

## اثرات استات سرب بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کشت سلول‌های جسم زرد گاو

عاطفه جهانپور<sup>۱</sup>، پژمان میرشکرایی<sup>۲\*</sup>، محمد حیدرپور<sup>۳</sup>، نرگس خالق نیا<sup>۳</sup>

۱. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی و بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۳. قطب علمی سقط جنین و مرگ و میر نوزادان دام‌های نشخوارکنندگان، مشهد- ایران.

دریافت: ۲۰ فروردین‌ماه ۱۴۰۱ پذیرش: ۲۴ مردادماه ۱۴۰۱

### چکیده

سرب فلزی سنگین و به شدت سمی است که می‌تواند تمامی سیستم‌های بدن از جمله سیستم تولیدمثلی را از طریق القای استرس اکسیداتیو تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی مطالعات نشان داده‌اند سلول‌های جسم زرد به دلیل متابولیسم بالا بیشترین حساسیت را به استرس اکسیداتیو دارند. در این مطالعه برای بررسی اثر سرب روی سلول‌های جسم زرد ابتدا با رنگ آمیزی MTT غلظت‌های مناسب از استات سرب انتخاب شد، سپس سلول‌های جسم زرد کشت شده در ۵ پتری دیش در قالب ۵ گروه شامل: گروه کنترل (بدون استات سرب) و گروه‌های تیمار ۱، ۲، ۳ و ۴ با افزودن به ترتیب غلظت‌های ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱ میلی‌مولار استات سرب قرار گرفتند. برای بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو مقادیر MDA، GSH و FRAP اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد میزان GSH در گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه‌های حاوی غلظت ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۴ میلی‌مولار و گروه کنترل بود ( $P < 0/05$ )، همچنین میزان GSH در گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌مولار با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار و گروه کنترل بود ( $P < 0/05$ ). میزان MDA در گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار و گروه کنترل بود ( $P < 0/05$ ). در تست FRAP هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و غلظت‌های مختلف استات سرب مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد استات سرب با غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار بیشترین آسیب را به سلول‌های جسم زرد وارد می‌سازد و در مقابل، مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی را بیش از سایر غلظت‌ها فعال می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** استات سرب، جسم زرد، استرس اکسیداتیو، کشت سلول.

### مقدمه

و روغن‌های سرب‌دار، کف‌پوش سربی (لینولئوم) و آلودگی چراگاه‌های نزدیک کارخانه‌های تصفیه خالص‌سازی فلزات، تشکیل می‌دهند (۲۶). اثرات سمی سرب در بدن را باید به ویژه در دستگاه گوارش، سیستم عصبی مرکزی، اعصاب محیطی و سیستم خون‌ساز جست‌وجو کرد که بروز علائم بالینی مسمومیت با سرب مربوط به همین اثرات است. هرچند سرب بر سیستم ایمنی و دستگاه تناسلی نر و ماده نیز دارای اثرات سمی است (۴۹). مواجهه با سرب می‌تواند سیستم تولیدمثلی حیوان ماده را تحت تأثیر قرار دهد و به شکل عمده موجب اختلال در سیکل‌های تولیدمثلی، کاهش میزان

فلزات بخش مهمی از آلودگی‌ها را به دلیل خواص تجمع‌زیستی، تغییرناپذیر بودن و غیر قابل تجزیه بودن، تشکیل می‌دهند (۷). سرب فلزی سنگین است که در همه جا یافت می‌شود و پس از آهن پرمصرف‌ترین فلز دنیاست (۲۷). سرب می‌تواند بسته به میزان و مدت تماس آن، دامنه وسیعی از اثرات سوء، از مهار آنزیم‌ها تا آسیب‌های شدید سیستمیک یا حتی مرگ را در انسان و حیوانات ایجاد کند (۳۴) و (۴۸). منابع تماس حیوانات با سرب را رنگ‌های با پایه سرب، روکش سربی سیم‌ها، لوله‌های فلزی قدیمی، بنزین



شدند (در این مدت برای هضم آنزیمی بهتر، لوله‌ها هر ۱۰ دقیقه از انکوباتور خارج شده و بخوبی تکان داده شدند) و در ۵ دقیقه آخر ۳۰ میکرولیتر DNAase ۱% (Deoxiribonuclease I) به مخلوط اضافه شد. در مرحله بعد ابتدا سلول‌ها از cell strainer (۷۰ میکرومتر نایلونی) عبور داده شده، با دور ۳۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس ۳ بار با PBS و محلول آنتی بیوتیک شسته و سانتریفیوژ شدند تا گلبول‌های قرمز و آنزیم‌های هضم‌کننده در حد ممکن از محیط خارج شوند. در پایان سلول‌ها به درون پتری دیش شامل محیط DMEM High Glucose، ۱۰ درصد FBS و محلول آنتی بیوتیک منتقل شدند. محیط کشت ابتدا پس از ۲۴ ساعت و در دفعات بعدی هر ۴۸ ساعت تعویض و میزان چسبندگی سلول‌ها و رشد سلولی زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. در پایان زمانی که تراکم سلولی به ۷۰ درصد رسید، پاساژ سلولی به انجام رسید. از هر نمونه از سلول‌ها در پاساژ یک نمونه‌ی فریز تهیه شد. بدین صورت که ۱ ml محلول انجماد (حاوی محیط DMEM High Glucose، ۲۰٪ FBS و ۱۰٪ DMSO) به همراه تعداد یک میلیون سلول به کرایوتیوب منتقل شده و ابتدا یک روز در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد و سپس در ازت مایع با دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای افزودن غلظت‌های مختلف استات سرب (TITRACHEM) به گروه‌های تیمار ابتدا درصد خلوص استات سرب در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد به کمک دستگاه (Spectro, Germany) ICP-OES با دقت  $2 ppm$  اندازه‌گیری گردید و سپس غلظت‌های مختلف سرب (۱۱ غلظت بین ۰/۰۰۰۰۵ تا ۰/۱ میلی‌مولار) به صورت تجربی و بر پایه پژوهش‌های پیشین، به محیط کشت افزوده شد.

