Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2022; Vol. 46; No. 4

The Effect of Nanoselenium on Oxidative Stress in Testes of Adult Rats Treated with Cadmium Chloride

Shahrbanou Taremsari[1], Akram Eidi[1*], Pejman Mortazavi[2], Mehrdad Modarresi[3]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University of Khorasgan Branch, Esfahan, Iran.

Received: January 03, 2022; Accepted: September 04, 2022

Abstract

Background and Aim: With increasing age, degenerative changes in testicular tissue can be seen along with a decrease in sperm quality. Among the factors that have a toxic effect on sperm quality is the increase of oxygen free radicals by cadmium chloride, the low amount of which is necessary for sperm to acquire fertility. Nanoselenium as a strong antioxidant is able to neutralize free radicals. The aim of this study was to investigate the effect of nanoselenium on oxidative status in cadmium chloride induced infertility in adult male Wistar rats.

Methods: In this experimental study**,** 48 adults male Wistar rats were randomly divided into eight groups including: healthy, experimentally healthy, receiving nanoselenium (0.05, 0.1, 0.2 mg/kg body weight), infertile control, receiving cadmium chloride, experimental infertile Cadmium chloride,and nano- selenium recipients (0.05, 0.1, 0.2 mg/kg body weight). The duration of treatment was 30 days. At the end of the treatment, the animals were anesthetized and the testicular tissue of the rats was removed immediately. The testes were homogenized and malondialdehyde (MDA), levels and activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes were measured. Finally,The results were analyzed using two-way ANOVA.

Results: The results of the present study showed that the amount of MDA in the group treated with cadmium chloride increased significantly compared to the control group (3.88 ± 0.34) ($p<0.05$). The results also indicated that the antioxidant power of testicular tissue in the group treated with cadmium chloride was significantly reduced compared to the healthy control group ($p<0.05$).Moreover, nanoselenium treatment in infertile animals at doses of 0.1 and 0.2 mg/kg improved the oxidative stress parameters compared to the infertile control group.

Conclusion: It seems that nanoselenium, as a strong antioxidant, can inhibit the destructive effects of cadmium chloride on lipid peroxidation and the antioxidant power of testicular tissue.

Keywords: Nanoselenium; Cadmium Chloride; Oxidative Stress; Antioxidant; Testis; Rat

Please cite this article as: Taremsari S, Eidi A, Mortazavi P, Modarresi M. The Effect of Nanoselenium on Oxidative Stress in Testes of Adult Rats Treated with Cadmium Chloride. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(4):26-37.

[*]**Corresponding Author:** Akram Eidi; Email: eidi@srbiau.ac.ir

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۶، شماره ۴، سال ۱۴۰۱ شمسی، صفحات ۲۶ تا ۳۷

بررسی اثر نانوسلنیوم بر استرس اکسیداتیو در بیضه موش صحرایی بالغ تیمار شده با کلرید کادمیوم

شهربانو طارمسری[۱]، اکرم عیدی[۱*]، پژمان مرتضوی[۲]، مهرداد مدرسی[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه آسیب‌شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: با افزایش سن تغییرات دژنراتیوی در بافت بیضه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم دیده می‌شود. از جمله عواملی که اثر سمی روی کیفیت اسپرم دارد، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط کلریدکادمیوم است که میزان کم آنها برای اسپرم ضروری است تا توانایی باروری را کسب کند. نانوسلنیوم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است رادیکال‌های آزاد را خنثی کند. پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر نانوسلنیوم بر وضعیت اکسیداتیو در ناباروری القا شده توسط کادمیوم کلرید در موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۸ سر موش نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۸ گروه کنترل سالم، تجربی سالم دریافت‌کننده نانوسلنیوم (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، کنترل نابارور دریافت‌کننده کلرید کادمیوم، تجربی نابارور دریافت‌کننده کلرید کادمیوم + نانوسلنیوم (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند. مدت تیمار ۳۰ روز بود. در پایان زمان تیمار، حیوانات بیهوش شده، بافت بیضه رت‌ها سریعاً خارج شد. بیضه‌ها هموژن شده و بررسی بررسی میزان MDA و فعالیت آنزیم های SOD، CAT و GPX روی آن انجام شد. نتایج با استفاده از آزمون واریانس دوطرفه آنالیز شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان MDA درگروه تیمار شده با کادمیوم کلرید نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت (۰/۳۴ ± ۳/۸۸) ($p<0/05$). همچنین نتایج نشان داد که میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه در گروه تیمار شده با کادمیوم کلرید نسبت به گروه کنترل سالم به طور معناداری کاهش یافت ($p<0/05$). همچنین تیمار نانوسلنیوم در حیوانات نابارور در دوزهای ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب بهبود میزان پارامترهای استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه کنترل نابارور شده است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد نانوسلنیوم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است اثرات مخرب کادمیوم کلرید را بر پراکسیداسیون لیپید و قدرت آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه مهار کند.

واژگان کلیدی: نانوسلنیوم؛ کادمیوم کلرید؛ استرس اکسیداتیو؛ آنتی‌اکسیدان؛ بیضه؛ موش صحرایی

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Taremsari S, Eidi A, Mortazavi P, Modarresi M. The Effect of Nanoselenium on Oxidative Stress in Testes of Adult Rats Treated with Cadmium Chloride. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(4):26-37.

