نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۴ شماره ۴/ سال۱۳۹۳

نقش حفاظتی سیلیمارین بر قابلیت حیات، قابلیت تحرک و تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ تیمار شده با کادمیوم کلراید

حمید رضا مؤمنی*[۱]، عاطفه خاوری[۲]، مهدی خدایی مطلق[۳]، طاهره چوبینه[۲] و نجمه اسکندری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۲

[۱] دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

[۲] کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

*مسئول مکاتبه: Email: h-momeni@araku.ac.ir

چکیده

کادمیوم به عنوان یک آلاینده زیست محیطی از طریق القا استرس اکسیداتیو تاثیرات مخربی را بر روند اسپرماتوژنز و مورفولوژی اسپرم می‌گذارد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات کادمیوم بر قابلیت حیات، قابلیت تحرک و تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ فراهانی و همچنین بررسی نقش محافظتی سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر اثرات سمی کادمیوم صورت گرفت. اسپرم‌های گرفته شده از اپی‌دیدیم قوچ فراهانی به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- اسپرم‌های لحظه صفر، ۲-اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳- اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید بـه مدت ۱۸۰ دقیقه و ٤- اسپرم‌های تیمار توام سیلیمارین+ کادمیوم کلراید به مدت ۱۸۰ دقیقه. جهت بررسی قابلیت حیات اسپرم از سنجش MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. قابلیت تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی انجام شد و بـرای ارزیابی تمامیت آکروزوم رنگ آمیزی Comassie Brilliant Blue مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه شده با تست توکی صورت گرفت. درصد قابلیت حیات، قابلیت تحرک و تمامیت آکروزوم در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین با کادمیوم کلراید توانست این اثرات را (به جز قابلیت تحرک) نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید به طور معنی‌داری جبران کند. سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر برخی از پارامترهای اسپرم قوچ مهار نماید.

واژه‌های کلیدی: سیلیمارین، کادمیوم کلراید، تمامیت آکروزوم، قابلیت حیات و تحرک اسپرم، اسپرم قوچ فراهانی

مقدمه

کادمیوم یکی از عناصر سمی است که در محیط اطراف ما وجود دارد و با توجه به نیمه عمر طولانی آن، اثرات زیان‌باری روی بدن انسان می‌گذارد. این عنصر از طریق شستشو توسط آب، در رودخانه و دریاها وارد شده و می‌تواند از طریق آب وارد گیاهان شود. کادمیوم در صنعت استفاده‌های فراوانی دارد که از جمله می‌توان به کاربرد آن در تولید باتری‌ها، تولید رنگ‌ها، آب‌کاری فلزات، صنایع نظامی، کودها و مواد ثبات بخش در پلاستیک اشاره نمود. همچنین کادمیوم می‌تواند از طریق

مواد مصرفی مانند غذا، آب، هوا و دخانیات وارد بدن انسان شود (مونتا و بودو ۱۹۹۲). تحقیقات نشان می‌دهند که تجمع کادمیوم در بدن با ایجاد مسمومیت و آسیب به ارگان‌هایی مانند کبد، ریه و دستگاه تناسلی مردانه همراه است (پانتیاگو-کاسترو و همکاران ۲۰۰۸). هموراژی شدید بافت بیضه، ادم و نکروز همراه با تخریب لوله‌های اسپرم ساز آسیب‌هایی است که در اثر تزریق کادمیوم، در بافت بیضه ایجاد می‌شود (ویو و همکاران ۲۰۰۸). تحقیقات نشان می‌دهند که کادمیوم باعث کاهش تعداد اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و آسیب غیر قابل برگشت به اپی‌تلیوم ژرمینال می‌شود (زو و همکاران ۲۰۰۱).

همچنین مشخص شده که کادمیوم باعث کاهش تولید هورمون تستوسترون می‌شود (نمیچ و همکاران ۲۰۰۷). القا استرس اکسیداتیو با افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن یکی از مکانیسم‌های مطرح در ایجاد آسیب به بافت بیضه توسط کادمیوم است. در این خصوص گزارشی مبنی بر ارتباط بین انباشتگی گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر ROS[1] با کاهش تعداد و تحرک اسپرم وجود دارد (عربی ۲۰۰۶). بدین ترتیب آلاینده‌های زیست محیطی از جمله کادمیوم با القا استرس اکسیداتیو می‌توانند بر روند تولید اسپرم و همچنین با تأثیر گذاری مستقیم بر روی اسپرم موجب ناباروری شوند. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به خصوص آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با هدف حذف رادیکال‌های آزاد و همچنین تقویت سیستم دفاعی در دستگاه تناسلی می‌تواند به عنوان یک استراتژی مناسب برای مهار یا حداقل کاهش اثرات مخرب ناشی از استرس اکسیداتیو برای جلوگیری از روند ناباروری مطرح باشد.

