نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ص. ۵۰۶-۴۹۸

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 4, Winter 2018, p. 498-506

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین در مقابله با سمیت کلرید لیتیوم در اسپرم قوچ

طاهره چوینه[۱]- حمیدرضا مؤمنی[۲]- مهدی خدایی مطلق[۳*]- نیلوفر دربندی[۴]- عاطفه خاوری[۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۸

چکیده

لیتیوم علی‌رغم درمان و پیشگیری از اختلالات دوقطبی، عوارض تولید مثلی نیز برجا می‌گذارد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات مخرب لیتیوم بر اسپرم قوچ فراهانی و همچنین بررسی نقش محافظتی سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بر بهبود اثرات سمی لیتیوم صورت گرفت. اسپرم‌های جمع‌آوری شده از اپیدیدیم قوچ فراهانی به چهار گروه تقسیم شدند. 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 جهت ارزیابی یکپارچگی آکروزوم رنگ آمیزی Comassie Brilliant Blue مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه همراه شده با تست توکی صورت گرفت. در این پژوهش درصد قابلیت حیات، قابلیت تحرک و تمامیت آکروزوم در گروه تیمار شده با کلرید لیتیوم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۱$). کاربرد مشترک سیلیمارین با کلرید لیتیوم توانست این اثرات را (به جز قابلیت تحرک) نسبت به گروه تیمار شده با کلرید لیتیوم به طور معنی‌داری جبران کند ($P<۰/۰۵$). سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی قادر است اثرات مخرب لیتیوم بر برخی از فراسنجه‌ها اسپرم قوچ را مهار نماید.

واژه‌های کلیدی: اسپرم قوچ فراهانی، سیلیمارین، کلرید لیتیوم.

مقدمه

میزان لیتیوم موجود در پوسته زمین برابر با ۰/۰۰۶ درصد است. لیتیوم در صنعت استفاده‌های فراوانی دارد که از جمله می‌توان به کاربرد آن در تهیه ذرات شیشه‌ای، صنایع سرامیک، نوشابه‌ها و مواد دارویی، مواد آرایشی و پلاستیک‌ها اشاره نمود. همچنین مشتقات لیتیوم به‌عنوان دارو از دیرباز مورد مصرف طبی داشته است. شاخص درمانی این دارو کم بوده و به آسانی و با تنها افزایش اندکی موجب مسمومیت و القا استرس اکسیداتیو می‌گردد و کاهش مختصری در دوز موجب کاهش چشمگیر اثرات درمانی آن می‌شود (۲۴).

القا استرس اکسیداتیو با افزایش رادیکال های فعال اکسیژن (ROS) یکی از مکانیسم های مطرح در ایجاد آسیب توسط لیتیوم در بافت بیضه است. در این خصوص گزارشی در خصوص ارتباط بین انباشتگی ROS با کاهش تعداد و تحرک اسپرم وجود دارد (۱۰). بدین ترتیب مصرف برخی داروها از جمله لیتیوم می‌تواند با القا استرس اکسیداتیو بر روند تولید اسپرم و همچنین با تأثیر گذاری مستقیم بر روی اسپرم موجب ناباروری گردد. بنابراین استفاده از مواد با خاصیت آنتی اکسیدانتی به خصوص آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی با هدف حذف رادیکال‌های آزاد و همچنین تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی در دستگاه تناسلی می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای مهار یا حداقل کاهش اثرات مخرب ناشی از استرس اکسیداتیو برای جلوگیری از روند ناباروری مطرح باشد.

سیلیمارین فلاونوئیدی است که به‌عنوان ماده مؤثر عصاره گیاه مارتیغال یا خار مریم (*Silybum marianum*) شناخته شده و دارای اثرات دارویی متعددی از جمله خاصیت ضدالتهابی و ضدسرطانی می‌باشد (۱۸). علاوه بر آن سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، تنظیم‌کننده مقدار گلوتاتیون داخل سلولی و تثبیت‌کننده غشاء سلولی مطرح است. ساختمان پلی‌فنولی به همراه گروه متوکسی بر روی یکی از حلقه‌های فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانتی را به سیلیمارین بخشیده است (۱۷). اثرات حفاظت سلولی سیلیمارین مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانتی و حذف رادیکال‌های آزاد توسط آن می‌باشد و می‌تواند

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک،
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک،
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک،
۴- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک.
(*- نویسنده مسئول: Email: M-motlagh@araku.ac.ir)
DOI: 10.22067/ijasr.v1i1.59254