*نویسنده مسئول مکاتبات: اکرم عیدی؛ آدرس پست الکترونیکی: eidi@srbiau.ac.ir

CC BY NC

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 تأثیر منفی می‌گذارد و بقای موجود زنده را درمعرض خطر جدی قرار می‌دهد. به همین دلیل اکسیژن را نوعی تیغ دولبه در نظر می‌گیرند. مجموعه متابولیت‌های اکسیژن با نام انواع اکسیژن فعال (Reactive oxygen species, ROS)، به عنوان یکی از عوامل ایجاد ناباروری یا عقیمی در انسان مطرح هستند (۱). در شرایط طبیعی به منظور جمع‌آوری و سپس خنثی‌سازی ROS در داخل و خارج سلول آنتی‌اکسیدان‌ها وارد عمل می‌شوند. سلول‌های اسپرم درطی روند اسپرماتوژنز مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را همراه مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از دست داده و به این ترتیب در مقابل روند استرس اکسیداتیو حساس می‌شوند، اما به دلیل 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 محافظت می‌شوند. در سال‌های اخیر نیز ثابت شده است که در پلاسمای مایع اسپرمی مردان نابارور مقدار کمتری از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها درمقایسه با مردان بارور وجود دارد (۲). سلول‌های اسپرم به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء برای دریافت استرس اکسیداتیو بسیار مستعد هستند. به این ترتیب که واحدهای چربی در غشاء سلول که به راحتی دچار اکسیداسیونی موسوم به پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود با عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها تعدیل و یا خنثی می‌شود. روند استرس اکسیداتیو سبب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در سلول‌های اسپرم شده؛ بنابراین به عنوان یکی از عوامل مهم بروز ناباروری در مردان مطرح است (۳). کادمیوم تولید رادیکال‌های آزاداکسیژن را در سلول القاء کرده 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 (۴). مکانیسم اثر سمی کادمیوم کاملاً مشخص نیست. گفته می‌شود که این ترکیب از طریق ایجاد پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع سبب اختلال در فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها و در نتیجه سبب وقفه در سنتز پروتئین و اختلال در متابولیسم لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه می‌شود (۵).

عنصر ضروری و کمیاب سلنیوم که تا حد زیادی از طریق نان، غلات، حبوبات، ماهی، مرغ و گوشت تأمین می‌شود، در بسیاری از عملکردهای متابولیکی بدن نقش اساسی دارد و در تحقیقات مختلف، نقش سلنیوم در پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها نشان داده شده است. سلنیوم جزو کلیدی تعدادی از سلنوپروتئین‌های کاربردی است و در عملکردهای طبیعی بدن دخالت دارد (۶). مهم‌ترین کاربرد شناخته شده این عنصر، نقش آن در ساختمان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز است که عملکرد آنها حذف رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال است (۷). مطالعات اخیر در مورد بررسی عوامل ناباروری نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو عامل عمده ناباروری مردان است. غشای اسپرم به دلیل دارا بودن مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیر اشباع، مستعد پراکسیداسیون لیپیدی است (۸). در تحقیقات نشان داده شده که سلنیوم منجر به بهبود عملکرد تولید مثلی موجوداتی نظیر موش، خوکچه و گوسفند می‌شود (۹). این ماده به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، منجر به کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش باروری می‌شود. سلنیوم یک عنصر ضروری برای باروری است، زیرا استرس اکسیداتیو دلیل عمده اختلال در اسپرم است. میزان سلنیوم موجود در بافت بیضه، محتوای آنتی‌اکسیدانی مایع منی و فعالیت ATP آزی را افزایش می‌دهد (۱۰). نانوذرات سلنیوم به دلیل قابلیت دسترسی بالا و کاهش اثرات سمی، توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده است. نتایج نشان می‌دهند که نانوذرات سلنیوم می‌توانند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان باکاهش خطر سمیت، عمل کنند (۱۱). از آنجا که کلرید کادمیوم اثرات زیانباری را بر بافت بیضه می‌گذارد، ولی نحوه تاثیر آن تا حدود زیادی ناشناخته است. همچنین باتوجه به

شواهد متعدد در خصوص نقش مؤثر نانوسلنیوم در تنظیم اختلالات اکسیداتیو، در این مطالعه تأثیر نانوسلنیوم در پیشگیری از عوارض ناشی از کادمیوم کلرید بر آسیب بیضه در موش‌های صحرایی بررسی شده است.

روش کار

تحقیق تجربی حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (IR.IAU.SRB.REC.1400.284) با رعایت استانداردهای اخلاقی مربوط به کار با حیوان‌های ازمایشگاهی که توسط وزارت بهداشت تدوین شده است، انجام شد. در این مطالعه، از ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار ۸ تا ۱۰ هفته‌ای با محدوده وزنی بین ۲۰۰ تا ۲۳۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. موش‌ها پس از انتقال از شرایط حیوانخانه‌ای طبق استانداردهای شناخته شده (۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی)، از آب و غذای کافی برخوردار بودند (۱۲). با توجه به مطالعاتی که در گذشته انجام شده حیوانات به ۸ گروه ۶ تایی تقسیم شدند (۱۳).

۱- گروه کنترل سالم: دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی به صورت درون صفاقی و آب مقطر به صورت گاواژ.

۲-۴- گروه‌های تجربی سالم: دریافت‌کننده نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ (۱۴).

۵- گروه کنترل نابارور: دریافت‌کننده کلریدکادمیوم در دوز ۰/۰۳ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی (۱۵).

۶-۸- گروه‌های تجربی نابارور: دریافت‌کننده نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵ ، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ همراه با کادمیوم کلرید به صورت داخل صفاقی.

کلرید کادمیوم و نانوسلنیوم در سرم فیزیولوژی حل شد. بعد از ۳۰ روز تیمار حیوانات بیهوش شده و بافت‌های بیضه خارج شدند. بیضه حیوانات هموژن شده و بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPx) و MDA انجام شد (با استفاده از کیت‌های شرکت طب پژوهان رازی، ایران).