سیلیمارین فلاونوئیدی است که به عنوان ماده موثر دانه گیاه ماریتیغال یا خار مریم (*Silybum marianum*) شناخته شده (فراسچینی و همکاران ۲۰۰٤آ) و دارای اثرات دارویی متعددی از جمله خاصیت ضد التهابی و ضد سرطانی می‌باشد (فیرنزولی و همکاران۲۰۰٤). علاوه بر این، سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی (فراسچینی و همکاران ۲۰۰۲ب)، تنظیم کننده مقدار گلوتاتیون داخل سلولی و تثبیت کننده غشاء سلولی مطرح است (باسیگلو و همکاران ۲۰۰۹). خاصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین به خاطر ساختمان پلی فنلی به همراه گروه متوکسی موجود بر روی یکی از حلقه‌های فنلی می‌باشد (کید ۲۰۰۹). اثرات حفاظت سلولی سیلیمارین وابسته به خواص آنتی‌اکسیدانی و جارو کردن رادیکال‌های آزاد آن می‌باشد و می‌تواند به طور مستقیم با اجزاء غشاء سلولی واکنش داده و سبب جلوگیری از هر گونه ناهنجاری در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت طبیعی غشاء گردد

(پرادهان و گیریش ۲۰۰٦). سیلیمارین با این خاصیت قادر است از فرآیندهای پراکسیداسیون دخیل در ضایعات کبدی ناشی از تتراکلرورکربن، تالیوم، اتانول، پاراستامول و سایر مواد سمی کبدی پیشگیری کند (مورل و همکاران ۱۹۸۹).

عواملی همچون قابلیت حیات، قابلیت تحرک و سلامت آکروزوم به عنوان فاکتورهای کلیدی در سلامت اسپرم محسوب می‌شوند و می‌توانند تضمین کننده لقاح موثر اسپرم با تخمک باشند. این پارامترهای اسپرم نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس بوده و اختلال در آن‌ها می‌تواند تولید مثل انسان و دام را به مخاطره بیاندازد. با توجه به اثرات سمی کادمیوم بر دستگاه تولید مثل نر و این که این اثرات احتمالا از طریق القا استرس اکسیداتیو اعمال می‌شود، این پژوهش با این هدف انجام شد تا مشخص نماید که آیا سیلیمارین قادر است اثرات مخرب کادمیوم بر قابلیت حیات، قابلیت تحرک و سلامت آکروزوم اسپرم قوچ را مهار نماید.

1. Reactive Oxygen Species

مواد و روش‌ها

آماده سازی اسپرم: در این تحقیق بیضه‌های قوچ فراهانیOvis aries بعد از ذبح از کشتارگاه اراک تهیه و در مجاورت یخ کمتر از ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی منتقل گردید. ابتدا چند برش در ناحیه دم اپی‌دیدیم ایجاد کرده و سپس اسپرم‌ها با سرنگ حاوی محیط کشت Ham´s F10 داخل لوله فالکون استریل وارد شدند. به منظور Swim up شدن اسپرم‌ها، لوله‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

گروه بندی و تیمار اسپرم‌ها: نمونه‌های اسپرمSwim up شده شمارش و در لوله‌های اپندروف جداگانه تفکیک شد به طوری که سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت هر لوله حاوی ۵×۱۰^{۶} اسپرم بود. شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی سلامت[2]WHO (سازمان بهداشت جهانی ۲۰۰۱) انجام شد. سپس لوله‌ها به چهار گروه (n=۶ برای هر گروه) تقسیم شدند: ۱- اسپرم‌های لحظه صفر، ۲- اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳- اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید به مدت ۱۸۰ دقیقه و ٤- اسپرم‌های تیمار توأم سیلیمارین (سیگما، آمریکا)+ کادمیوم کلراید (سیلیمارین ۱۵ دقیقه قبل از کادمیوم کلراید مورد استفاده قرار گرفت) به مدت ۱۸۰ دقیقه. نمونه‌های کنترل و تیمار برای زمان گفته شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جهت غلظت یابی و یافتن غلظت موثر، کادمیوم کلراید با غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار و سیلیمارین با غلظت‌های۳، ۵ و ۱۰ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی قابلیت حیات: جهت ارزیابی قابلیت حیات اسپرم از سنجش MTT استفاده شد. به این ترتیب که به سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم (۵×۱۰^{۶}) از هر گروه ۱۰ میکرولیتر محلول غلیظ MTT (۵ mg/ml) اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. لوله‌ها سپس با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از دور ریختن محلول رویی، رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر (DMSO Dimethyl sulfoxide) حل شد. سپس محلول سانتریفیوژ (٤۰۰۰ rpm به مدت ٤ دقیقه) و محلول بنفش رویی در پلیت ۹٦ خانه وارد شد. سپس جذب نوری محلول بنفش رنگ حاصل با استفاده از دستگاه الایزا (diagnostic, Germany) با طول موج ۵۰۵ نانومتر خوانده شد و جذب نوری نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (نصر اصفهانی و همکاران ۱۳۸۱). درصد قابلیت حیات نمونه‌های اسپرم از گروه‌های مختلف با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصدقابلیت حیات} = \frac{\text{دانسیته نوری نمونه}}{\text{دانسیته نوری کنترل}} \times 100$$

ارزیابی قابلیت تحرک: سنجش حرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO (سازمان بهداشت جهانی ۲۰۰۱) انجام شد. بطوری‌که۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم از هر گروه به طور جداگانه روی لام Makler Chamber منتقل شد و حرکات اسپرم در گروه‌های مختلف در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ×۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک ۲۰۰ اسپرم برای

هر نمونه بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیش رونده، حرکات درجا و بدون حرکت محاسبه گردید.