در مرحله بعد میزان کشندگی سرب ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد با رنگ آمیزی MTT (Thiazolyl blue tetrazolin) و به روش اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۵۰ نانومتر قرائت و غلظت‌های مناسب انتخاب شد. در پایان ۵ نمونه از سلول‌های جسم زرد کشت داده شده در ۵ گروه قرار داده شدند که شامل: گروه کنترل، گروه ۱ با غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار استات سرب، گروه ۲ با غلظت ۰/۰۰۵

باروری، تأخیر در گیرایی آبستنی و تغییر در تولید و چرخه هورمون‌های تولیدمثلی شود (۳۲)، همچنین مسمومیت با سرب به واسطه تماس با سرب در رحم در زنان، با نازایی، سقط، مرده‌زایی، بیماری و مرگ و میر نوزادان، ارتباط دارد (۱۸ و ۲۲). مطالعات نشان می‌دهد سرب می‌تواند از مسیر تولید گونه‌های فعال اکسیژن و اختلال در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی سیستم تولیدمثلی پستانداران را تحت تأثیر قرار دهد (۱۱ و ۴۳)، در این میان جسم زرد به دلیل فعالیت استروئیدی بالا، عروق خون رسانی زیاد و متعاقب آن مصرف بالای اکسیژن به شدت در معرض تولید و اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار دارد. با توجه به آن که جسم زرد یک فاکتور کلیدی در تنظیم و نگهداری چرخه تولیدمثلی حیوانات است (۳۸)، نبود تعادل آنتی‌اکسیدانی با اثرات مخرب خود بر جسم زرد منجر به کاهش تولید پروژسترون، کاهش باروری، کاهش لانه‌گزینی و کاهش تکامل جنینی می‌شوند (۴).

با توجه به این نتایج درباره اثرات سرب، در طی این پژوهش سعی گردید تا در شرایط *in vitro* اثرات و آسیب‌های اکسیداتیو برآمده از استات سرب روی سلول‌های جسم زرد گاو بررسی گردد و دوز اثرگذار استات سرب در سطح سلول تخمین زده شود.

## مواد و روش کار

تخمندان‌های حاوی جسم زرد در فاز لوتئال میانی (۶-۱۵ روز) ۱۰ دقیقه پس از کشتار در کشتارگاه صنعتی مشهد، انتخاب و جمع‌آوری شدند. جسم زرد در این مرحله دارای قوام، قابل ملامسه و به رنگ نارنجی است. نمونه‌های اخذ شده همراه با سرم فیزیولوژی حاوی پنی‌سیلین و کنار یخ حداکثر طی ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. جسم زرد در آزمایشگاه و زیر هود، به قطعات کمتر از ۱ میلی‌متر خرد شد، سپس بافت‌های قطعه شده برای هضم آنزیمی با کلاژناز، به درون لوله کونیکال حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط DMEM High Glucose، ۶ میلی‌گرم کلاژناز IV و ۳۰ میکرولیتر محلول آنتی بیوتیک (۳ IU / ml پنی‌سیلین، ۳ mg / ml استرپتومایسین و ۰/۰۳ mg / ml آمفوتریپسین B)، افزوده شده و در انکوباتور ۳۹ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۷ درصد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری

مقادیر به دست آمده از هر نمونه بر میزان پروتئین همان نمونه تقسیم شد و شاخص های استرس اکسیداتیو به ازای هر  $\mu\text{g/ml}$  پروتئین محاسبه شد.

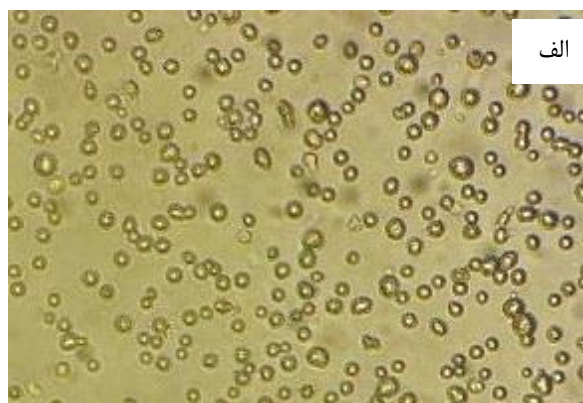
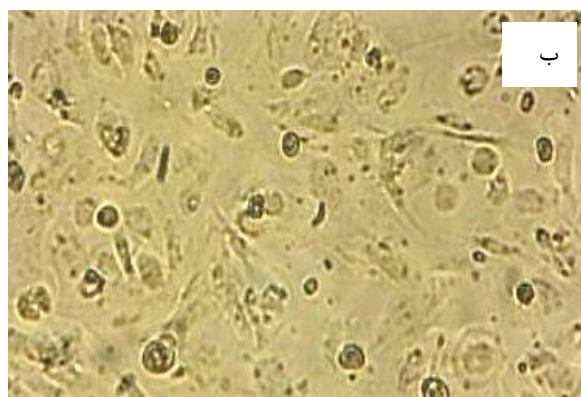
به منظور انجام آزمون های آماری در بین گروه های حاوی غلظت های مختلف استات سرب، ابتدا آزمون نرمال بودن (normality test) انجام گرفت. به دلیل نرمال بودن توزیع داده ها، آزمون آماری One Way ANOVA استفاده شد. در صورت معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها در مقاطع زمانی متفاوت، از آزمون تکمیلی Duncan کمک گرفته شد. برای انجام آزمون های آماری از نرم افزار ۳/۵ Sigma state استفاده شد ( $P < 0/05$ ).