آزمایش سنجش مالون دی آلدهید (MDA):

به طور خلاصه نمونه بافتی (۰/۱ گرم) در محلول KCl به نسبت ۱ به ۹ هموژنیزه شد. یک حجم از نمونه هموژنیزه شده با دو حجم از محلول تیوباربیتوریک اسید (شامل تری کلرواستیک اسید، تیوباربیتوریک اسید، هیدروکلریک اسید ترکیب شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و بعداز خنک شدن (به منظور تثبیت تشکیل رنگ) با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس لایه فوقانی شفاف به آرامی برداشته شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و میزان MDA با استفاده از ضریب خاموشی $1/56*10^{5}\ M^{-1}\ Cm^{-1}$ بر حسب مولار محاسبه شد و MDA بر حسب نانو مول بر گرم بافت بیان شد (۱۶).

آزمایش سنجش سوپر اکسید دیسموتاز (SOD):

۲/۴۵ میلی لیتر از محلول معرف SOD به لوله‌های آزمایش اضافه شد. به هر لوله به میزان ۵۰ul از نمونه هموژنیت بافتی همراه با ۴۵۰µl آب مقطر و مقدار ۵۰µl از محلول xanthin oxide اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵ درجه نگه‌داری شدند. مقدار ۵۰µl کلرید مس ($0/8\ mM\ CuCl_2$) به لوله‌ها افزوده شد. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد (۱۳).

(Absorbance Blank - Absorbance Sample) / Absorbance blank) *100%

آزمایش سنجش کاتالاز(CAT):

۲۰ میکرولیتر از هموژنیت بافتی با ۱۸۰ میکرولیتر بافر فسفات رقیق شد، به آنها یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترا اضافه شد. در ادامه ۱ میلی‌لیتر سوبسترا با ۱ میلی‌لیتر محلول مولیبدات مخلوط شده و به آن، ۴۰ میکرولیتر از نمونه‌های هموژنیت بافتی موردنظر به همراه ۱۸۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد و واکنش با اضافه شدن آمونیوم مولیبدات خاتمه یافت. کمپلکس زردرنگ آمونیوم مولیبدات و H_2O_2 ظاهر شد، لوله‌های نامبرده blank1 نام‌گذاری شد.در پایان دو لوله دیگر که blank2 حاوی یک میلی‌لیتر سوبسترا و یک میلی‌لیتر مولیبدات به همراه ۲۰۰

میکرولیتر بافر فسفات بود و blank3 حاوی یک میلی‌لیتر بافر فسفات و یک میلی‌لیتر مولیبدات به همراه دو میلی‌لیتر بافر فسفات بود، تهیه شد. همه لوله‌ها به مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفته و سپس در مقابل بلانک (حاوی بافر فسفات) در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (۱۱).

Catalase activity= (absorbance Blank1 - absorbance sample) / (absorbance Blank2 - absorbanceBlank3)

آزمایش سنجش گلوتاتیون پراکسیداز (GPx):

در این آزمایش ۹۸۰ میکرولیتر محلول کار و ۲۰ میکرولیتر نمونه داخل کووت ریخته شد. مخلوط به مدت پنج دقیقه داخل بن ماری ۳۷ درجه قرار گرفته و سپس ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۸/۸mM به مخلوط اضافه شد. در کووت بلانک ۱ به جای نمونه، مقدار ۲۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد و جذب نوری نمونه و بلانک ۱ در طول موج ۳۴۰ پس از ۳۰ ثانیه، یک و دو دقیقه قرائت شد. برای تعیین آزمایش گلوتاتیون پراکسیداز از ضریب خاموشی $M^{-1}C^{-1}$ ۰/۶۲۲ استفاده شد (۱۱).

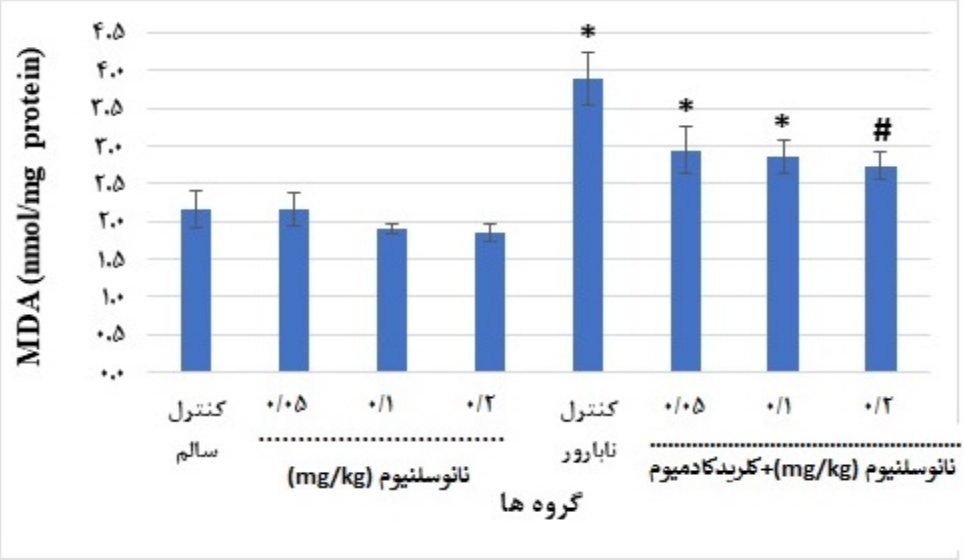
تجزیه و تحلیل آماری:

داده‌های به دست آمده با میکروسکوپ نوری با روش آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) در نرم‌افزار SPSS 22 بررسی شدند. اطلاعات به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) ارائه شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<0.05 معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از سنجش میزان MDA:

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان MDA در گروه کنترل نابارور (۰/۳۴ ± ۳/۸۸) در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معناداری داشته (p<۰/۰۵) و در گروه‌های تجربی نابارور تیمار با نانوسلنیوم با دوز ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۰/۱۷ ± ۲/۷۷) وزن بدن سبب کاهش معنادار میزان MDA در مقایسه با گروه کنترل نابارور شده است (p<۰/۰۵). در حالی که تیمار با نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به حیوانات سالم تغییر معناداری در میزان MDA در مقایسه با کنترل سالم ایجاد نکرده است. همچنین میزان MDA در گروه نابارور دریافت‌کننده نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل نابارور، تغییر معناداری را نشان نداد (نمودار ۱).

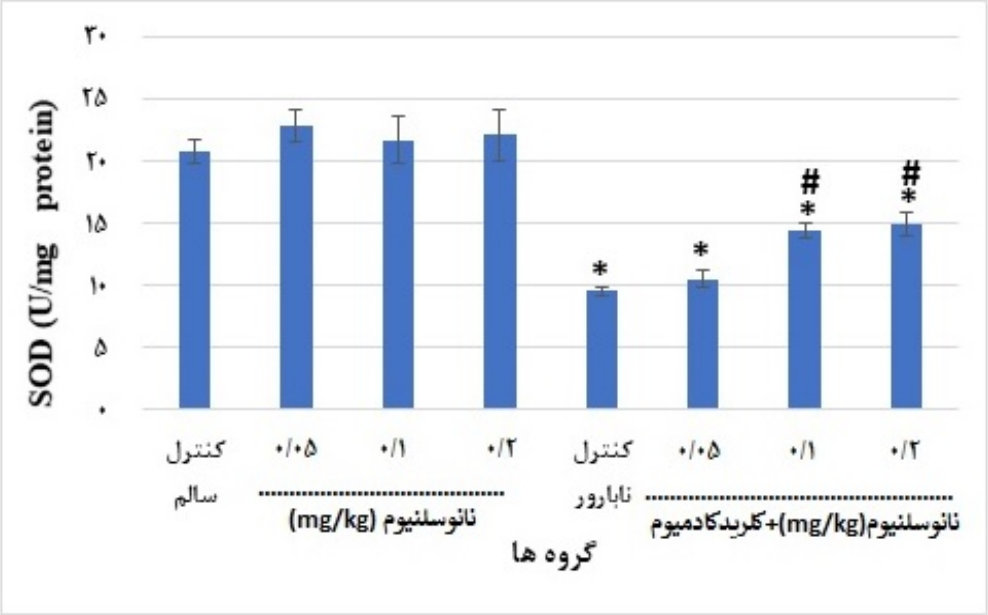


نمودار ۱- میزان MDA را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.

هر ستون بیانگر Mean ± SD برای ۶ سرحیوان است.
علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم است (p<۰/۰۵).
علامت # نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل نابارور است (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از سنجش میزان فعالیت SOD:

همان‌طوری که در نمودار ۲ نشان داده شده، میزان فعالیت SOD در گروه کنترل نابارور (۰/۳۲ ± ۹/۵۱) در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معناداری داشته (p<۰/۰۵) و در گروه‌های تجربی نابارور تیمار با نانوسلنیوم با دوزهای ۰/۱ (۰/۶۲ ± ۱۴/۳۵) و ۰/۲ (۰/۹۹ ± ۱۴/۹۴) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش معنادار میزان SOD در مقایسه با گروه کنترل نابارور شده است (p<۰/۰۵). در حالی که تیمار با نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به حیوانات سالم تغییر معناداری در میزان فعالیت SOD در مقایسه با کنترل سالم ایجاد نکرده است. همچنین میزان فعالیت این آنزیم در گروه نابارور دریافت‌کننده نانوسلنیوم با دوز ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل نابارور، تغییر معناداری را نشان نداد.

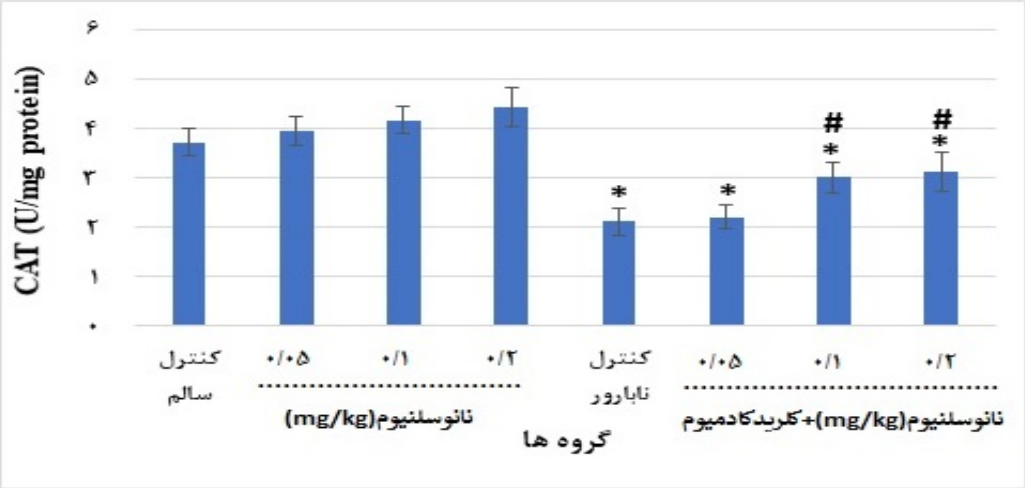


نمودار ۲- میزان فعالیت SOD را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.