ارزیابی تمامیت آکروزوم: برای ارزیابی اسپرم‌های دارای آکروزوم سالم و اسپرم‌های با واکنش آکروزومی، رنگ آمیزی Comassie Brilliant Blue صورت گرفت. به طور خلاصه از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم از گروه‌های مختلف گسترش‌های نازکی تهیه شد. گسترش‌ها با محلول ۵ درصد پارافورمالدئید درPBS به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شده و سپس با PBS شستشو شدند. سپس گسترش‌ها با محلول متانول ۲۵

2. World Health Organization

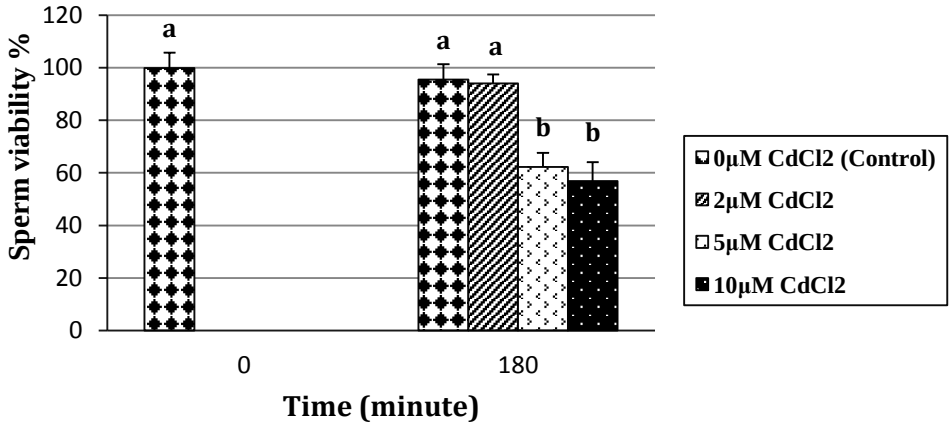
درصد، اسید استیک ۱۰ درصد و کوماسی برلیانت بلو ۲۵ درصد به مدت ٤ دقیقه رنگ آمیزی شدند. گسترش‌ها با آب شستشو و پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی×۱۰۰۰ از هر نمونه ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. در این رنگ آمیزی، آکروزوم سالم به رنگ آبی در حالی که آکروزوم واکنش داده بی‌رنگ می‌باشد (موراکینیو و همکاران ۲۰۱۱).

آنالیز داده‌ها: داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار بیان و توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (One- way ANOVA) و Tueky's test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تفاوت میانگین‌ها در سطح کمتر از ۵ درصد معنی‌دار درنظر گرفته شد.

نتایج و بحث

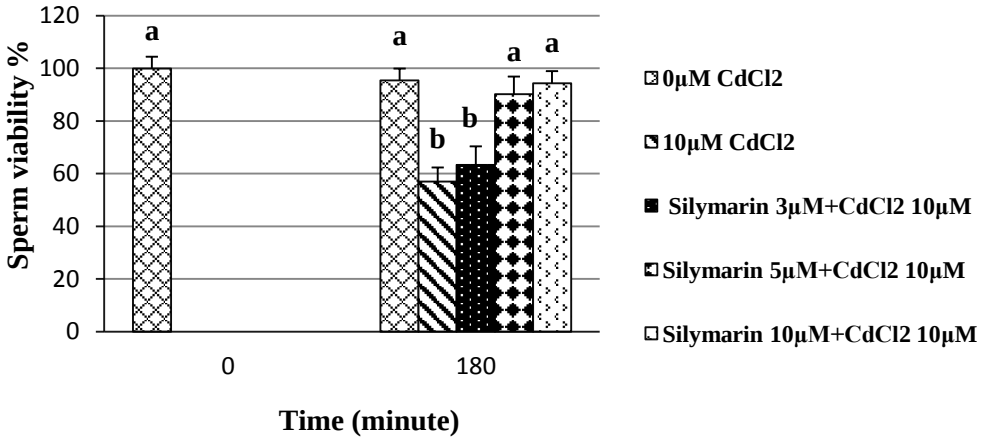
قابلیت حیات اسپرم: نتایج حاصل ازسنجشMTT نشان داد که پس از گذشت ۱۸۰دقیقه، درصد قابلیت حیات اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید (۵ و۱۰ میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) کاهش یافته است.

در حالی‌که تیمار اسپرم‌ها با غلظت ۲ میکرومولار کادمیوم کلراید پس از ۱۸۰ دقیقه تغییر معنی‌داری در درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد ننمود. نتایج همچنین نشان داد که انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه (گروه کنترل) تغییر قابل ملاحظه‌ای در درصد قابلیت حیات آن‌ها نسبت به لحظه زمانی صفر ایجاد نکرده است (شکل ۱).



شکل ۱- ارزیابی درصد قابلیت حیات اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید $CdCl_2$ به روش سنجشMTT

تیمار اسپرم‌ها با کادمیوم کلراید (فقط ۵ و ۱۰ میکرومولار) پس از ۱۸۰ دقیقه موجب کاهش معنی‌دار درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) شد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به‌یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، n=٦ برای هر گروه، P <۰/۰۵).