### نتایج

سلول های جسم زرد بعد از مدت زمان حدوداً ۲ هفته مطابق شکل ۱ حدود ۷۰٪ کف پلیت را پر کردند. در این مطالعه ابتدا برای بررسی اثر غلظت های مختلف سرب، رنگ آمیزی MTT انجام شد و غلظت های ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی مولار استات سرب انتخاب شد. غلظت های سرب بالاتر از ۰/۰۰۵ میلی مولار موجب مرگ تمامی سلول ها گردید که حاصل MTT آن صفر شد و غلظت های بیشتر از ۰/۰۰۱ میلی مولار تاثیری در میزان مرگ سلول ها و یا میزان زنده ماندن نداشت (جدول ۱).

میلی مولار استات سرب، گروه ۳ با غلظت ۰/۰۰۲ میلی مولار استات سرب و گروه ۴ با غلظت ۰/۰۰۱ میلی مولار بود.

در پاساژ سه، سلول ها در پتری دیش های ۳ سانتی متری کشت داده شده و غلظت های مذکور استات سرب به سلول ها افزوده شد. ۴۸ ساعت پس از قرار گرفتن سلول ها در محیط حاوی سرب، عصاره سلولی آن ها تهیه گردید و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد برای بررسی میزان استرس اکسیداتیو، شاخص های گلوتاتیون احیا (Glutathione reductase; GSH)، مالون دی آلدهید (Malondialdehyde; MDA) و تست فرپ (Ferric reducing ability of plasma; FRAP) نگاهداری شد. برای تعیین معیاری از تعداد سلول ها در هر پتری دیش کشت سلول، میزان پروتئین تام نمونه ها با دستگاه بیوفتومتر (Eppendorf) و به روش بردفورد اندازه گیری و ثبت شد. اندازه گیری MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی طبق پروتکل Drapper و Hadley ۱۹۹۰ صورت گرفت (۱۶). برای اندازه گیری GSH، مقادیر گروه تیول با استفاده از دستورالعمل Ellman GL ۱۹۵۹ ارزیابی شد (۲۰). مقادیر FRAP به عنوان شاخص ظرفیت تام آنتی اکسیدانی، براساس قدرت احیا فریک-تری یودوتریونین به فرس-تری یودوتریونین در pH پایین و طبق دستورالعمل Benzie و Strain ۱۹۹۶ اندازه گیری شد (۹). پس از ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو،



شکل ۱- الف) سلول های معلق جسم زرد. لحظه اضافه شدن به پتری دیش. ب) سلول های جسم زرد چسبیده به کف پلیت. نمای میکروسکوپ  $\times 10$

**جدول ۱-** میانگین  $\pm$  خطای معیار میزان مرگ سلول‌های جسم زرد گاوی کشت شده در شرایط آزمایشگاهی، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف استات سرب

شماره گروه	غلظت‌های سرب (mM)	OD(جذب نوری) Mean $\pm$ SE
کنترل	۰	۱/۴۷۸ $\pm$ ۰/۱۰۱ <sup>ab</sup>
۱	۰/۰۰۰۰۱	۱/۷۹۷ $\pm$ ۰/۲۸۴ <sup>ab</sup>
۲	۰/۰۰۰۰۵	۱/۸۴۸ $\pm$ ۰/۱۰۱ <sup>ab</sup>
۳	۰/۰۰۰۰۱	۱/۹۰۳ $\pm$ ۰/۳۱۴ <sup>ab</sup>
۴	۰/۰۰۰۰۲	۱/۷۹۶ $\pm$ ۰/۰۳۷ <sup>ab</sup>
۵	۰/۰۰۰۰۵	۱/۹۰۶ $\pm$ ۰/۰۳۷ <sup>ab</sup>
۶	۰/۰۰۰۰۱	۱/۹۰۶ $\pm$ ۰/۱۹۸ <sup>ab</sup>
۷	۰/۰۰۰۰۲	۲/۱۶۴ $\pm$ ۰/۳۵۳ <sup>ab</sup>
۸	۰/۰۰۰۰۴	۲/۵۲۷ $\pm$ ۰/۰۹۸ <sup>a</sup>
۹	۰/۰۰۰۰۵	۱/۹۹۷ $\pm$ ۰/۱۲۴ <sup>a</sup>
۱۰	۰/۰۰۰۰۱	۱/۳۱۱ $\pm$ ۰/۱۹۸ <sup>bc</sup>
۱۱	۰/۰۰۰۰۱	۰ <sup>c</sup>

<sup>abc</sup> حروف متفاوت در بین ردیف‌ها نشانه اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ )

تمام گروه کنترل و گروه‌های تیمار مشاهده نشد، مشخص شد که تعداد سلول‌ها در تمام گروه‌ها برابر بود (جدول ۲).