با واکنش مستقیم با اجزاء غشاء سلولی از ایجاد هر گونه ناهنجاری در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت نرمال غشاء جلوگیری نماید (۱۴ و ۱۶). بنابراین سیلیمارین قادر است با اعمال اثرات مهم ضداکسیداتیو خود از طریق کاهش اکسیداسیون گلوتاتیون و افزایش سطح آن و نیز افزایش آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز به‌عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدانتی قوی جهت جلوگیری از بروز ضایعات کبدی و موارد مشابه باشد (۱۹ و ۲۲). عواملی همچون قابلیت حیات، قابلیت تحرک و سلامت آکروزوم به‌عنوان فاکتورهای کلیدی در سلامت اسپرم محسوب می‌شوند و می‌توانند تضمین کننده لقاح مؤثر اسپرم با تخمک باشند. این فراسنجه‌های اسپرم نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس بوده و اختلال در آنها می‌تواند تولید مثل انسان و دام را به مخاطره بیاندازد، لذا این پژوهش با این هدف صورت گرفت تا مشخص شود که آیا "سیلیمارین قادر است اثرات مخرب کلرید لیتیوم بر قابلیت حیات، قابلیت تحرک و سلامت آکروزوم اسپرم قوچ را مهار نماید؟"

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی اسپرم: در این تحقیق از بیضه‌های قوچ فراهانی که بعد از ذبح از کشتارگاه اراک تهیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی دانشگاه اراک منتقل گردید، استفاده شد. ابتدا چند برش در ناحیه دمی اپیدیدیم ایجاد کرده و سپس بوسیله سرنگ حاوی محیط کشت Ham's F10+25mM HEPES، اسپرم‌های خارج شده از ناحیه فوق درون لوله فالکون استریل وارد و به منظور شناور شدن[1]، به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

گروه‌بندی و تیمار اسپرم‌ها: نمونه‌های اسپرم شناور شده شمارش و در لوله‌های اپندروف جداگانه تفکیک، به طوری که سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت هر لوله حاوی 5×10^{6} اسپرم بود. شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی سلامت (WHO) 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 کلرید لیتیوم به مدت ۱۸۰ دقیقه و ۴- اسپرم‌های تیمار توأم سیلیمارین+کلرید لیتیوم (سیلیمارین ۱۵ دقیقه قبل از کلرید لیتیوم مورد استفاده قرار گرفت) به مدت ۱۸۰ دقیقه.

ارزیابی قابلیت حیات:

سنجش وضعیت متابولیکی اسپرم یکی از روش‌هایی است که برای ارزیابی قابلیت حیات اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد و اطلاعاتی را در خصوص ظرفیت قدرت لقاح اسپرم ارائه می‌دهد. این سنجش به روش‌های مختلف از جمله ائوزین-نیگروزین و MTT صورت می‌گیرد.

جهت ارزیابی قابلیت حیات اسپرم از سنجش رنگی MTT (۳-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (۴،۵- استفاده شد. به این ترتیب که به سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم هر لوله ۱۰ میکرولیتر محلول غلیظ MTT (۵ mg/ml) اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها با دور ۱۱۰۰۰ جی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از برداشتن محلول بالایی، رسوب باقی‌مانده در ۲۰۰ میکرولیتر DMSO(Dimethyl sulfoxide) حل شد. سپس محلول سانتریفیوژ (۴۴۰۰ جی به مدت ۴ دقیقه) و محلول بنفش رویی در پلیت ۹۶ خانه وارد شد. سپس جذب نوری محلول بنفش رنگ حاصل با استفاده از دستگاه(SCO diagnostic, Germany) Elisa reader با طول موج ۵۰۵ نانومتر خوانده شد و میانگین جذب نوری نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. درصد قابلیت حیات نمونه‌های اسپرم از گروه‌های مختلف با استفاده از معادله شماره یک محاسبه گردید.

درصد قابلیت حیات: (دانسیته نوری نمونه/دانسیته نوری کنترل) × ۱۰۰ (۱)

ارزیابی قابلیت تحرک: ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم از هر گروه به طور جداگانه روی لام Makler Chamber منتقل و تحرک اسپرم در گروه های 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 اسپرم های دارای حرکات پیشرونده، حرکات درجا و بدون حرکت محاسبه گردید.

ارزیابی تمامیت آکروزوم: برای ارزیابی اسپرم‌های دارای آکرزوم سالم، یا اسپرم‌های با واکنش آکروزومی، رنگ‌آمیزی Comassie Brilliant Blue صورت گرفت. به طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم از گروه‌های مختلف بر روی لام قرار داده شده و گسترشی از آن تهیه گردید. گسترش‌ها با محلول ۵ درصد پارافورمالدئید در PBS به مدت ۱۵ دقیقه فیکس و سپس با PBS شستشو شدند. سپس گسترش‌ها با محلول آبی متانول ۲۵ درصد، اسید استیک خالص ۱۰ درصد و کوماسی برلیانت بلو ۲۵ درصد به مدت ۴ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. گسترش‌های رنگ‌گرفته 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 رنگ‌آمیزی سر اسپرم با آکروزوم سالم به رنگ آبی در حالی که سر اسپرم با آکروزوم واکنش داده بی‌رنگ می‌باشد.