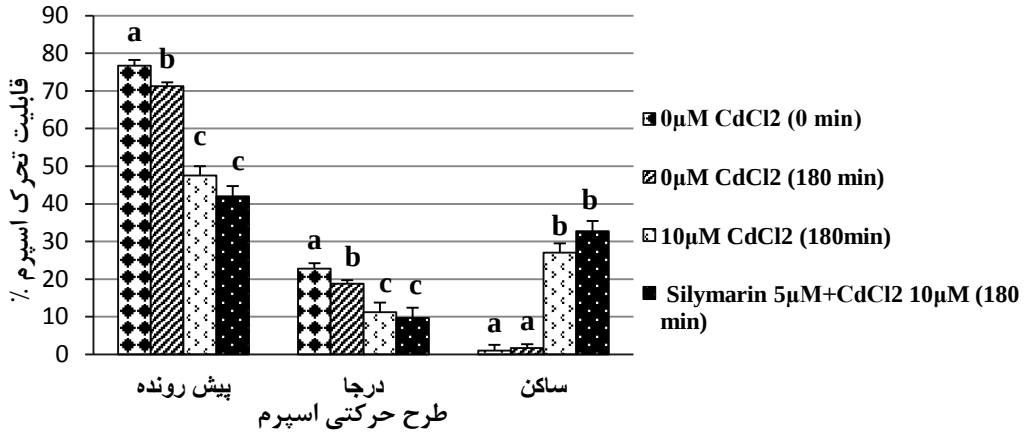
شکل ۲- ارزیابی قابلیت حیات اسپرم قوچ پس از تیمار با سیلیمارین و کادمیوم کلراید $CdCl_2$ به روش سنجش MTT

در گروه سیلیمارین (فقط ۵ و ۱۰ میکرومولار)+کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار)، سیلیمارین توانست به طور معنی‌داری درصد قابلیت حیات اسپرم را نسبت به گروه کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) جبران نماید. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی،n=٦ برای هر گروه، P <۰/۰۵).

مقادیر حاصل ازسنجش MTT نشان داد که تیمار اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه با سیلیمارین (۵ و۱۰ میکرومولار)+ کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) موجب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها نسبت به گروه تیمار با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) شده است. اما تیمار اسپرم‌ها با سیلیمارین (۳ میکرومولار)+ کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) پس از ۱۸۰ دقیقه نتوانست کاهش درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها را نسبت به گروه کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) جبران کند (شکل ۲).

قابلیت تحرک اسپرم: تیمار اسپرم‌ها با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) پس از ۱۸۰ دقیقه به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) موجب کاهش درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش رونده و درجا و افزایش درصد اسپرم‌های ساکن شد. کاربرد مشترک سیلیمارین (۵ میکرومولار)+ کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) نتوانست اثرات نامطلوب کادمیوم کلراید بر درصد قابلیت تحرک اسپرم‌های پیش رونده، درجا و ساکن را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) جبران نماید (شکل ۳).

قابلیت حیات و قابلیت تحرک اسپرم از جمله مهم‌ترین پارامترهایی محسوب می‌شوند که جهت ارزیابی کیفیت اسپرم مورد توجه قرار می‌گیرد. ارزیابی قابلیت حیات اسپرم می‌تواند اطلاعات مفیدی را در خصوص ظرفیت قدرت لقاح اسپرم ارائه دهد. این سنجش به روش‌های مختلف از جمله ائوزین-نگروزین و MTT صورت می‌گیرد. در مطالعات مختلف روش ائوزین-نگروزین که بر اساس ورود رنگ به سلول‌های مرده و عدم اجازه ورود رنگ به سلول‌های زنده استوار است، به عنوان یک روش تشخیص کیفی جهت تفکیک اسپرم‌های زنده از مرده مورد استفاده قرار می‌گیرد (بجورنداهی و همکاران۲۰۰۳- مومنی و اسکندری۲۰۱۲). اگر چه این روش ساده و ارزان است ولی تحت تأثیر مشاهده کننده قرار داشته و می‌تواند با خطا همراه باشد.



شکل ۳- ارزیابی قابلیت تحرک اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار با کادمیوم کلراید $CdCl_2$ و سیلیمارین

درصد قابلیت تحرک (حرکت پیش رونده و حرکت درجا) در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) به طور معنی‌داری کاهش در حالی‌که میانگین درصد اسپرم‌های ساکن به طور معنی‌داری افزایش یافت. در گروه سیلیمارین+ کادمیوم کلراید، سیلیمارین نتوانست اثرات مخرب کادمیوم را بر هیچ یک از طرح‌های حرکتی در مقایسه با گروه کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) جبران نماید. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند. (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n=٦ برای هر گروه، P<۰/۰۵).

در مطالعه حاضر برای اولین بار روش کمی MTT برای ارزیابی قابلیت حیات قوچ به کار برده شد. سنجش کمی MTT برای ارزیابی قابلیت حیات اسپرم انسان (مومنی و همکاران ۱۳۹۲) ، گاو (عزیز ۲۰۰٦) ، اسب (عزیز و همکاران ۲۰۰۵) ، بوفالو (اقبال و همکاران ۲۰۰۹) و خوک (بیون و همکاران ۲۰۰۸) مورد استفاده قرار گرفته است. در روش MTT فعالیت متابولیکی سلول‌ها مورد سنجش قرار می‌گیرد (دنیزوت و لانگ ۱۹۸٦). در سایر روش‌های بررسی قابلیت حیات سلولی که بر پایه ائوزین-نگروزین می‌باشند، تنها تمامیت غشای سلول‌ها سنجش می‌شود و اطلاعاتی در خصوص میتوکندری‌ها و یا عمل متابولیکی سلول ارائه نمی‌شود. بنابراین در این پژوهش سنجش MTT جهت بررسی ظرفیت میتوکندری‌های فعال و فعالیت متابولیکی اسپرم قوچ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار اسپرم‌ها با کادمیوم کلراید کاهش معنی‌داری در درصد قابلیت حیات و قابلیت تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل بوجود آورد. مطالعات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد کادمیوم بر پارامترهای اسپرمی حیوانات اثرات مخرب بر جای می‌گذارد. به عنوان مثال در موش‌هایی که به مدت ٢٤ ساعت و ۳۵ روز با دوزهای (۱، ۲، ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تیمار شده بودند اثر کوتاه مدت کادمیوم منجر به کاهش تحرک و اثر بلند مدت کادمیوم منجر به کاهش قابلیت حیات اسپرم گردید (اولیوریا و همکاران ۲۰۰۹). همچنین در مطالعه دیگری اثرات کادمیوم روی قابلیت تحرک اسپرم موش‌های نر تیمار شده با دوزهای (۰/۲، ۰/٤، ۰/۸میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۷ روز کاهش قابلیت تحرک اسپرم را به همراه داشته است (زو و همکاران ۲۰۰۱).