میزان پروتئین سلولی به عنوان معیاری برای اطمینان از برابر بودن تعداد سلول‌ها در هر گروه اندازه‌گیری شد و با توجه به این که تفاوت معنی‌داری بین مقادیر پروتئین

**جدول ۲-** میزان پروتئین تام سلول‌های جسم زرد گاوی کشت شده در شرایط آزمایشگاهی، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف استات سرب

گروه‌ها	غلظت سرب (mM)	میزان پروتئین تام ( $\mu\text{g/ml}$ )
۱	۰/۰۰۰۰۵	۴۱۱/۶ $\pm$ ۴۳/۴۸۹
۲	۰/۰۰۰۰۴	۴۰۸/۲ $\pm$ ۲۹/۳۳۳
۳	۰/۰۰۰۰۲	۴۳۴ $\pm$ ۴۴/۹۱۳
۴	۰/۰۰۰۰۱	۴۶۷/۲ $\pm$ ۵۳/۸۳۶
کنترل	-	۴۸۰/۷۵ $\pm$ ۴۴/۱۲۲

GSH در گروه ۲ با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه‌های ۳، ۴ و گروه کنترل بود ( $P < 0.05$ )؛ علاوه بر این میزان GSH در گروه ۱ با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه ۴ و گروه کنترل بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۳).

نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد بین مقادیر فرپ در گروه کنترل با مقادیر آن‌ها در گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P < 0.05$ ). طبق نتایج به دست آمده میزان MDA در گروه ۲ با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه ۴ و گروه کنترل بود ( $P < 0.05$ )، همچنین میزان

**جدول ۳-** نتایج تست‌های MDA، FRAP و GSH روی پتری دیش‌های کشت سلول جسم زرد گاوی کشت شده در شرایط آزمایشگاهی، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف استات سرب

شماره گروه	غلظت سرب (میلی مولار)	MDA (nM/ml)	GSH (mM/l)	FRAP ( $\mu$ M)
۱	۰/۰۰۵	$86/4 \times 10^{-5} \pm 8/01 \times 10^{-5}$ ab	$759 \times 10^{-5} \pm 864 \times 10^{-6}$ bc	$480 \times 10^{-4} \pm 745 \times 10^{-5}$ d
۲	۰/۰۰۴	$101 \times 10^{-5} \pm 14/5 \times 10^{-5}$ b	$835 \times 10^{-5} \pm 679 \times 10^{-6}$ c	$451 \times 10^{-4} \pm 638 \times 10^{-5}$ d
۳	۰/۰۰۲	$75 \times 10^{-5} \pm 7/88 \times 10^{-5}$ ab	$599 \times 10^{-5} \pm 647 \times 10^{-6}$ ab	$371 \times 10^{-4} \pm 393 \times 10^{-5}$ d
۴	۰/۰۰۱	$66/2 \times 10^{-5} \pm 8/07 \times 10^{-5}$ a	$517 \times 10^{-5} \pm 832 \times 10^{-6}$ a	$355 \times 10^{-4} \pm 743 \times 10^{-5}$ d
کنترل	-	$57/7 \times 10^{-5} \pm 5/63 \times 10^{-5}$ a	$452 \times 10^{-5} \pm 319 \times 10^{-6}$ a	$342 \times 10^{-4} \pm 734 \times 10^{-5}$ d

abc حروف متفاوت در هر ستون، نشانه اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هاست ( $P < 0/05$ ).

## بحث

مسمومیت با سرب برآمده از تجمع ۵-آمینولونیلینیک اسید (Aminolevulinic acid; ALA) اهمیت بالایی دارد؛ زیرا متابولیت ALA که به دنبال مهار ALA-دهیدراتاز با سرب برپاشده ظرفیت بالایی برای آزادسازی  $Fe^{2+}$  از فریتین و همچنین القای آسیب اکسیداتیو به پروتئین، لیپید و DNA دارد (۲۹ و ۳۹).

بررسی مقادیر MDA که به دنبال پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ایجاد می‌شود، یکی از شاخص‌های متداول برای اندازه‌گیری استرس اکسیداتیو است (۳۷). مطالعات انجام شده روی گروه‌های انسانی نشان داد مقادیر MDA سرمی در افرادی که به طور طولانی مدت در مواجهه با سرب قرار داشته‌اند به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه‌های نرمال بود، همچنین سطوح سرمی MDA در این افراد هم‌بستگی معنی‌داری با مقادیر سرب موجود در خون آن‌ها داشت (۶، ۴۱ و ۴۴). مطالعات انجام شده روی موش‌های نر نشان دادند مواجهه با سطوح مختلف سرب، منجر به افزایش معنی‌داری در مقادیر MDA بیضه و سرم، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه و همچنین کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل SOD (Superoxide dismutase) و CAT (Catalase) سرمی می‌شود (۳۰، ۳۶ و ۴۰). Soltaninejad و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Sandhir و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند در مغز رت‌هایی که به صورت خوراکی و طولانی مدت با استات سرب مواجهه بودند، مقادیر MDA به شکل معنی‌داری بیشتر از مقادیر