هرستون بیانگر Mean ± SD برای شش سرحیوان است.
علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم است (p<۰/۰۵).
علامت # نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل نابارور است (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از سنجش میزان فعالیت CAT:

بررسی میزان فعالیت CAT نشان می‌دهد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه کنترل نابارور (۰/۲۷ ± ۲/۱۲) در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معناداری داشته (p<۰/۰۵) و در گروه‌های تجربی نابارور تیمار با نانوسلنیوم با دوزهای ۰/۱ (۰/۳۱ ± ۳/۰۱) و۰/۲ (۰/۳۹ ± ۳/۱۲) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش معنادار میزان فعالیت CAT در مقایسه با گروه کنترل نابارور شده است (p<۰/۰۵). در حالی که تیمار با نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به حیوانات سالم تغییر معناداری در میزان فعالیتCAT در مقایسه با کنترل سالم ایجاد نکرده است. همچنین میزان فعالیت این آنزیم در گروه نابارور دریافت‌کننده نانوسلنیوم با دوز ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل نابارور، تغییر معناداری را نشان نداد (نمودار ۳) (p<۰/۰۵).

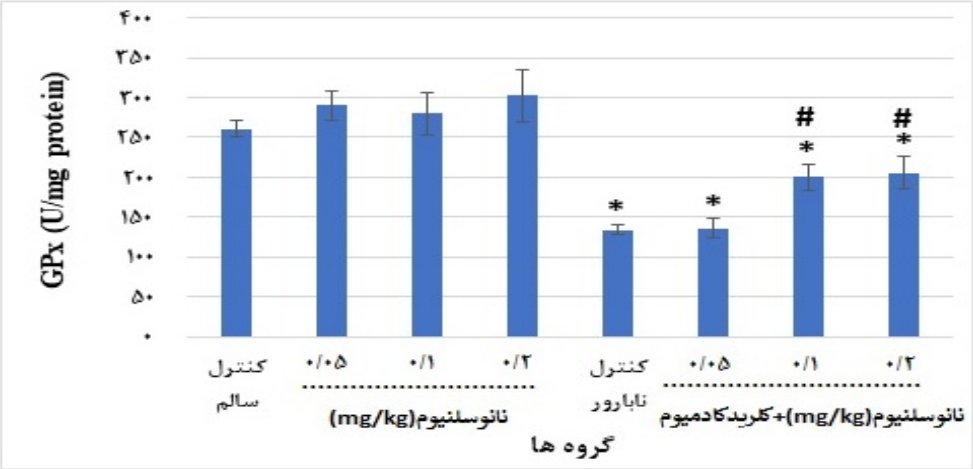


نمودار ۳- میزان فعالیت CAT را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.

هرستون بیانگر Mean ± SD برای شش سرحیوان است.
علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم است (p<۰/۰۵).
علامت # نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل نابارور است (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از سنجش میزان فعالیت GPx:

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت GPx نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه کنترل نابارور (۶/۵۰ ± ۱۳۴) در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معناداری داشته (p<۰/۰۵) و در گروه‌های تجربی نابارور تیمار با نانوسلنیوم با دوزهای ۰/۱ (۱۶/۰۶ ± ۲۰۰/۳۳) و۰/۲ (۲۰/۸۸ ± ۲۰۵/۶۶) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش معنادار میزان فعالیت GPx در مقایسه با گروه کنترل نابارور شده است (p<۰/۰۵). در حالی که تیمار با نانوسلنیوم در دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به حیوانات سالم تغییر معناداری در میزان فعالیت GPx در مقایسه با کنترل سالم ایجاد نکرده است. همچنین میزان فعالیت این آنزیم در گروه نابارور دریافت‌کننده نانوسلنیوم با دوز ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل نابارور، تغییر معناداری را نشان نداد (نمودار ۴) (p<۰/۰۵).



نمودار ۴- میزان فعالیت GPx را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.

هرستون بیانگر Mean ± SD برای شش سرحیوان است.
علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل سالم است (p<۰/۰۵).
علامت # نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل نابارور است (p<۰/۰۵).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان MDA در گروه تیمار شده با کادمیوم کلرید نسبت به گروه کنترل سالم به طور معناداری افزایش یافت. اما در گروه‌های تجربی تیمار شده با نانوسلنیوم نسبت به گروه کنترل نابارور کاهش یافت. همچنین نتایج داد که میزان آنزیم‌های SOD، CAT و GPx بافت بیضه در گروه‌های تیمار شده با نانوسلنیوم با دوزهای ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب بهبود میزان پارامترهای استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه کنترل نابارور شده است.

سنجش MDA به عنوان روش معتبر برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). اسیدهای چرب غیراشباع نسبت به حمله رادیکال‌های آزاد و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی فوق‌العاده حساس و آسیب‌پذیر هستند. رادیکال‌های آزاد با اسیدهای چرب غیراشباع به شکل پراکسید واکنش می‌دهند و سبب پراکسیداسیون لیپید می‌شوند. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید است که نشان‌دهنده سطح پراکسیداسیون لیپیدی است. لازم به ذکر است که MDA رایج‌ترین محصول پراکسیداسیون لیپیدی است (۱۶).