احتمالات متعددی وجود دارد که طی آن کادمیوم کلراید توانسته است با تاثیرات نامطلوب قابلیت حیات و قابلیت تحرک اسپرم‌ها را به مخاطره بیاندازد. مطالعات نشان می‌دهند که در صورت کاربرد کادمیوم با غلظت بالا، این فلز جانشین کلسیم شده و نقش آن را تقلید می‌کند (گورنینگ و همکاران ۱۹۹۵). افزایش بیش ازحد سطح کلسیم سیتوسلی برای سلول‌ها مرگ‌آور است (ماتسون

و چان ۲۰۰۳). بدین ترتیب که افزایش این یون در سیتوسل موجب تجمع بیش از اندازه کلسیم در میتوکندری شده که پس از تغییر ولتاژ غشا میتوکندری و باز شدن منافذ این ارگانل منجر به آزاد شدن پروتئین‌های آپوپتوژنیک همچون سیتوکروم c از این ارگانل می‌شود (جئونگ سئول ۲۰۰۸). بنابراین این احتمال وجود دارد که کادمیوم کلراید با این قابلیت موجب عملکرد غیر طبیعی میتوکندری‌ها شده و از این طریق بر قابلیت حیات و به نوبه خود قابلیت تحرک اسپرم تاثیر نامطلوب گذاشته باشد.

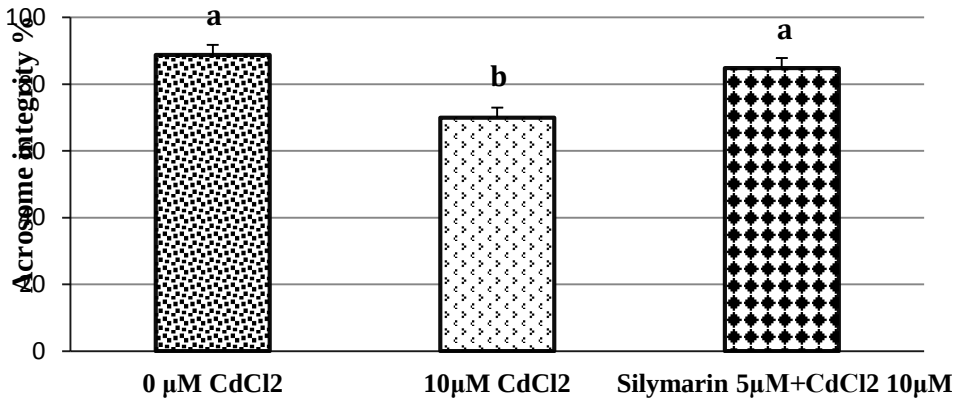
احتمال دیگر این است که کادمیوم کلراید با قابلیت ایجاد استرس اکسیداتیو بر روی اسپرم‌ها موجب کاهش قابلیت حیات و قابلیت تحرک شده باشد. مطالعات نشان می‌دهند که قابلیت تحرک، ساختار، بقا و متابولیک اسپرم توسط پراکسیداسیون لیپید ناشی از ROS معیوب شده و به دنبال آن موجب کاهش قابلیت حیات و تحرک اسپرم می‌شود (سانوکا و کورپیز ۲۰۰٤). افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن یکی از عوامل ایجاد آسیب توسط کادمیوم در بافت بیضه است و انباشتگی آن‌ها با کاهش تحرک اسپرم ارتباط مستقیم دارد (عربی ۲۰۰٦). مطالعات نشان داده است که استرس اکسیداتیو از طریق اختلال در تولید و میزان ATP می‌تواند سبب ایجاد اختلال در تحرک اسپرم گردد (برنارد ۲۰۰۸). کم شدن تحرک اسپرم در مجاورت استرس اکسیداتیو را می‌توان ناشی از اختلال در فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونم تاژک دانست (آتیکن و باکر ۲۰۰٦). همچنین فلزات سنگین از طرق مختلفی قادر به تاثیر گذاری بر آغاز جنبش و تحرک اسپرم می‌باشند (لانستینر و همکاران ۱۹۹۹). این فلزات در فرآیند تکامل اسپرم نیز تاثیرات منفی داشته و با اتصال به پروتئین و یا آنزیم‌های موثر بر متابولیسم تاژک اسپرماتوزوئیدها، موجب تغییر ساختار تاژک، دژنره شدن پروتئین‌ها و توقف تحرک آن می‌شوند (دیتریچ و همکاران ۲۰۱۰). بنابراین این احتمال وجود دارد که کادمیوم کلراید با القا استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید باعث تخلیه ATP در اسپرم شده و در نهایت منجر به کاهش قابلیت حیات اسپرم و از دست رفتن قدرت تحرک آن می‌گردد. برای اثبات این احتمال، با کاربرد یک آنتی‌اکسیدان اثرات ناشی از القا استرس اکسیداتیو باید جبران گردد. نتایج ما نشان داد که در گروه سیلیمارین+ کادمیوم کلراید، سیلیمارین توانست درصد قابلیت حیات اسپرم را در مقایسه با گروه کادمیوم کلراید جبران نماید. لذا این احتمال وجود دارد که سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی (سوریا و همکاران ۲۰۰۷) قادر است با مهار استرس اکسیداتیو حاصل از کادمیوم کلراید موجب افزایش قابلیت حیات اسپرم‌ها شود. در همین خصوص، نشان داده شده است که آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند سیلیمارین و کوارستین، باعث افزایش توان زیستی سلول‌ها می‌شوند (کیتو و همکاران ۲۰۰۲). علاوه بر این، نقش سیلیمارین در خصوص کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو گزارش شده است (روغنی و همکاران ۱۳۹۱).