آنالیز داده‌ها: داده های حاصل توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

برای مقایسه میانگین‌ها تست توکی مورد استفاده قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

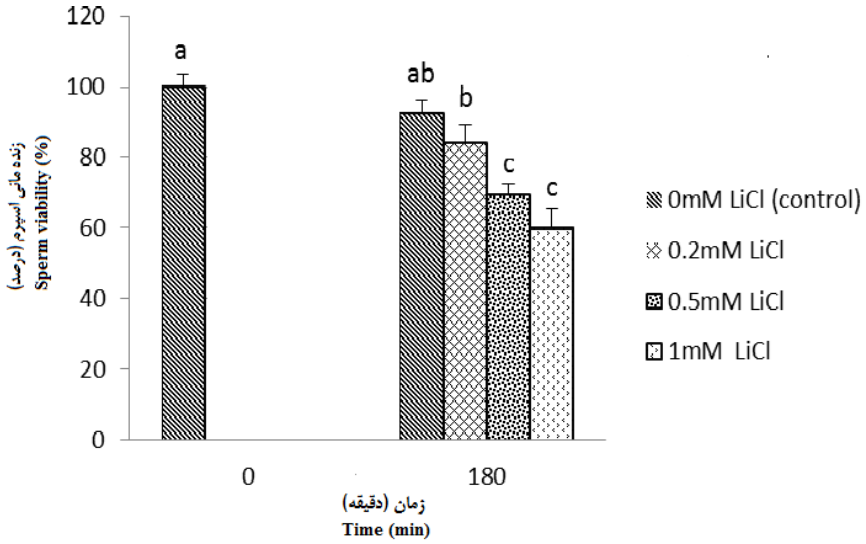
قابلیت حیات اسپرم: سنجش MTT نشان داد که پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه درصد قابلیت حیات اسپرم‌های تیمار شده با کلرید لیتیوم (۰/۵ و۱ میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/ ۰۰۱) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) کاهش یافته است، در حالی که تیمار اسپرم‌ها با غلظت کلرید لیتیوم (۰/۲میکرومولار) پس از ۱۸۰ دقیقه تغییر معنی‌داری در درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) ایجاد ننموده است. این نمودارها همچنین نشان می‌دهند که انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰دقیقه (گروه کنترل) تغییر قابل ملاحظه ای در درصد قابلیت حیات آنها نسبت به لحظه زمانی صفر ایجاد نکرده است (شکل ۱).

همچنین سنجش MTT نشان داد که تیمار اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه با سیلیمارین (۰/۱ و ۰/۱۵ میکرومولار) + کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) موجب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها نسبت به گروه تیمار با کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) شده است. اما تیمار اسپرم‌ها با سیلیمارین (۰/۰۵ میکرومولار) +کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) پس از ۱۸۰ دقیقه نتوانست درصد قابلیت حیات اسپرم ها را نسبت به گروه کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) جبران کند (شکل ۲).

قابلیت تحرک اسپرم: میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده و درجا پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه تیمار با کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه زمانی ۱۸۰ دقیقه) کاهش یافته است. این نمودار همچنین نشان داد که کاربرد مشترک سیلیمارین (۰/۱ میکرومولار) + کلرید لیتیوم (۱میکرومولار) نتوانست درصد قابلیت حرکت پیش‌رونده و درجا اسپرم را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید لیتیوم (۱میکرومولار) جبران کند.

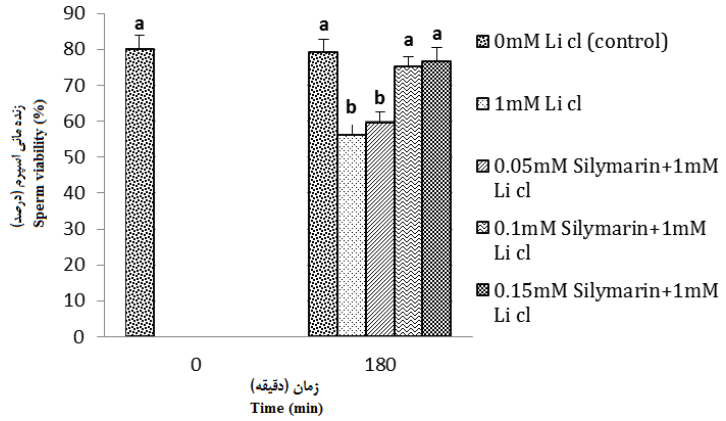
میانگین درصد اسپرم‌های ساکن که پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه با کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) تیمار شده بودند به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه زمانی ۱۸۰ دقیقه) افزایش یافته است. کاربرد مشترک سیلیمارین (۰/۱ میکرومولار)+ کلرید لیتیوم (۱میکرومولار) نتوانست افزایش غیر طبیعی اسپرم‌های ساکن ناشی از لیتیوم را جبران نماید (شکل ۳).