با افزایش مقادیر سرب محیطی به بیش از ۱۰۰۰ برابر در سه قرن گذشته، مسمومیت با سرب یکی از اولین و مهم‌ترین خطرات بهداشت محیط محسوب می‌شود (۱ و ۴۲). یافته‌ها نشان دادند فلز سرب می‌تواند اثرات منفی فراوانی روی سیستم تولیدمثلی پستانداران داشته باشد (۴۵ و ۴۵). مطالعات انجام شده روی موش‌های ماده نشان داد که مواجهه با سرب می‌تواند به شکل قابل توجهی منجر به کاهش تعداد فولیکول‌های اولیه (۵۲ و ۵۴)، آترزی و اختلال در رشد فولیکول‌ها (۵۲، ۵۴ و ۱۴)، دم تخمدانی و نکروز فولیکول‌های تخمدان (۱۷ و ۵۳)، بی‌نظمی در سیکل استروس و کاهش میزان باروری شود (۱۴ و ۳۵). Capcarova و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند سرب می‌تواند روی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌های گرانولوزا مؤثر باشد (۱۱). این فلز با مکانیسم‌های متعددی و به شکل مستقیم در بروز استرس اکسیداتیو تأثیرگذار است. سرب می‌تواند با اتصال به غشای سلولی، شکل‌گیری دسته‌هایی از فسفولیپیدهای بارمنفی را که در آن تحرک زنجیرهای آسیل محدود شده تحریک کرده و موجب افزایش نسبی پراکسیداسیون لیپیدی گردد (۲)، همچنین سرب می‌تواند به کمک  $Fe^{2+}$  محرک بروز اکسیداسیون لیپیدها گردد و با جابجایی آن در محل‌های اتصال غشایی منجر به استرس اکسیداتیو شود (۳۹). این روند به ویژه در مواقع



آن می‌شود (۲۱، ۲۵ و ۴۷). مطالعات انسانی نشان داده است مواجهه طولانی مدت افراد با سرب منجر به کاهش مقادیر GSH در خون می‌شود (۲۳). مطالعات حیوانی نیز نشان داده‌اند مواجهه با مقادیر مختلف سرب می‌تواند کاهش معنی‌داری در مقادیر گلوپروتئین احیا در کبد کلیه و مغز ایجاد کند (۱۳ و ۱۹). مطالعه Kucukler و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد تجویز خوراکی سرب به موش منجر به افزایش معنی‌دار مقادیر MDA و کاهش معنی‌داری در مقادیر SOD، CAT، گلوپروتئین پراکسیداز و سطح GSH خون می‌شود (۳۱). Ahamed و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند در مواجهه سلول‌های اپیتلیال ریه با سرب، مقادیر GSH در این سلول‌ها به شکل معنی‌داری کمتر از مقادیر کنترل بود (۳). همچنین مطالعه انجام شده روی سلول‌های نوروبلاستوما انسانی نشان می‌دهد سرب با کاهش در مقادیر گلوپروتئین منجر به بروز استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۲). در مطالعه حاضر بر خلاف مطالعات پیشین میزان GSH در تمامی گروه‌ها بیشتر از گروه کنترل بود. مقادیر GSH در گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار از تمامی گروه‌ها بیشتر و با اختلاف معنی‌داری از گروه‌های حاوی غلظت ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۴ میلی‌مولار و گروه کنترل بالاتر بود ( $P < 0/05$ ). با توجه به نتایج حاضر به نظر می‌رسد که تمامی غلظت‌های استات سرب موجب تولید رادیکال‌های آزاد و متعاقباً استرس اکسیداتیو در سلول‌های جسم زرد شده‌اند، اما در همه گروه‌ها به جز گروه ۰/۰۰۴ میلی‌مولار استات سرب، سلول‌ها توانسته‌اند با تولید GSH از خود محافظت کنند. در بین غلظت‌های این مطالعه، غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار استات سرب بیشترین استرس اکسیداتیو را به سلول‌های جسم زرد وارد ساخته است؛ زیرا افزایش معنی‌دار MDA در این غلظت از استات سرب در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید که حاکی از پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اکسیداتیو به سلول‌هاست، بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش آنتی‌اکسیدان‌هایی از قبیل GSH در غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار استات سرب در حدی نبوده که مانع آسیب اکسیداتیو سلول‌های جسم زرد شود.

مطالعات انجام شده نشان دادند در مواجهه با سرب مقادیر فرپ در سرم خون موش‌ها به شکل معنی‌داری کاهش می‌یابد و عنوان کردند که این کاهش می‌تواند به

آن در گروه کنترل بود (۴۶ و ۵۱). در برابر، Annabi و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشاهده کردند که مواجهه موش‌ها به مدت ۷ روز با سرب تزریقی نتوانست تغییرات معنی‌داری در مقادیر MDA کبدی ایجاد کند و نتیجه گرفت این می‌تواند برآمده از مدت زمان کوتاه مواجهه با سرب بوده باشد (۱۰). Ding و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه خود نشان دادند مواجهه سلول‌های اندوتلیال آئورت با غلظت ۱ ppm سرب پس از ۲۴ ساعت و غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰/۰۵ ppm پس از ۴۸ ساعت به شکل معنی‌داری منجر به افزایش مقادیر MDA شد، همچنین میزان تولید رادیکال هیدروکسیل در غلظت ۱ ppm پس از ۴۸ ساعت به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرد. این نتایج نشان می‌دهد مواجهه با سرب منجر به تولید گونه‌های فعال هیدروکسیل و القای استرس اکسیداتیو در سلول‌های اندوتلیال آئورت شده است (۱۵). Xue-wen و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای برای پی بردن به اثرات سمی استات سرب روی سلول‌های عصبی نشان دادند مواجهه با دوزهای بالای ۲ mM استات سرب بعد از ۷۲ ساعت می‌تواند موجب تخریب فیبرهای سلول‌های عصبی شود (۵۵)، همچنین Lu و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند مواجهه سرب با سلول‌های اپیتلیال ریه با غلظت ۱۰۰ μM موجب افزایش تولید ROS (Reactive oxygen species) در این سلول‌ها می‌شود (۳۳). در مطالعه حاضر نیز هرچند سرب در تمامی گروه‌های تحت تیمار موجب افزایش میزان MDA نسبت به گروه کنترل شد، ولی صرفاً در گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار با اختلاف معنی‌داری بیشتر از گروه حاوی غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار و گروه کنترل بود ( $P < 0/05$ ). می‌توان نتیجه گرفت که استات سرب در همه غلظت‌ها موجب پروکسیداسیون لیپیدهای سلول‌های جسم زرد می‌شود، اما در بین غلظت‌های استفاده شده در این مطالعه، غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌مولار بیشترین آسیب را به سلول‌های جسم زرد وارد می‌سازد.

