاف پستانداران که اسپرم آنها برای چندین ساعت متحرک می‌ماند، اسپرم ماهیان در

بررسی‌های انجام گرفته در تعدادی از گونه‌های پستانداران مؤید این مطلب است که بررسی و اندازه‌گیری اندکس‌های حرکتی اسپرم (همانند سرعت حرکت به جلو و میزان جابه‌جایی کناری سر) با ظرفیت لقاح در شرایط *in vitro* و *in vivo* (۲۰) و با سرعت حرکت مستقیم اسپرم (۲۱) ارتباط دارد.

جیوه یکی از عناصر بسیار سمی برای اسپرم است. بروز اختلالات تولید مثلی در اثر تماس با غلظت‌های ۰/۰۰۱ تا ۲۲۵ پی‌پی‌ام جیوه گزارش شده است (۳) و با توجه به تجمع فلزات سنگین در بافتهای بدن در اثر تماس مداوم، یافته‌های این مطالعه با یافته‌های قبلی تطابق کامل دارد (۱ و ۲). بررسی‌ها نشان داده است که جیوه می‌تواند باعث اختلال در مکانیزم‌های تنفسی اسپرم و در نهایت مرگ سریع آن شود (۸). به جز قطع ارتباط دم اسپرم با قطعه میانی، هیچ‌گونه تغییر مرفولوژیک دیگری در اثر تماس اسپرم با جیوه مشاهده نشد که این مطلب می‌تواند مؤید یافته‌های قبلی در زمینه تاثیر جیوه بر فرآیندهای فیزیولوژیک و تنفسی اسپرم باشد. همچنین نشان داده شده است که حتی غلظت کمتر از 10^{-6} میلی‌مولار جیوه نیز می‌تواند بر اسپرم اثر سمی داشته باشد (۲۲). اثرات سمی شدید جیوه نسبت به اسپرم موش نیز گزارش شده است (۲۲). بنابراین بر خلاف یافته‌های مشابه در زمینه تاثیرات گسترده مرفولوژیک سایر فلزات سنگین همچون روی و کادمیم بر اسپرم، تماس با جیوه تغییر عمده‌ای بر اسپرم‌های مورد بررسی نشان نداده است که این می‌تواند به دلیلی سمیت جیوه نسبت به سایر فلزات سنگین و تأثیر مستقیم آن بر سیستم تنفسی سلول و مرگ سریع ناشی آن باشد (۸). اگر چه این مطالعه تنها بروز تغییرات مرفولوژیک و پاتولوژیک

از ورود به محیط آبی و جذب آب و تنظیم اسمولاریته و غلظت یونی قابلیت حرکت را به دست می‌آورد (۱۷ و ۱۸). این قابلیت اسپرم ماهیان، شرایط مناسبی را جهت انجام آزمایشاتی که نیاز به انکوبه کردن اسپرم با مواد مختلف در زمان‌های مختلف دارد، فراهم می‌کند. می‌توان اسپرم آنها را بدون تغییر در فاکتورهای حرکتی برای مدتی طولانی همراه با فلزات سنگین در خارج از بدن انکوبه کرد و سپس با اضافه کردن آب، اسپرم را فعال کرده و با استفاده از میکروسکوپ دوربین‌دار نسبت به ضبط حرکات و آنالیز آنها اقدام نمود (۱۷).

در تحقیق حاضر نیز از همین روش استفاده شد؛ به طوری که در مرحله اول اسپرم‌ها برای ۲۴ ساعت با فلزات سنگین مجاور شدند و در مرحله دوم با اضافه نمودن آب در زیر میکروسکوپ متحرک گردیدند و حرکات آنها توسط دوربین و ویدئو ثبت گردید. این روش امکان بررسی مجدد آنها را با توجه به زمان بسیار کوتاه متحرک بودن آنها (۳ دقیقه) فراهم کرد. پس از تنظیم نمودن دستگاه ردیاب اسپرم هابسون برای ارزیابی پارامترهای حرکتی اسپرم‌ها، فیلم ضبط شده مجدداً اجرا شد و دستگاه در هر قاب ۲۰۰ اسپرم را دنبال نمود و ۱۲ پارامتر حرکتی آنها را ثبت نمود.

نتایج حاصله نشان داد که این روش بررسی می‌تواند اطلاعات بسیار باارزشی را درباره حرکت اسپرم‌ها و تأثیر فلزات سنگین بر روی فاکتورهای حرکتی آنها فراهم نماید. غلظت‌های فلزات سنگین استفاده شده در این بررسی مشابه بسیاری از غلظت‌های گزارش شده در بافتهای جانداران (شامل بیضه‌ها) بود (۲۱)؛ هرچند در نواحی صنعتی بسیاری از کشورها مقادیر بالاتر نیز گزارش شده است (۱۹).