ارزیابی یکپارچگی آکروزوم: نتایج حاصل از بررسی تمامیت آکروزوم نشان داد که درصد تمامیت آکروزوم در گروه تیمار شده با کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه۱۸۰ دقیقه) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین (۰/۱ میکرومولار) + کلرید لیتیوم (۱۰میکرومولار) توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید لیتیوم (۱ میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) جبران کند (شکل ۴ و ۵).



شکل ۱- قابلیت حیات اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف لیتیوم کلراید به روش سنجش MTT
ستون های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

Figure 1- ram sperm viability in groups treated with different concentrations of lithium chloride by measuring MTT
Columns with different superscripts are significantly differences.

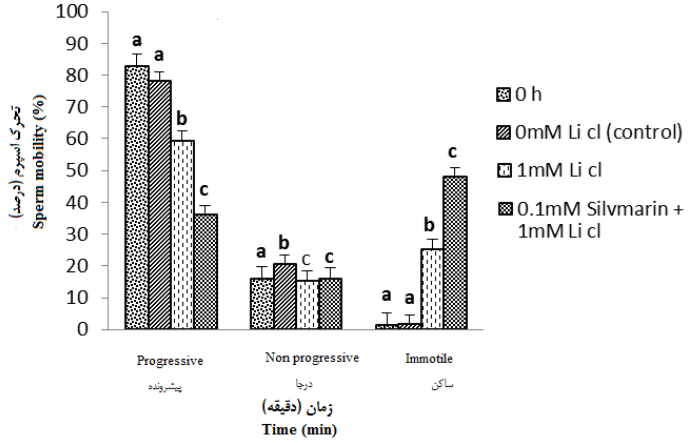


شکل ۲- بررسی قابلیت حیات اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار توأم سیلیمارین و کلرید لیتیوم به روش سنجش MTT

ستون‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می باشند.

Figure 2- Evaluation of treatment with Silymarin groups ram sperm viability and lithium chloride assay MTT

Columns with different superscripts are significantly differences.

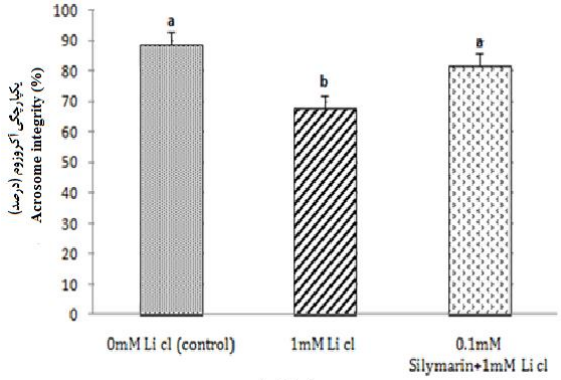


شکل ۳- بررسی قابلیت تحرک (پیشرونده، ساکن، درجا) اسپرم قوچ در گروه‌های مورد تیمار با لیتیوم کلراید و سیلیمارین

ستون‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

Figure 3- Check the mobility (progressive, stationary, in situ) in ram sperm treated with lithium chloride and silymarin groups

Columns with different superscripts are significantly differences.

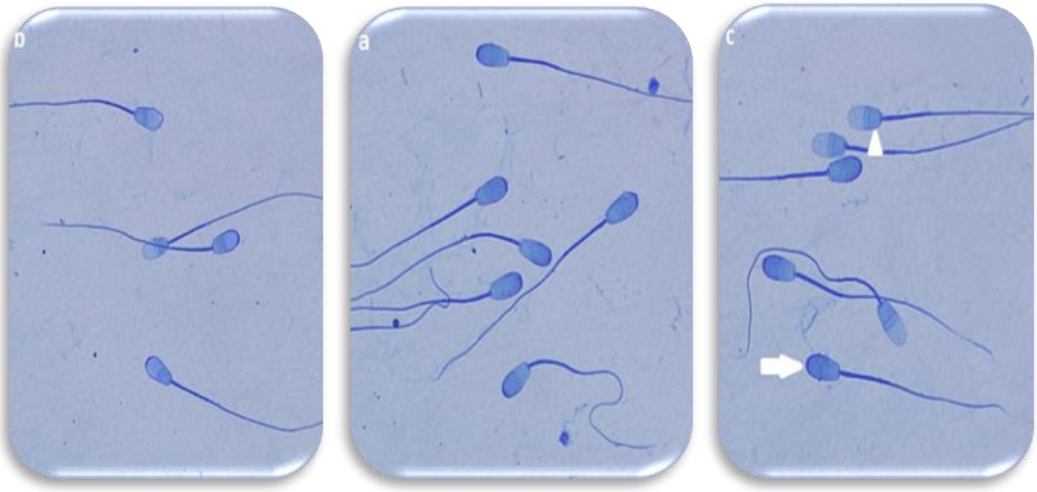


شکل ٤- درصد یکپارچگی آکروزوم در گروه تیمار شده با لیتیوم کلراید و گروه تیمار توام سیلیمارین و لیتیوم کلراید

حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها می‌باشد.