GSH که یک تری پپتید حاوی گروه -SH- واکنشی است نقش مهمی در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند (۲۴). در موارد مواجهه با سرب، این ترکیب انحصاراً به گروه -SH- باند شده، منجر به کاهش سطوح GSH و همچنین تداخل در فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مرگ تمام سلول‌های جسم زرد می‌شود و غلظت‌های پایین‌تر از ۰,۰۰۱ میلی مولار اثری روی سلول‌های جسم زرد ندارد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی سلول را فعال نمی‌کند.

### قدردانی و تشکر

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد برای تامین هزینه‌های طرح شماره ۳۳۵۲۰ کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آوریم.

### منابع

- 1- Abadin, H; Ashizawa, A; Stevens, Y.W; Lladós, F; Diamond, G; Sage, G; Citra, M; Quinones, A; Bosch, S.J; Swarts, S.G; Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2007; 1:1-528.
- 2- Adonaylo, V.N; Oteiza, P.I; Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*; 1999; 135(2-3):77-85.
- 3- Ahamed, M; Akhtar, M.J; Alhadlaq, H.A; Preventive effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on heavy metal Pb-induced toxicity in human lung epithelial (A549) cells. *Toxicology In Vitro*; 2019; 57:18-27.
- 4- Al-Gubory, K.H; Garrel, C; Faure, P; Sugino, N; Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive biomedicine online*. 2012; 25(6):551-560.
- 5- Al-Saleh, I; Coskun, S; Mashhour, A; Shinwari, N; El-Doush, I; Billedo, G; Jaroudi, K; Al-Shahrani, A; Al-Kabra, M; Mohamed, G.E; Exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) and its effect on the outcome of in-vitro fertilization treatment. *International journal of hygiene and environmental health*; 2008; 211(5-6):560-579.
- 6- Al-Ubaidy, B; Al-Khashali, D.K; Numan, N.A; The role of oxidative stress in lead poisoning. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences* ; 2006; 15(1):70-75.
- 7- Anjum, M.R; Sainath, S.B; Suneetha, Y; Reddy, P.S; Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*; 2011; 74(4):793-799.

دنبال مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها برای به دام انداختن رادیکال‌های آزاد برپاشده، رخ داده باشد (۲۸ و ۵۰)، در حالی که Baghshian و همکاران در سال ۲۰۲۰ هم‌راستا با مطالعه حاضر، بیان کردند تجویز سرب به موش اگرچه تغییر معنی‌داری در مقادیر MDA و گلووتاتیون سرم خون ایجاد می‌کند، اما نمی‌تواند تغییر معنی‌داری در مقادیر فرپ در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کند (۸). در مطالعه حاضر نیز تست FRAP هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نشان نداد. GSH جزء آنتی اکسیدان‌های غیرپروتئینی داخل سلولی است، اما FRAP شامل آنتی اکسیدان‌های پروتئینی است و بخش عمده آن مربوط به پروتئین آلبومین است. با توجه به موارد یاد شده به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر آنتی اکسیدان‌های غیرپروتئینی داخل سلولی به تنهایی توانسته‌اند رادیکال‌های آزاد تولید شده در غلظت‌های این مطالعه را خنثی کنند و یا به عبارتی استرس اکسیداتیو در هیچ کدام از این غلظت‌ها به حدی زیاد نبوده که نیازی به آنتی‌اکسیدان‌های پروتئینی باشد، بنابراین میزان FRAP اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها ندارد و GSH داخل سلولی به تنهایی توانسته است رادیکال‌های آزاد را خنثی کند؛ علاوه بر این شاید امکان افزایش این آنتی‌اکسیدان‌ها برخلاف سرم در شرایط کشت سلول وجود نداشته باشد و به همین دلیل میزان FRAP تغییری نکرده است.

در مجموع، امروزه با توجه به افزایش روزافزون مواجهه با منابع سرب و با توجه به اثرات سمی سرب بر سیستم تولیدمثلی حیوان ماده، لزوم توجه بیشتر به استفاده از داده‌های محاسبه شده و طراحی روش‌هایی به منظور بررسی مکانیسم‌های احتمالی اثرگذار سرب، بیشتر از قبل قابل لمس است، از این رو مطالعه حاضر تلاش کرده‌است با در نظر گرفتن اندک پژوهش‌های پیشین، میزان آسیب پذیری و همچنین مسیرهای احتمالی آسیب زا را در سلول‌های جسم زرد گاو در مواجهه با سرب ارزیابی کند. براساس نتایج حاصل از این مطالعه استات سرب با غلظت ۰/۰۰۴ میلی مولار بیشترین آسیب را به سلول‌های جسم زرد وارد می‌سازد و در برابر مکانیسم‌های دفاع آنتی اکسیدانی را بیش از سایر غلظت‌ها فعال می‌کند. غلظت‌های بالاتر از ۰,۰۰۵ میلی مولار موجب