با این حال در پژوهش حاضر در گروه سیلیمارین+ کادمیوم کلراید، سیلیمارین نتوانست اثرات مخرب کادمیوم کلراید را بر قابلیت تحرک اسپرم جبران نماید. در این خصوص چندین فرضیه محتمل به نظر می‌رسد: احتمالا مدت زمان تیمار و غلظت استفاده شده جهت اعمال اثر سیلیمارین موثر نبوده است و یا اینکه کادمیوم کلراید به روش‌های دیگر از جمله تاثیر مستقیم بر سیستم حرکتی و میکروتوبول‌های اسپرم قابلیت تحرک را مختل نموده باشد. اسپرم قوچ واجد مقادیر زیادی گروه سولفیدریل در تاژک خود است که در حفظ ثبات و قابلیت تحرک آن نقش دارند (پانت و همکاران ۲۰۰٤). با توجه به اینکه کادمیوم میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل دارد (تورس و همکاران ۲۰۰۰). لذا این احتمال وجود دارد که کادمیوم کلراید با تاثیر نامطلوب بر این گروه ها موجب کاهش قابلیت تحرک شده است.

ارزیابی تمامیت آکروزوم: نتایج حاصل از بررسی تمامیت آکروزوم نشان داد که درصد تمامیت آکروزوم

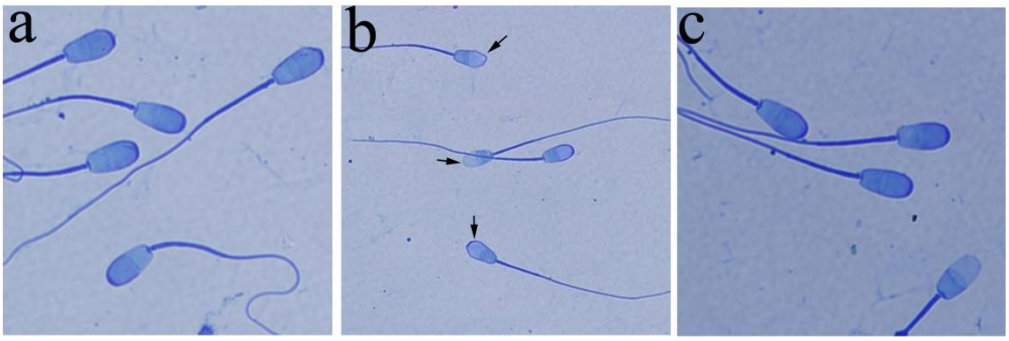
در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه۱۸۰ دقیقه) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین (۵ میکرومولار)+ کادمیوم کلراید (۱۰میکرومولار) توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) جبران کند (شکل ٤ و ٥).

در خصوص نقش کادمیوم در القا واکنش آکروزومی دو فرضیه محتمل به نظر می‌رسد: ۱- نقش کلسیم در روند اگزوسیتوز و به دنبال آن واکنش آکروزومی اسپرم به اثبات رسیده است (اولیوریا و همکاران ۲۰۰۹). با توجه به اینکه حضور کادمیوم با غلظت بالا موجب می‌شود که این فلز جانشین کلسیم گردد (گورنینگ و همکاران ۱۹۹۵)، بنابراین احتمال وجود دارد که کادمیوم با تقلید نقش کلسیم منجر به القا واکنش آکروزومی زودرس در اسپرم‌های قوچ شده است. ۲- اسپرم به دلیل وجود اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان در سطح غشای پلاسمایی و همچنین به دلیل کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها در سیتوپلاسم خود، در برابر شوک‌های اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر می‌باشد (زورن۲۰ و همکاران ۲۰۰۳). از آن‌جا که کادمیوم قادر است با القا استرس اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپید غشا شود شارما و همکاران ٢٠٠٤) ،



شکل ۴- تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ در گروه های تیمار با کادمیوم کلراید $CdCl_2$ و سیلیمارین پس از ۱۸۰ دقیقه

درصد تمامیت آکروزوم در گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه زمانی ۱۸۰ دقیقه) به طور معنی‌داری کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین (۵ میکرومولار)+ کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) توانست این اثر را در مقایسه با گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) به طور معنی‌داری جبران کند. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک طرفه تست توکی، n=٦ برای هر گروه، P<۰/۰۵).