مشخص شده است کادمیوم با تولید نیتریک اکساید و ROS از قبیل رادیکال‌های هیدروکسیل، رادیکال‌های آنیون سوپراکسید و هیدروژن پراکسید که در نهایت سبب افزایش سطح پراکسیداسیون لیپید (MDA) در بیضه می‌شود. کادمیوم همچنین اثرات شدیدی بر روی فعالیت آنزیم‌ها دارد و سبب ایجاد اختلال در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۱۸).

این احتمال وجود دارد که افزایش MDA بافت بیضه در مطالعه حاضر نشانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی حاصل از اعمال استرس اکسیداتیو توسط کادمیوم کلرید باشد. درصورتی که این احتمال درست باشد کاربرد یک آنتی اکسیدان بایستی میزان MDA و بنابراین میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهد. در نتایج پژوهش حاضر مشخص شد که کاربرد مشترک نانوسلنیوم + کادمیوم کلرید، نانوسلنیوم mg/kg ۰/۲ توانست افزایش مالون دی‌آلدهید را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلرید به طور معناداری جبران کند. در این خصوص Salama و همکارانش نشان دادند که کاربرد کورکومین به تنهایی سبب کاهش معنادار پراکسیداسیون لیپید بافت بیضه رت شد (۱۹).

بیضه یکی از ارگان‌های مهم هدف برای نانوسلنیوم است. غلظت سلنیوم بافت بیضه در طول بلوغ با شروع اسپرماتوژنز افزایش می‌یابد. شاید دلیل غلظت بالای سلنیوم در بیضه نقش حمایتی آن در ساختمان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در طول اسپرماتوژنز باشد. سلنیوم در ساخت سلنوپروتئین‌ها شرکت می‌کند. سلنوپروتئین‌ها قسمت عمده‌ای از کپسول میتوکندری ناحیه میانی اسپرم را تشکیل می‌دهند. کمبود سلنیوم در موش صحرایی، منجر به ایجاد تغییر شکل غیر طبیعی اسپرم (دم‌های غیر طبیعی و بی‌حرکت) می‌شود. مشخص شده است که این ناهنجاری‌ها با افزایش شکنندگی کپسول میتوکندری اسپرم ارتباط دارند (۲۰). بنابراین سلنیوم برای ایجاد انرژی برای حرکت اسپرم و همچنین برای اسپرماتوژنز ضروری است.

در تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها دوز مصرفی بسیار مهم است چرا که مشاهده شد موش‌هایی که دوز بالا دریافت کرده بودند، تعداد واکوئل‌های زیادی در مقاطع بافتی بیضه داشتند که این نشان می‌دهد مقادیر بالای سلنیوم سمی است (۲۱). در این موارد سلنیوم خود با تولید ROS سبب توقف سیکل سلولی و افزایش فرایند آپوپتوز می‌شود (۲۲). پس به نظر می‌رسد، آنتی‌اکسیدان ها شمشیر دو لبه‌ای هستند که دوز و مدت زمان مصرف آنها مهم است. استفاده از دوز نامناسب یا دوره کوتاه درمان آنها، حتی اثر معکوس دارد (۲۳).

مطالعات نشان می‌دهند که افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و ROS می‌تواند منجر به تغییر در فیزیولوژی بافت‌ها و در نتیجه آسیب به DNA از طریق اکسیداسیون شود و به طور بالقوه توانایی توقف بلوغ سلول‌های جنسی را نیز دارد (۲۴). همچنین ارتباط بالقوه‌ای بین آسیب اکسیداتیو و عملکرد غیرطبیعی بافت بیضه وجود دارد. استرس اکسیداتیو ممکن است اکثر سلول‌ها زایا را تخریب کند که این تخریب می‌تواند ناشی از آسیب غشاها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و چربی‌ها و DNA باشد که به وسیله ROS ایجاد می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان MDA در گروه تیمار شده با کادمیوم کلرید نسبت به

گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافت که با نتایج تحقیقات گذشته در توافق است. در آزمایش Kara و همکاران هنگامی که کادمیوم کلرید به رت‌های نر و ماده با تزریق زیرجلدی و بر اساس وزن بدن به مدت ۲۴ ساعت داده شد در هر دو جنس کادمیوم سبب افزایش میزان MDA در سرم، کبد و کلیه نسبت به گروه کنترل شد که البته سطح MDA در رت نر بالاتر از رت ماده بود (۲۵).

در آزمایش دیگری وقتی رت‌های نر نژاد Sprague- Dawley با کادمیوم به صورت داخل صفاقی به مدت سه روز تحت تیمار قرار گرفتند، نتایج نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپید در بافت بیضه بود. رت‌های آلبینو بالغ تحت تیمار با کادمیوم کلرید با دوز ۳ mg/kg به مدت ۲۸ روز قرار گرفتند، افزایش معناداری در سطح MDA در بیضه و سرم وکلیه نشان دادند. تیمار رت‌ها با کادمیوم کلرید با دوز ۲ mg/kg- ۰/۵ به مدت ۲۴ ساعت، سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید در بیضه، کلیه، کبد وسرم رت‌ها شد (۲۶).

باتوجه به مطالعات گذشته و نتایج حاصل از سنجش MDA بافت بیضه این طور می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً نانوسلنیوم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با کاهش رادیکال‌های آزاد سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید سرم و بافت بیضه شده است.