Figure 4- Percentage of acrosome integrity in the group treated with lithium chloride and lithium chloride and treatment with silymarin

Columns with different superscripts are significantly differences.



شکل ۵- بررسی سلامت آکروزوم در اسپرم‌های قوچ با استفاده از رنگ آمیزی Comassie Brilliant Blue

a) کنترل (اسپرم با آکروزوم سالم)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با لیتیوم کلراید (اسپرم با آکروزوم واکنش داده) (۱ میلی مولار به مدت ۱۸۰ دقیقه)، c) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۰/۱ میلی مولار) + لیتیوم کلراید (۱ میلی مولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه، (بزرگنمایی×۱۰۰۰).

Figure 5- Check the integrity of ram sperm acrosome in using coloring Comassie Brilliant Blue
a) control (healthy sperm acrosome), (b) Asprm Hay treated with lithium chloride (sperm acrosome react) (1 mM for 180 minutes), c) Asprm Hay silymarin (0.1mM) + lithium chloride (1 mM) for 180 minutes, (magnification × 1000).

بحث

این مطالعه ارزیابی اثرات مخرب کلرید لیتیوم بر روی قابلیت حیات، قابلیت تحرک و تمامیت آکروزوم اسپرم های قوچ فراهانی بود. علاوه بر این، سیلیمارین توانست اثر سمی کلرید لیتیوم را بر روی فراسنجه‌های مذکور (به جز قابلیت تحرک) خنثی نماید. قابلیت زنده مانی و قابلیت تحرک اسپرم به‌عنوان مهم‌ترین فراسنجه‌های اسپرم برای سنجش توانایی لقاح و همچنین سلامت غشاء اسپرم محسوب می شوند.

اسپرم قوچ محتوی مقادیر زیادی گروه سولفیدریل در تاژک اسپرم است که در حفظ ثبات و قابلیت تحرک اسپرم دخالت دارند (۱۹). با توجه به اینکه لیتیوم میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل دارد (۲۲). لذا این احتمال وجود دارد که کلرید لیتیوم با اثر بر گروه سولفیدریل موجب کاهش قابلیت تحرک گردیده است.

از آنجایی که افزایش بیش از حد سطح کلسیم سیتوزولی برای سلول ها مرگ‌آور است (۴)، احتمال دارد که کاهش قابلیت حیات با افزایش کلسیم داخل سلولی مرتبط باشد و طبق مطالعات گذشته در صورت وجود دوز بالای لیتیوم، این فلز جانشین کلسیم می‌شود (۷). یک احتمال دیگر این است که کلرید لیتیوم با قابلیت ایجاد استرس اکسیداتیو بر روی اسپرم‌ها موجب کاهش قابلیت حیات و قابلیت تحرک شده است.

در این پژوهش سنجش MTT جهت بررسی ظرفیت میتوکندری‌های فعال در اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. این روش که ناشی از تشکیل بنفش فورمازان به وسیله میتوکندری‌های فعال در سلول‌های زنده می‌باشد به طور گسترده جهت ارزیابی قابلیت حیات و تزاید سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). اگر چه این روش تمامیت میتوکندریایی را سنجش می‌کند اما بایستی توجه داشت که احیای MTT همچنین می‌تواند به وسیله دهیدروژنازهای متعلق به دیگر ارگانل‌های سلولی مثل لیزوزوم‌ها نیز صورت گیرد (۵). صرف نظر از اینکه احیای MTT توسط میتوکندری‌ها و یا سایر ساختاری‌های دیگر سلولی صورت می‌گیرد، سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال می‌باشند این احیاء را انجام می‌دهند (۸) و با توجه به مطالب فوق، می‌توان نتیجه گرفت که سنجش MTT به دلیل رنگ‌سنجی و آنالیز آن توسط Elisa، قابلیت تکرار، ارتباط خطی بین فورمازان تولید شده و تعداد سلول‌های زنده، در میان سایر روش‌های سنجش قابلیت حیات، یک روش کمی مناسب و قابل قبول برای ارزیابی قابلیت حیات اسپرم‌ها می‌باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار اسپرم‌ها با کلرید لیتیوم کاهش معنی‌داری در درصد قابلیت حیات و قابلیت تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل به وجود آورد. مطالعات متعددی در همین راستا وجود دارد که نشان می‌دهد لیتیوم بر فراسنجه‌های اسپرمی چون قابلیت حیات و تحرک اسپرم حیوانات اثرات مخرب بر جای می‌گذارد. به‌عنوان مثال لیتیوم در غلظت‌های کم به صورت برگشت‌پذیر مانع حرکت میکروتوبول در تاژک اسپرم توتیای دریایی تحت تیمار با لیتیوم می‌گردد (۹).