- acetylcysteine. *Free Radical Biology and Medicine*; 1996; 21(2):157-61.
- 20- Ellman, G.L; Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*; 1959; 82:70-7.
  - 21- Gong, Z; Evans, H.L; Effect of Chelation with meso-Dimercaptosuccinic Acid (DMSA) before and after the Appearance of Lead-Induced Neurotoxicity in the Rat. *Toxicology and applied pharmacology*; 1997; 144(2):205-14.
  - 22- Goyer, R.A; Lead toxicity: current concerns. *Environmental health perspectives*; 1993 ; 100:177-87.
  - 23- Gurer-Orhan, H; Sabir, H.U; Özgüneş, H; Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*; 2004; 195(2-3):147-54.
  - 24- Gürer, H; Özgüneş, H; Neal, R; Spitz, D.R; Erçal, N; Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology*; 1998; 128(3):181-9.
  - 25- Gurer, H; Ercal, N; Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free Radical Biology and Medicine*; 2000; 29(10):927-45.
  - 26- Gwaltney-Brant, S; Metal and mineral. In: Plumlee, K; *Clinical veterinary toxicology*; 1st ed. Elsevier Health Sciences. United States; 2003: 205-206
  - 27- Hammond, C.R; Properties of elements and inorganic compounds. In: Haynes, W.M; *CRC handbook of chemistry and physics*; 95th ed. CRC press. USA; 2014: 20
  - 28- Hasanein, P; Riahi, H; Preventive use of berberine in inhibition of lead-induced renal injury in rats. *Environmental science and pollution research*; 2018; 25(5):4896-903.
  - 29- Hermes-Lima, M; Pereira, B; Bechara, E.J; Are free radicals involved in lead poisoning?. *Xenobiotica*; 1991; 21(8):1085-90.
  - 30- Kosari, A; Dabidi-Roshan, V; Hosseinzadeh-Colagar A; Environmental pollution and the reproductive system: Beneficial effect of treadmill running and curcumin supplementation. *Iranian Journal of Health and Physical activity*; 2012; 3(1):62-68.
  - 31- Kucukler, S; Benzer, F; Yildirim, S; Gur, C; Kandemir, F.M; Bengu, A.S; Ayna, A; Caglayan, C; Dortbudak, M.B; Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biological Trace Element Research*; 2021; 199(4):1501-14.
  - 32- Kumar, S; Occupational and environmental exposure to lead and reproductive health
  - 8- Baghshan, H; LotfiGhahramanloo, M; Evaluation of lead-induced cardiac toxicity in mice by measurement of selected biochemical as well as oxidative indices. *Comparative Clinical Pathology*; 2020; 6:1165-1171.
  - 9- Benzie, I.F; Strain, J.J; The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*; 1996; 239(1):70-76.
  - 10- Berrahal, A.A; Nehdi, A; Hajjaji, N; Gharbi, N; El-Fazâa, S; Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes rendus biologiques*; 2007; 330(8):581-588.
  - 11- Capcarova, M; Kolesarova, A; Lukac, N; Sirotkin, A; Roychoudhury, S; Antioxidant status and selected biochemical parameters of porcine ovarian granulosa cells exposed to lead in vitro. *Journal of Environmental Science and Health Part A*; 2009; 44(14):1617-1623.
  - 12- Chetty, C.S; Vemuri, M.C; Campbell, K; Suresh, C; Lead-induced cell death of human neuroblastoma cells involves GSH deprivation. *Cellular and Molecular Biology Letters*; 2005; 10(3):413.
  - 13- Dai, J; Zhang, L; Du, X; Zhang, P; Li, W; Guo, X; Li, Y; Effect of lead on antioxidant ability and immune responses of crucian carp. *Biological trace element research*; 2018; 186(2):546-553.
  - 14- Dhir, V; Dhand, P; Toxicological approach in chronic exposure to lead on reproductive functions in female rats (*Rattus norvegicus*). *Toxicology international*; 2010; 17(1):1.
  - 15- Ding, Y; Gonick, HC; Vaziri, ND; Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *American Journal of Hypertension*; 2000; 13(5):552-5.
  - 16- Draper, HH; Hadley, M; Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*; 1990; 186:421-31.
  - 17- Dumitrescu, E; Chiurciu, V; Muselin, F; Popescu, R; Brezovan, D; Cristina, R.T; Effects of long-term exposure of female rats to low levels of lead: ovary and uterus histological architecture changes. *Turkish Journal of Biology*; 2015; 39(2):284-9.
  - 18- Eisler, R; Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Fish and Wildlife Service, US Department of the Interior*; 1987; 85(1.11):81.
  - 19- Ercal, N; Treeratphan, P; Hammond, T.C; Matthews, R.H; Grannemann, N.H; Spitz, D.R; In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid or N-