در مطالعه حاضر نتایج نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx بافت بیضه در گروه تیمار شده با کادمیوم کلرید نسبت به گروه کنترل سالم به طور معناداری کاهش یافت اما در گروه‌های تجربی تیمار شده با نانوسلنیوم نسبت به گروه کنترل نابارور افزایش یافت که در توافق با نتایج مطالعات گذشته است. Salama و همکاران اثر قرارگیری طولانی‌مدت (دو ماه) در معرض کادمیوم کلرید بر روی بیضه رت‌های آلبینو را بررسی کردند. هنگامی‌که کادمیوم کلرید ازطریق آب آشامیدنی با دوز ۵ mg/l به رت‌های نر داده شد، کاهش معناداری در فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد (۱۹). در مطالعه دیگری که بر روی رت‌های نر بالغ تیمار شده باکادمیوم کلرید با دوز واحد ۰/۴ mg/kg انجام گرفت، کاهش معناداری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه کنترل دیده شد (۱۹). Ren و همکارانش تیمار موش‌ها با کادمیوم کلرید به صورت دهانی با دوز ۵ mg/kg به مدت ۳۵، ۲۵، ۱۵ روز را مورد مطالعه قرار دادند، کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله SOD و GSH-Px را مشاهده کردند (۲۷). تیمار رت‌های نر با کادمیوم کلرید با دوز ۲ ml/kg به صورت زیر جلدی به مدت ۲۵روز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم SOD و GSH-Px و کاتالاز در پلاسما و اریتروسیت را در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری کاهش یافت (۲۸). در مطالعه‌ای که کادمیوم با دوز ۴ mg/kg برای شش روز به موش‌های نر آلبینو نژاد ویستار تجویز شد، کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و گلوتاتیون مشاهده شد (۲۹). در برخی از مطالعات کادمیوم سبب افزایش فعالیت کاتالاز به عنوان یک مکانیسم دفاعی شد که به دلیل افزایش رادیکال‌های آزاد به عنوان یک نتیجه از استرس اکسیداتیو است (۱۹).

در شرایط فیزیولوژی، SOD یک آنزیم دفاعی مهم هست و O_2^- را به H_2O_2 تبدیل می‌کند. کادمیوم ازطریق برهمکنش با Zn^{2+}، Cu^{2+} و Mn^{2+} در مولکول SOD، سبب مهار فعالیت آنزیمSOD می‌شود. بنابراین کاهش فعالیت SOD ممکن است منجر به کاهش تولید H_2O_2 شود و به دنبال کاهش آن، فعالیت کاتالاز کاهش می‌یابد. از آنجا که کاتالاز تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 را بر عهده دارد، بنابراین فعالیت کاتالاز با میزان تولید SOD نسبت مستقیم دارد (۱۸).

فعالیت GSH-Px به شدت به غلظت گلوتاتیون وابسته است. گلوتاتیون در دفع ROS ایجاد شده به وسیله کادمیوم نقش مهمی بازی می‌کند (۱۸). گلوتاتیون قادر است به طورمستقیم با ROSها واکنش دهد و یا به عنوان یک کوفاکتور برای آنزیم GSH-Px عمل کند که این آنزیم سمیت H_2O_2 و هیدروپراکسیدها را کاهش می‌دهد (۳۰). کادمیوم با اتصال به سیستئین موجود در گلوتاتیون سبب کاهش گلوتاتیون یا گروه تیول می‌شود که سبب تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌شود؛ در نتیجه GSH-Px غیر فعال شده و تجزیهH_2O_2 به آب کاهش می‌یابد (۱۸). همچنین آنزیمGST در دفع رادیکال‌های آزاد

نقش مهمی دارد و تحت تاثیر کادمیوم فعالیت آن کاهش می‌یابد. بنابراین با تجمع درون سلولی ROS آسیب بافتی رخ می‌دهد. تصور می‌شود کادمیوم وارد میتوکندری شده و فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها را به وسیله اتصال به گروه‌های تیول یا به وسیله مهار سنتز پروتئین مهار کند. مشخص شده است که با تجویز کادمیوم فعالیت آنزیمδ-ALA-D و مقدار آسکوربیک اسید در بیضه کاهش می‌یابد. آنزیم δ– ALA-D یک متالوآنزیم است که برای حداکثر فعالیت خود به عنصر روی نیاز دارد. احتمالاً یک رقابت مستقیم بین فلزهای دو ظرفیتی از جمله کادمیوم و روی در این آنزیم در پستانداران وجود دارد (۳۱). همچنین با کاهش روی فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز در بیضه ها کاهش می‌یابد. بنابراین با توجه به نتایج دیگران و نتایج گرفته شده از مطالعه حاضر، کادمیوم منجر به کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی کل شده است و این کاهش را احتمالاً می‌توان به اثرات کادمیوم بر القا استرس اکسیداتیو نسبت داد (۳۲) اما تیمار با نانوسلنیوم تا حد زیادی سبب بهبودی اثرات کادمیوم کلرید شده است.

نتیجه‌گیری

بنظر می‌رسد نانوسلنیوم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، قادر است قدرت آنتی‌اکسیدانی کل را افزایش دهد و اثرات سمی کادمیوم کلرید را در خصوص کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی بیضه جبران کند. بنابراین با کاربرد مشترک نانوسلنیوم و کادمیوم کلرید، نانوسلنیوم می‌تواند کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی کل ایجاد شده توسط کادمیوم را نسبت به گروه تیمارشده با کادمیوم کلرید به طور معناداری جبران کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه مقطع دکتری بوده و نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات به عمل می‌آورند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (IR.IAU.SRB.REC.1400.284) با رعایت استانداردهای اخلاقی مربوط به کار با حیوان‌های ازمایشگاهی که توسط وزارت بهداشت تدوین شده است، انجام شد.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

References

1. Mehran A, Sanyal S, Usha K, Anand R. The effect of antioxidants on nicotine and caffeine induced changes in human sperm-an in vitro study. Male Fertility and Lipid Metabolism. 2003:250-67.