مطالعات نشان می‌دهد که قابلیت تحرک، ساختار، بقاء و متابولیک اسپرم توسط پراکسیداسیون لیپید ناشی از ROS معیوب

شده و به دنبال آن موجب کاهش قابلیت تحرک و حیات اسپرم می‌گردد (۱). افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن یکی از عوامل ایجاد آسیب توسط لیتیوم در بافت بیضه است. انباشتگی آنها با کاهش تحرک اسپرم ارتباط مستقیم دارد (۱۲). مطالعات نشان داده است که استرس اکسیداتیو از طریق اختلال در تولید و میزان ATP می‌تواند سبب ایجاد اختلال در تحرک اسپرم گردد (۶). کم شدن تحرک اسپرم در مجاورت استرس اکسیداتیو را می‌توان ناشی از اختلال در فسفریلاسیون اکسونم تاژک دانست (۲۰).

بنابراین این احتمال وجود دارد که کلرید لیتیوم با القا استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید باعث تخلیه ATP در اسپرم شده و در نهایت منجر به از دست رفتن قدرت تحرک و کاهش قابلیت حیات اسپرم گردد. نتایج ما نشان داد که در گروه سیلیمارین+ کلرید لیتیوم، سیلیمارین توانست درصد قابلیت حیات اسپرم را در مقایسه با گروه کلرید لیتیوم جبران نماید که نشان دهنده نقش مثبت سیلیمارین در بقاء و قابلیت حیات اسپرم می باشد. لذا این احتمال وجود دارد که سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی (۱۱) قادر است با مهار استرس اکسیداتیو حاصل از کلرید لیتیوم موجب افزایش قابلیت حیات اسپرم‌ها شود. در همین خصوص، نشان داده شده است که آنتی-اکسیدانت‌هایی مانند سیلیمارین و کوارستین، باعث افزایش توان حیاتی سلول ها شده اند. علاوه بر این، نقش سیلیمارین در خصوص کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو گزارش گردید (۱۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لیتیوم کلراید موجب کاهش تمامیت آکروزوم و القا واکنش آکروزومی زودرس می‌گردد. در همین راستا شواهدی مبنی بر آسیب‌پذیر بودن آکروزوم نسبت به سموم و آلاینده‌های زیست محیطی وجود دارد (۱۵). تحت شرایط فیزیولوژیک، اسپرم مقادیر اندکی ROS تولید می‌کند که برای ظرفیت‌پذیری (Capacitation) ، قدرت تحرک و واکنش آکروزومی ضروری است (۲). با این حال افزایش بیش از اندازه ROS و سایر رادیکال‌های آزاد می‌توانند حالت پاتولوژیکی ایجاد نموده و منجر به واکنش آکروزومی غیرطبیعی گردند (۲۵) رادیکال‌های آزاد باعث آسیب در اکثر ماکرومولکول‌ها شامل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌گردند.

در شرایط طبیعی بین تولید ROS و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی دستگاه تولید مثل نر تعادلی وجود دارد. اما تولید بیش از حد ROS در مایع سمینال می‌تواند بر مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانتی اسپرم یا پلاسمای سمینال غلبه کرده و باعث استرس اکسیداتیو گردد (۲۳). اسپرم دارای وضعیت منحصر به فردی از نظر دفاع آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد. سیتوپلاسم اسپرم دارای محتوای پایینی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است و لذا آنزیم‌های آنتی اکسیدانت داخل اسپرم نمی توانند از پراکسیداسیون غشا اسپرم در نواحی دم و آکروزوم جلوگیری نمایند. به علل گفته شده، اسپرم به میزان بالایی مستعد پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد که می‌تواند به نوبه خود در القا واکنش آکروزومی غیرطبیعی نقش ایفا نماید. بنابراین این احتمال وجود دارد که لیتیوم کلراید با القا استرس اکسیداتیو با غلبه بر سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی اسپرم و همچنین پراکسیداسیون لیپید غشا اسپرم به خصوص در ناحیه آکروزوم واکنش آکروزومی زودرسی را در اسپرم ها القا نموده باشد.