شکل ۵- تمامیت آکروزوم در اسپرم های قوچ با استفاده از رنگ آمیزی Comassie Brilliant Blue

(a) کنترل (اسپرم با آکروزوم سالم)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با کادمیوم کلراید ۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه (اسپرم با آکروزوم واکنش داده، فلش‌ها) ، (c) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۵ میکرومولار)+ کادمیوم کلراید (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه. (بزرگ‌نمایی شکل ها: ۱۰۰۰×).

بدین ترتیب می‌توان حدس زد که در این پژوهش کادمیوم کلراید از این طریق به غشای پلاسمایی ناحیه آکروزوم آسیب رسانده و منجر به القا واکنش آکروزومی زودرس در اسپرم‌ها شده باشد. از آن‌جا که در پژوهش حاضر کاربرد مشترک سیلیمارین+ کادمیوم کلراید توانست واکنش آکروزومی زودرس را نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم کلراید به طور معنی‌داری کاهش دهد لذا احتمال القا استرس اکسیداتیو توسط کادمیوم در این پدیده قوت یافته و احتمالا سیلیمارین با افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی اسپرم از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی موجب افزایش تمامیت آکروزوم شده است. در حمایت از این احتمال اثرات حفاظت سلولی سیلیمارین وابسته به خواص آنتی‌اکسیدانی و جارو کردن رادیکال‌های آزاد آن که می‌تواند به طور مستقیم با اجزا غشا سلولی واکنش داده و سبب جلوگیری از ناهنجاری در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت نرمال غشا گردد گزارش شده است (پراهان و گیریش ۲۰۰۶).

نتیجه گیری

کادمیوم کلراید به عنوان یک آلاینده زیست محیطی احتمالا با القا استرس اکسیداتیو ناهنجاری‌هایی را در قابلیت حیات، قابلیت تحرک و همچنین تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ ایجاد نموده و سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است اثرات مخرب این آلاینده را بر روی این پارامترها (جز قابلیت تحرک) جبران نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش تحت حمایت مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اراک به قرارداد شماره ۹۲/۲۶۷۷ و مورخ ۹۲/۳/۱۲ صورت گرفته و نویسندگان بدین وسیله مراتب تقدیر وتشکر خود را اعلام می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

روغنی م، بلوچ نژاد مجرد ت و روغنی دهکردی ف، تابستان ۱۳۹۱. اثر تجویز دراز مدت سیلیمارین بر شاخص های استرس اکسیداتیو بافت کلیه موش صحرایی نر دیابتی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، جلد چهاردم، شماره دوم، صفحه‌های ۱۰ تا ۱۶.

مومنی ح ر، سلیمانی مهرنجانی م، آبنوسی م، بختیاری ع، اسکندری ن و رفیعی م، زمستان ۱۳۹۲. ارزیابی توان زیستی و آپوپتوزیس در اسپرم‌های انسان تیمارشده با سدیم آرسنیت. مجله سلول و بافت، جلد چهارم، شماره چهارم، صفحه‌های ۳۶۱ تا ۳۷۰.

نصر اصفهانی م، پاییز ۱۳۸۱. تاثیر روش ارزیابی حیاتی اسپرم انسانی توسط MTT بر نتایج حاصله از تزریق مستقیم اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک. فصل نامه باروری و ناباروری، جلد چهارم، شماره سیزدهم، صفحه های ٤ تا ۱۳.

Aitken RJ, and Baker MA, 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. Mol Cell Endocrinol 250: 66-69.

Arabi R, 2006. Cadmium as etiology sperm dysfunction in Holstein bulls. Iran J Vet Res 7: 29-36.

Aziz DM, 2006.Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. Anim Reprod Sci 92: 1-8.

Aziz DM, Ahlswede L, and Enbergs H, 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. Theriogenology 64: 1350-1356.

Basiglio CL, Sanchez Pozzi EJ, Mottino AD, and Roma MG, 2009. Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. Chem Biol Interact 179: 297-303.

Bernard A, 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. Indian J Med Res 128: 557-564.

Bjorndahl L, Soderlund I, and Kvist U, 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum Reprod18: 813-816.

Byun JW, Choo CH, Kim HH, Kim YJ, Hwang YJ, and Kim DY, 2008. Evaluation of boar sperm viability by mtt reduction assay in beltsville thawing solution extender. Asian Australas J Anim Sci 21: 494-498.

Denizot F, and Lang R, 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye proceduregiving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods89: 271-277.

Dietrich GJ, Dietrich M, Kowalski RK, Dobosz S, Karol H, Demianowicz W, and Glogowski J, 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. Aquat Toxicol 97: 277-284.

Firenzuoli F, Gori L, Crupi A, and Neri D, 2004. Flavonoids: risks or therapeutic opportunities?. Recenti Prog Med 95: 345-351.

Fraschini A, Gori L, and Esposti D, 2002a. Pharmacology of Silymarin. Clin Drug Investig 22: 65-77.

Fraschini A, Gori L, and Esposti D, 2002b. Pharmacology of Silymarin. Clin Drug Investig 22: 51-65.

Goering M, Waalkes MP, and Klassen CD, 1995. Toxicology of cadmium, Toxicologyof metals. Biochemichal Aspects (Handbook of experimental pharmacology)115:189-213.