- 44- Rao, G.M; shetty, B.V; Sudha, K; Evaluation of lead toxicity and anti-oxidants in battery workers. *Biomedical Reseach*; 2007; 19(1):1-4.
- 45- Ronis, M.J; Badger, T.M; Shema, S.J; Roberson, P.K; Shaikh, F; Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicology and applied pharmacology*; 1996; 136(2):361-71.
- 46- Sandhir, R; Julka, D; Gill, K; Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacology & toxicology*; 1994; 74(2):66-71.
- 47- Sandhir, R; Gill, K; Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biological trace element research*; 1995; 48(1):91-7.
- 48- Sanín, L; González-Cossío, T; Romieu, I; Hernández-Avila, M; Accumulation of lead in bone and its effects on health. *Salud publica de Mexico*; 1997; 40(4):359-68.
- 49- Smith, J.A; Noninfectious diseases, metabolic diseases, toxicities, and neoplastic diseases of South American camelids. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 1989; 5(1):101-43.
- 50- Soleimanzadeh, A; Kian, M; Moradi, S; Malekifard, F; Protective effects of hydro-alcoholic extract of *Quercus brantii* against lead-induced oxidative stress in the reproductive system of male mice. *Avicenna journal of phytomedicine*; 2018; 8(5):448.
- 51- Soltaninejad, K; Kebriaeezadeh, A; Minaiee, B; Ostad, SN; Hosseini, R; Azizi, E; et al; Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Human & experimental toxicology*; 2003; 22(8):417-23.
- 52- Taupeau, C; Poupon, J; Nomé, F; Lefèvre, B; Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reproductive toxicology*; 2001; 15(4):385-91.
- 53- Uchewa, O.O; Ezugworie, O.J; Countering the effects of lead as an environmental toxicant on the microanatomy of female reproductive system of adult wistar rats using aqueous extract of *Ficus vogelii*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*; 2019; 52:192-8.
- 54- Waseem, N; Butt, S.A; Hamid, S; Amelioration of lead induced changes in ovary of mice, by garlic extract. *Journal of Pakistan Medical Association* ; 2014; 64(7):798-801.
- 55- Xue-wen, W; Da-lian, D; Hong, S; Hong, L; Hai-yan, J; Salvi, R; Lead neurotoxicity in rat cochlear organotypic cultures. *Journal of otology*; 2011; 6(2):43-50.
- 33- Lu, C.F; Yuan, X.Y; Li, L.Z; Zhou, W; Zhao, J; Wang, Y.M; Peng, S.Q; Combined exposure to nano-silica and lead induced potentiation of oxidative stress and DNA damage in human lung epithelial cells. *Ecotoxicology and environmental safety*; 2015; 122:537-44.
- 34- Mahaffey, K.R; Nutritional factors in lead poisoning. *Nutrition reviews*; 1981; 39(10):353-62.
- 35- Massányi, P; Massányi, M; Madeddu, R; Stawarz, R; Lukáč, N; Effects of cadmium, lead, and mercury on the structure and function of reproductive organs. *Toxics*; 2020; 8(4):94.
- 36- Moniem, A.E.A; Dkhil, M.A; Al-Quraishy, S; Protective role of flaxseed oil against lead acetate induced oxidative stress in testes of adult rats. *African Journal of Biotechnology*; 2010; 9(42):7216-23.
- 37- Nair, V; Cooper, C.S; Vietti, D.E; Turner, G.A; The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids*; 1986; 21(1):6-10.
- 38- Nara, B; Darmadja, D; First, N; Effect of removal of follicles, corpora lutea or ovaries on maintenance of pregnancy in swine. *Journal of animal science*; 1981; 52(4):794-801.
- 39- Oteiza, P.I; Kleinman, C.G; Demasi, M; Bechara, E.J; 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 1995; 316(1):607-11.
- 40- Pandya, C; Pillai, P; Nampoothiri, L; Bhatt, N; Gupta, S; Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Andrologia*; 2012; 44(1):813-22.
- 41- Patil, A.J; Bhagwat, V.R; Patil, J.A; Dongre, N.N; Ambekar, J.G; Jailkhani, R; Das, K.K; Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. *International journal of environmental research and public health*; 2006; 3(4):329-37.
- 42- Payal, B; Kaur, H; Rai, D; New insight into the effects of lead modulation on antioxidant defense mechanism and trace element concentration in rat bone. *Interdisciplinary toxicology*; 2009; 2(1):18-23.
- 43- Qu, J; Niu, H; Wang, J; Wang, Q; Li, Y; A review on the Potential Mechanism of Lead Poisoning to the growth and development of ovarian follicle. *Toxicology*; 2021: 152810.



## Effects of Lead on Oxidative Stress Parameters in Bovine Luteal Cells Culture

Atefe Jahanpour<sup>1</sup>; Pezhman Mirshokraei<sup>2,3\*</sup>; Mohammad heidarpour<sup>2,3</sup>;  
Narges Khaleghnia<sup>3</sup>

1. Graduate Student, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.
3. Center of Excellence in Ruminant Abortion and Neonatal Mortality, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.

### Summary

*Received:* 5 April 2022

*Accepted:* 15 August 2022

Lead is a highly toxic and heavy metal that through the induction of oxidative stress could influence all systems, especially the reproductive system in the body. Furthermore, studies revealed that luteum cells, due to their high rate of metabolism, are more susceptible to oxidative stress. In the present study, to evaluate the lead effect on luteal cells, first, the proper concentrations of lead acetate were chosen by MTT staining. Then, five culture plates of corpus luteum cells were ordered into five groups consisting of the control group (without lead acetate), group 1, group 2, group 3, and 4, respectively, with concentrations of 0.005, 0.004, 0.002, and 0.001 mM of lead acetate. To assess variations of oxidative stress parameters, values of MDA, GSH and FRAP were measured. The results study present showed that the value of GSH in the group with the concentration of 0.004 mM lead acetate was significantly ( $P<0.05$ ) more than the control group and groups with 0.001- and 0.002-mM concentrations. Moreover, the value of GSH in the group with 0.005 mM concentration was significantly ( $P<0.05$ ) more than the group with 0.001 mM concentration and the control group. Value of MDA in the group containing 0.004 mM concentration by significant difference ( $P<0.05$ ) was more than the group containing 0.001 mm and the control group. In the FRAP test, no significant difference among the control group and other concentrations of lead acetate was observed. Results of the present study suggest that lead acetate with the concentration of 0.004 mM could induce the most damage on the corpus luteum cells and, in return, compared with the other concentrations, has the most effect on activating antioxidant defense mechanisms

**Keywords:** lead Acetate, corpus luteum, Oxidative stress, cell culture

\*Corresponding author: [mirshokraei@um.ac.ir](mailto:mirshokraei@um.ac.ir)