مزمّن انسان با منابع آلوده به فلزات سنگین، این فلزات به تدریج در بافتهای مختلف نظیر بیضه تجمع یافته و به مرور در پروسه‌های اسپرماتوژنز و تکامل اسپرم اختلال ایجاد می‌کنند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری صمیمانه کارمندان و همکاران عزیز در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران و به خصوص جناب آقای دکتر هدایتی به خاطر فراهم کردن زمینه انجام برخی آزمایشات در آن مرکز و آقای دکتر دیوید کایم از دانشگاه شفیلد انگلستان به دلیل فراهم کردن امکان استفاده از دستگاه ردیاب اسپرم صمیمانه تشکر می‌گردد.

حاصل از تماس اسپرم با جیوه را نشان می‌دهد، با کنار هم گذاشتن یافته‌های این مطالعه و مطالعات قبلی، می‌توان اذعان کرد که حداقل بخشی از عدم توانایی حرکتی اسپرم در اثر تماس با فلزات سنگین، می‌تواند به دلیل تغییرات گسترده در پارامترهای حرکتی اسپرم و اختلالات مرفولوژیک و ساختاری آن باشد. علاوه بر این، فلزات سنگین می‌توانند در بافتهای بدن انسان و سایر جانوران تجمع یافته و در فرآیند تکامل اسپرم تأثیرات سوء خود را اعمال نمایند (۳). یکی از بافتهایی که فلزات سنگین می‌توانند در آن ذخیره شوند بافت بیضه است؛ لذا به دلیل ارتباط نزدیک اسپرم با فلزات سنگین در طی پدیده اسپرماتوژنز و بعد از آن تغییرات مرفولوژیک در اسپرم حاصل می‌شود. بنابراین در اثر تماس

References:

1. Cope WG, Wiener JG, Atchison GJ. Hepatic cadmium, metal-binding proteins and bioaccumulation in bluegills exposed to aqueous cadmium. *Environmetal Toxicology and Chemistry*. 1994; 13(4):553-562.
2. Gumgun B, Tez UZ, Gulsun Z. Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris river in Turkey. *Chemosphere*. 1994; 29:111-116.
3. Kmie DE. The effects of pollution on reproduction in fish. Review in *Fish Biology and Fisheries*. 1995; 5:52-96.
4. Eggert Kruse W, et al. Influence of heavy metals on the in vitro interaction between male sperm and cervical. *DMW*. 1992; 117(37):1383-1389.
5. Khan AT, Weis AJS. Toxic effects of mercuric chloride on sperm and egg viability of two populations of mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Pollution*. 1987; 48(4):263-274.
6. Bellas J, Vazquez E, Beiras R. Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine. water quality assessment. 2001. 35(12):2905-2912.
7. Anderson BS, et al. Copper toxicity to sperm, embryos and larvae of topmelt *Atheinops affinis*, with notes on induced spawning. *Mar Environ Res*. 1991; 31:17-35.
8. Alabi NS, Whanger PD, Wu Ash. Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility in vitro. *Biology of Reproduction*. 1985; 33(4):911-919.
9. Chia SE, et al. Blood concentrations of lead, cadmium, mercury, zinc, and copper and human semen parameters. *Archives of Andrology*. 1992; 29(2):177-183.
10. Dally A, Hendry B. Declining sperm count. Increasing evidence that Young's syndrome is associated with mercury. *BMJ*. 1996; 313:44.
11. Khan AT, Weis JS. Effect of methylmercury on egg and juvenile viability in two populations of killifish *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Research*. 1987; 44(2):272-278.
12. Leung TY, et al. Whole blood mercury concentrations in sub-fertile men in Hong Kong. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2001; 41(1):75-77.

13. Droller MJ., *Environment and the genitourinary tract. Otolaryngology and Head and Neck Surgery.* 1996; 114(2): 425-33.
14. Kime DE, et al. *Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to effects of heavy metals. Aquatic toxicology.* 1996. [In press]
15. Jalabert B. *In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (Salmo gairdneri), northern pike (Esox lucius) and goldfish (Carassius auratus). J Fish Res Bd Can.* 1976; 33:974-988.
16. Billard R, Cosson MP. *Some problems related to the assessment of sperm motioity in freshwater fish. Journal Of Experimental Zoology.* 1992; 261(2):122-131.
17. Morisawa M, et al. *Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of experimental zoology.* 1983; 107:95-103.
18. Badsha KS, Goldspink CR. *Preliminary observations on the heavy metal content of four species of freshwater fish in NW England. Journal of Fish Biology.* 1982; 21:251-267.
19. Holt W, et al. *Reproducibility of computer-aided semen analysis Comparison of five different systems used in a practical workshop. Fertility and Sterility.* 1994;. 62(6I):1277-1282.
20. Moore HDM, Akhondi MA. *Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer – aided sperm analysis: Epididymal rat spermatozoa from proximal cauda have a greater fertilizing. Anthology.* 1996; 17:50-60.
21. White DR, Aitken RJ. *Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyper activated motility. Gamete Research.* 1989; 22(2):163-178.
22. Pacey AA, Cosson JC, Bentley MG. *Intermittent swimming in the spermatozoa of the lugworm Arenicola marina (L) (Annelid a: Polychaeta). Cell Motility and the Cytoskeleton.* 1994; 29(2):186-194.