2. Arabi M. Analyses of impact of metal ion contamination on carp (Cyprinus carpio L.) gill cell suspensions. Biological Trace Element Research. 2004;100(3):229-45.

3. Arabi M, Anand R, Kanwar U, editors. Analysis of the impact of caffeine on membrane integrity, redox ratio and GST in human ejaculated sperm: Effectiveness of antioxidants: Proceeding of International Congress of Androloy. 2001:1(1):1

4. Atli G, Alptekin Ö, Tükel S, Canli M. Response of catalase activity to Ag+, Cd2+, Cr6+, Cu2+ and Zn2+ in five tissues of freshwater fish Oreochromis niloticus. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2006;143(2):218-24.

5. Bobillier-Chaumont S, Maupoil V, Berthelot A. Metallothionein induction in the liver, kidney, heart and aorta of cadmium and isoproterenol treated rats. Journal of Applied Toxicology. 2006;26(1):47-55.

6. Shi L-g, Yang R-j, Yue W-b, Xun W-j, Zhang C-x, Ren Y-s, et al. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal Reproduction Science. 2010;118(2-4):248-54.

7. Kharazi H, Raigani AV, Etesami B, Khazaei M, Kiani A, Alavi ER, et al. Comparison of anti-oxidant enzymes activity and levels of zinc and selenium in sperm and seminal plasma between fertile and idiopathic infertile men. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences. 2011;14(4):316-27.

8. Eidi M, Pouyan O, Eidi A, Fazaeli R, Dadgar M, Shahmohammadi P, et al. Effect of seminal plasma selenium concentration on semen parameters. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch. 2007;17(2):81-6.

9. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. Reproduction. 2004;127(3):335-42.

10. Mohammadi S, Movahedin M, Mowla SJ. The effects of Selenium on changes in sperm antioxidant capacity in old and adult rats. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2009;14(1):84-91.

11. Zhang J, Wang H, Yan X, Zhang L. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. Life Sciences. 2005;76(10):1099-109.

12. Manzour H, Eidi A, Sotoodehnejadnematalahi F, Zardooz H. Effect of high-fat diet feeding during pregnancy and lactation on basal plasma corticosterone concentration in 6-week old male rat offspring. Pejouhesh dar Pezeshki (Research in Medicine). 2022;46(1):1-8.

13. Khorami H, Eidi A, Mortazavi P, Modaresi M. Effect of sodium molybdate on cadmium-related testicular damage in adult male Wistar rats. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2020;62:126621.

14. El-Kazaz SE, Abo-Samaha MI, Hafez MH, El-Shobokshy SA, Wirtu G. Dietary supplementation of nano-selenium improves reproductive performance, sexual behavior and deposition of selenium in the testis and ovary of Japanese quail. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. 2020;7(4):597.

15. Renugadevi J, Prabu SM. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. Toxicology. 2009;256(1-2):128-34.

16. Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Rafiei Alavi E, Joorabi S. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. Andrologia. 2009;41(6):335-40.

17. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology. 2004;2(1):1-7.

18. Ognjanović BI, Marković SD, Đorđević NZ, Trbojević IS, Štajn AŠ, Saičić ZS. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reproductive Toxicology. 2010;29(2):191-7.

19. Salama A, El-Bahr S. Effect of curcumin on cadmium-induced oxidative testicular damage in rats. JMRI. 2007;28(2):167-73.

20. Jervis KM, Robaire B. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging Brown Norway rat epididymis. Biology of Reproduction. 2004;71(4):1088-95.

21. Sh M, Movahedin M, Mowla S. The effects of selenium antioxidant activity on sperm parameters and testis structure in aging and adult male mice. J Reprod Infertil. 2008;3:230-8.

22. Kaushal N, Bansal MP. Dietary selenium variation-induced oxidative stress modulates CDC2/cyclin B1 expression and apoptosis of germ cells in mice testis. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2007;18(8):553-64.

23. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive Biomedicine Online. 2004;8(6):616-27.

24. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction-Cambrige. 2001;122(4):497-506.

25. Saleh RA, HCLD AA. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Journal of Andrology. 2002;23(6):737-52.

26. Ige SF, Olaleye SB, Akhigbe RE, Akanbi TA, Oyekunle OA ,Udoh U-AS. Testicular toxicity and sperm quality following cadmium exposure in rats: Ameliorative potentials of Allium cepa. Journal of Human Reproductive Sciences. 2012;5(1):37.

27. Ren X-m, Wang G-g, Xu D-q, Luo K, Liu Y-x, Zhong Y-h, et al. The protection of selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. Food and Chemical Toxicology. 2012;50(10):3521-9.

28. Kanter M, Aksu B, Akpolat M, Tarladacalisir YT, Aktas C, Uysal H. Vitamin E protects against oxidative damage caused by cadmium in the blood of rats. Eur J Gen Med. 2009;6(3):154-60.

29. Manna P, Sinha M, Sil PC. Cadmium induced testicular pathophysiology: prophylactic role of taurine. Reproductive Toxicology. 2008;26(3-4):282-91.

30. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Research. 2010;89(1):24-30.

31. Santos FW, Oro T, Zeni G, Rocha JB, do Nascimento PC, Nogueira CW. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. Toxicology Letters. 2004;152(3):255-63.

32. Fakhri S, shakeryan s, Alizadeh A, Shahryari A. Effect of 6 Weeks of High Intensity Interval Training with Nano-curcumin Supplement on Antioxidant Defense and Lipid Peroxidation in Overweight Girls-Clinical Trial. Iranian Journal of Diabetes and Obesity. 2019;11(3):173-80.