استفاده از سیلیمارین در این پژوهش موجب حفظ تمامیت آکروزوم و جبران اثرات مخرب لیتیوم کلراید در خصوص کاهش تمامیت آکروزوم گردید. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانتی سیلیمارین از جمله تقویت تولید پروتئین، تحریک تشکیل ریبوزوم و تولید DNA و افزایش میزان بیان ژن‌ها (۲۱)، در پژوهش حاضر احتمالا سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت موجب افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی اسپرم شده، از پراکسیداسیون لیپید ناشی از لیتیوم کلراید جلوگیری نموده است و با اثرات سمی لیتیوم کلراید در القا واکنش آکروزومی غیر طبیعی مقابله نموده است.

نتیجه گیری کلی

لیتوم کلراید از طریق ایجاد اکسیدان‌ها سبب اکسیداسیون در سلول اسپرم شده و فعالیت حیاتی آن را کاهش می‌دهد و افزودن سیلیمارین با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی تا حدودی مانع اثرات مخرب لیتیم کلراید بر زنده مانی، تحرک و یکپارچگی آکروزوم اسپرم می‌شود.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی انجام این پروژه تحقیقاتی را امکان پذیر نمود.

منابع

1- Aziz, D. M., L. Ahlswede, and H. Enbergs. 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. Theriogenology, 64: 1350-1356.
2- Brostrom, O. 1990. Prognosis in ulcerative colitis. Medical Clinics of North America, 74: 201-218.
3- Byun, J. W., S. H. Choo., H. H. Kim., Y. J. Kim., Y. J. Hwang, and D. Y. Kim. 2008. Evaluation of boar sperm viability by MTT reduction assay in Beltsville Thawing Solution extender. Asian-Aust. Journal of Animal Science,

4: 494-498.
4- Dalgleish, A. G, and K. O'Byrne. 2006. Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. Cancer Treat Research, 130: 1-38.
5- Dermar, D. A. 2001. The Review of Natural Product. Facts and Comparisons, 13: 405-409.
6- Dixit, D., S. Baboota., K. Kohli., S. Ahmad, and G. Ali. 2007. A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. Indian Journal of Pharmacology, 39: 172-179.
7- Reiter, R. J., D. Tan, and L. C. Manchester. 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. Cell Biochemistry and Biophysics, 34: 237-256.
8- Evans, G., W. M. S. Maxwell, and T. Ahemen. 2013. Sperm quality and testicular morphometry of rabbits fed dietary levels of water spinach (Ipomoea aquatica) leaf meal. Agriculture and Biology Journal of North America, 4(3): 352-357.
9- Fadeel, B., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky. 1999. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?. Biochemical and Biophysical Research Communication, 266(3): 699-717.
10- Favier, A. E., J. Cadet., B. Kalyanaraman, and M. Fontecave. 1995. Analysis of free radicals in biological systems. Birkhauser Verlag, 38(2): 145-158.
11- Feher, A., I. Lang, and K. Nekam. 1990. Involvement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. Biochemical Science, 15: 129-135.
12- Gibbons, B. H, and I. R. Gibbons. 1998. Lithium reversibly inhibits microtubule-based motility in sperm flagella. Nature, 309: 560-562.
13- Jackson, D. M., O. F. Jenkins, and B. Ross. 1988. The motor effects of bromocriptine- A review. Psychopharmacol, 95: 433- 46.
14- Jurjus, A. R, and N. N. Khoury. 2004. Animal models of inflammatory bowel disease. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 50: 81-92.
15- Kang, J. S., Y. J. Jeon., S. K. Park, and K. H. Yang. 2004. Protection against lipopolysaccharide- induced sepsis and inhibition of interleukin - 1beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. Biochemical and Pharmacology, 67(1): 175-81.
16- Kidd, P, and K. Head. 2005. Biochemical effect of the flavolignan silibin on RNA, protein and DNA synthesis in rat liver, Alternative Medicine Review, 10: 193-203.
17- Manna. S. K., A. Mukhopadhyay, and B. B. Aggarwal. 1999. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. Journal of Immunology, 163(12): 6800-6809.
18- Radko, L, and W. Cybulski. 2007. Application of silymarin in human and animal medicine. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, 1(1): 022-026.
19- Rosa, H. J. D, and M. J. Bryant. 2003. Seasonality of reproduction in sheep. Small Ruminant Research, 48: 155-171.
20- Sanocka, D, and M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinlogy, 2: 12-19.
21- Srinivas, P., T. M. Vijaykran., H. V. Mahes, and H. Ganes. 2013. Evaluation of the protective effect of silymarin on doxorubicin induced chronic testicular toxicity in parts. International Journal of Pharmacology and Biology Sciences, 4(1): 473-484.
22- Toovey, S., E. Hudson, and W. F. Hendry. 1989. Sulfasalazine and male infertility. Reversibility and possible mechanism. Gut, 22: 445-451.
23- Watters, D, and M. Lavin. 2005. Signalling Pathways in Apoptosis. CRC Press, Boca Raton, Florida.
24- Wood, A. J. J. 1994. Lithium in the treatment of mood disorders. New England Journal of Medicine, 331(9): 591-8.
25- Zaneveld, L. J. D., R. T. Chatterton, and J. Wiley. 1982. Biochemistry of Mammalian Reproduction. J. Wiley Press, New York.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 4, Winter 2018, p. 498-506