Iqbal M, Ijaz A, Aleem M, Rehman H, and Yousaf M, 2009. Assessment of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) semen by MTT reduction Assay. Asian Australas J Anim Sci 39: 47-53.

Jeong SY, and Seol DW, 2008. The role of mitochondria in apoptosis. Biochem Mol Biol Rep 41: 11-22.

Kidd PM, 2009. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. Alternat Med Rev 14: 226-246.

Kittur S, Wilasrusmee S, Pedersen WA, Mattson MP, Straube-West K, Wilasrusmee C, Lubelt B, and Kittur DS, 2002. Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (Silybum marianum) on neurons in culture. J Mol Neurosci 18: 265-269.

Lahnsteiner F, Berger B, and Weismann T, 1999. Sperm metabolism of the telost fishes Chalcalburnus chalcoides and Oncorhynchus mykiss and its relation to motility and viability. J Exp Zool 284: 454-465.

Mattson MP, and Chan SL, 2003. Calcium orchestrates apoptosis. Nat Cell Biol 5: 1041-1043.

Momeni HR, and Eskandari N, 2012. Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in soudium arsenite treated rats. Indian J Rep Med 10: 249-256.

Morakinyo A, Iranloye B, and Adegoke O, 2011. Calcium antagonists modulate oxidative stress and acrosomal reaction in rat spermatozoa. Arch Med Sci 7: 613-618.

Mourelle M, Muriel P, Favari L, and Franco T, 1989. Prevention of CCL4-induced liver cirrhosis by silymarin. Fundam Clin Pharmacol 3: 183-191.

Muntau H and Baudo R, 1992. Sources of cadmium, its distribution and turnover in the freshwater environment. IARC Sci Publ 133-148.

Nemmiche S, Chabane-Sari D, and Guiraud P, 2007. Role of alpha-tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. Chem Biol Interact 170: 221-230.

Oliveira H, Spano M, Santos C, and Pereira Mde L, 2009. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. Reprod Toxicol 28: 550-555.

Paniagua-Castro N, Escalona-Cardoso G, Madrigal-Bujaidar E, Martinez-Galero E, and Chamorro-Cevallos G, 2008. Protection against cadmium-induced teratogenicity in vitro by glycine. Toxicol In Vitro 22: 75-79.

Pant N, Murthy RC, and Srivastava SP, 2004. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice. Hum Exp Toxicol 23: 399-403.

Pradhan SC, and Girish C, 2006. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med Res 124: 491-504.

Sanocka D, and Kurpisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod Biol Endocrinol 2: 12.

Sharma SS, kaul S, metwally A, Goyal KC, Finkemeier I, and Dietz KJ, 2004. Cadmium toxicity in barley (Hordeum vulgar) as affected by varying Fe nutritional status. Plant Sci 166: 1287-1295.

Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, and Bongiovanni GA, 2007. Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. Life Sci 81: 1397-1402.

Torres E, Cid A, Herrero C, and Abalde J, 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultra structure in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum Bohlin. Water Air Soil Poll 117: 10-14.

World Health O, 2001. Laboratory manual of the WHO for the examination ofhuman semen and sperm-cervical mucus interaction. Ann Ist Super Sanita 37: I-XII 1-123.

Wu HM, Lin-Tan DT, Wang ML, Huang HY, Wang HS, Soong YK, and Lin JL, 2008. Cadmium level in seminal plasma may affect the pregnancy rate for patients undergoing infertility evaluation and treatment. Reprod Toxicol 25: 481-484.

Xu LC, Wang SY ,Yang XF, and Wang XR, 2001. Effects of cadmium on rat sperm motility evaluated with computer assisted sperm analysis. Biomed Environ Sci 14: 312-317.

Zorn B, Vidmar G, and Meden-Vrtovec H. 2003. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Int J Androl 26: 279-285.

Protective effect of silymarin on viability, motility and acrosome integrity of ram sperm treated with cadmium chloride

HR Momeni[1*], A Khavari [2], M Khodaei [3], T Choobineh[2] and N Eskandari[2]

Accepted: December 24, 2013 Received: August 13, 2014
[1]Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
[2]M.Sc, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
[*]Corresponding author: E mail: h-momeni@araku.ac.ir

Abstract

Introduction: Cadmium, as an environmental pollutant, can exert oxidative stress on spermatogenesis and sperm morphology. This study was performed to investigate not only the effect of cadmium on viability, motility and acrosome integrity of ram sperm but also examine the protective role of silymarin, as an antioxidant, on cadmium toxicity. Epididymal sperm obtained from *Farahani´s ram* divided into four groups: 1. sperm at 0 hour 2. Sperm incubated for180 minutes (control) 3. sperm treated with cadmium chloride for 180 minutes and 4. sperm treatment with silymarin+cadmiumchloride for 180 minutes. MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method was used to assess sperm viability. Sperm motility was done according to World Health Organization guidelines while acrosome integrity in the sperm was evaluated by comassie brilliant blue staining. Data were analyzed using one way ANOVA followed with Tukey´s test. The percentage of sperm viability, motility and acrosome integrity was significantly decreased in cadmium chloride-treated group compared to the control. In silymarin+cadmiumchloride group, silymarin could compensate the adverse effect of cadmium chloride on sperm parameters (except sperm motility) compared to cadmium chloride group. Silymarin as a potent antioxidant prevented adverse effect of cadmium on some ram sperm parameters.

Keywords: Silymarin, Cadmium chloride, Acrosome integrity, Sperm viability and motility, Farahani´s ram sperm