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، ص. ۵۰۶-۴۹۸

Study of Antioxidant Properties of Silymarin in Dealing with the Toxicity of Lithium Chloride in Ram Sperm

T. Choobineh[1]- H. R. Momeni[2]- M. Khodaei Motlagh[3*]- N. Darbandi[4]- A. Khavari[1]

Received: 15-10-2016
Accepted: 07-01-2017

Introduction Lithium as a toxic and heavy metal and environmental contaminant could be a risk factor for male fertility. Lithium can induce male reproductive toxicity through damage in testes structure, sex hormones imbalance and decrease in testes and accessory sex organ weights as well as reduction in epididymal sperm count, normal morphology, viability and motility. Lithium is proposed to exert its cytotoxicity by free radicals generation and the activation of oxidative sensitive signaling pathways. Oxidative stress is metabolic and physiologic status caused by imbalance between free radical production and antioxidant defense of body. Therefore, the use of natural antioxidants could be a possible strategy for reducing oxidative stress in body. Silymarin is extracted from milk thistle (*Silybum marianum*) seeds. This compound is a polyphenolic flavonoid with a potent antioxidant property which not only acts as free radical scavenger but also increases the capacity of cell antioxidant enzymes. This study aimed to evaluate the harmful effects of lithium on sperm of Farahani's ram and to know the protective effect of silymarin on protection against to toxic effects of lithium.

Materials and Methods In this experimental study, Farahani's ram testes were received from Arak slaughterhouse and transferred to the research laboratory under standard conditions. The experiment funding was approved by the ethical committee at Arak University. A few incisions were made in the caudal epididymis and spermatozoa were then washed into a sterile Falcon tube by Ham's F10 medium (Sigma, USA). Firstly sperm number and sperm motility were determined, according to World Health Organization protocol (WHO), to estimate sperm quality. High quality sperm samples were then used for experiments. The sperm samples were separated in eppendorf tubes as each tube contained 5×10^6 spermatozoa and divided into four groups to assess sperm viability. The MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide assay was used to assess viability. In brief, 10 µl of MTT (Sigma, USA) stock solution (5 mg/ml ham's F10) was added to each tube containing sperm suspension and incubated at 37PoPC in COR2R incubator for 1 hr. The tubes centrifuged at 6000 rpm for 6 min and the precipitate was dissolved in 200 µl dimethyl sulfoxide (DMSO). The solution was then centrifuged at 4000 rpm for 4 min. 100 µl of the purple solution were transferred into a 96-well plate and absorbance was measured using ELISA reader (SCO diagnostic, Germany) at 505 nm. Optical density of sample was then used for calculating sperm viability percentage Evaluation of sperm motility was done according to WHO guidelines. Minimum of five microscopic fields was evaluated to estimate sperm motility on at least 200 spermatozoa for each sample. The percentage of sperm motility was evaluated for following motion patterns: progressive motile sperm (PMS), non-progressive motile sperm (NPMS) and non-motile sperm (NMS). Evaluation of sperm motility was done according to WHO guidelines. In brief, 10 µl of sperm suspension was placed on semen analysis chamber. Minimum of five microscopic fields was evaluated to estimate sperm motility on at least 200 spermatozoa for each sample. The percentage of sperm motility was evaluated for following motion patterns: progressive motile sperm (PMS), non-progressive motile sperm (NPMS) and non-motile sperm (NMS). One-Way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to assess data statistical significance. $p<0.05$ was considered significant.

Results and Discussion In this study, the percentage of viability, mobility and integrity of the acrosome in the group treated with lithium chloride significantly decreased compared with the control group. Lithium chloride would have devastating effects caused by the toxicity of the group treated with lithium chloride significantly compensate. Silymarin as a strong antioxidant able to inhibit the damaging effects of lithium on

1- MSc. Student of Biology Department, Faculty of Science, University of Arak, Arak, Iran,
2- Associate Professor of Biology Department, Faculty of Science, University of Arak, Arak, Iran,
3- Associate Professor of Animal Sciences Department, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Arak, Arak, Iran,
4- Assistant Professor of Biology Department, Faculty of Science, University of Arak, Arak, Iran.
(*- Corresponding Author Email: M-motlagh@araku.ac.ir)

some of the ram semen parameters.

Conclusion Our results indicate that lithium chloride has a negative influence on sperm viability and motility. In addition, silymarin is able to compensate the adverse effects of lithium chloride on these parameters.

Keywords: Farahani ram sperm, Lithium chloride, Silymarin.