مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

تاثیر سیلیمارین و لیتیم کلراید بر تمامیت DNA اسپرم اپی‌دیدیمی قوچ نژاد فراهانی

طاهره چوبینه .M.Sc [۱]، مهدی خدایی مطلق .Ph.D [۲*]، حمیدرضا مومنی .Ph.D [۱]
نیلوفر دربندی .Ph.D [۱]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، اراک، ایران
۲- دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mmotlagh2002@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۰

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثر لیتیوم کلراید و سیلیمارین بر تمامیتDNA و هسته اسپرم اپی‌دیدیمی قوچ نژاد فراهانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، بیضه‌های قوچ نژاد فراهانی پس از ذبح در کشتارگاه اراک به‌صورت روزانه به آزمایشگاه منتقل و پس از چند برش در ناحیه اپی‌دیدیم بیضه‌ها، با استفاده از محیط کشت Ham's Flo داخل لوله‌های فالکون، اسپرم شسته و جمع‌آوری شد. سپس اسپرم‌های جمع‌آوری شده به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- اسپرم‌های لحظه در زمان صفر ۲- اسپرم‌های انکوبه شده به‌مدت ۱۸۰ دقیقه (کنترل) ۳- اسپرم‌های تیمار شده با لیتیوم کلراید به‌مدت ۱۸۰ دقیقه ۴- اسپرم تیمار شده با کلرید لیتیم به‌همراه سیلیمارین به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. تمامیت DNA به‌وسیله رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ و تست Sperm chromatin dispersion (SCD) و ساختار مورفولوژیکی آپوپتوزیس در هسته اسپرم به‌وسیله رنگ‌آمیزی دیف‌کوییک مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه بررسی و مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

نتایج: آپوپتوزیس در هسته اسپرم و درصد شکست DNA در گروه تیمار شده با لیتیوم کلراید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. در گروه سیلیمارین+لیتیوم کلراید، سیلیمارین توانست این تغییرات را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه لیتیوم کلراید جبران نماید.

نتیجه‌گیری: استفاده از سلیمارین با آثار آنتی اکسیدانتی توانست سبب ممانعت از اثرات منفی لیتیوم بر شکست DNA و آپوپتوزیس هسته اسپرم شود.

واژگان کلیدی: سیلیمارین، شکست DNA، آپوپتوزیس

مقدمه

سلامت ژنتیکی اسپرم برای لقاح و تکامل جنین ضروری است. مطالعات بسیاری، آسیب DNA در اسپرم را بررسی و ارتباط آن را با ناباروری گزارش نموده‌اند، آسیب DNA اسپرم را می‌توان به‌طور مستقیم توسط تکنیک‌های Comet (The single cell gel electrophoresis assay)، TUNEL(Terminal deoxynucleotidyltransferaseduTPnicklabeling) و یا SCD (Sperm Chromatin Dispersion) که در آن‌ها شکست DNA اندازه‌گیری می‌شود و همچنین با کروماتوگرافی مایع که به‌وسیله آن سطوح اکسیداسیون DNA اندازه‌گیری می‌شود مورد بررسی قرار داد (۱) تنش اکسیداتیو شرایطی همراه با افزایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد که منجر به تخریب سلول می‌شود و توسط اکسیژن و اکسیدانت‌های مشتق شده از آن تحریک می‌شود (۲). اسپرم طی فرآیند متابولیسم، رادیکال آزاد تولید می‌کنند. با وجود آن‌که سطح پایین ROS(Reactive oxygen species) تاثیر فراوانی در عملکرد اسپرم دارد، زمانی‌که این مقدار از حد فیزیولوژیک خود بیشتر شود نه تنها برای سلول مفید نخواهد بود، بلکه می‌تواند آثار زیان باری برای اسپرم به‌دنبال داشته باشد. آنچه باعث می‌شود سطح رادیکال‌های آزاد در مایع منی انزال شده در حد متعادل باقی بماند آنتی‌اکسیدانت‌های درون و برون سلولی هستند که در منی یافت می‌شوند (۳).

در ساختمان مولکول DNA اسپرم، رادیکال‌های آزاد می‌توانند موجب اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمیدین، ایجاد شکستگی در یک یا دو رشته، ایجاد جایگاه‌های بدون باز، تشکیل پل‌های عرضی بین DNA و پروتئین و تغییر در قند دزاکسی ریبوز شوند، رادیکال‌های آزاد قادر هستند که مولکول‌های زیستی حیاتی از جمله DNA را مورد حمله اکسیداتیو قرار داده و تغییراتی در ساختمان DNA ایجاد نمایند، که این تغییرات در DNA اسپرم می‌تواند موجب ناباروری شود. عدم تنظیم و تعادل بین اکسیدانت و آنتی‌اکسیدانت منجر به تنش اکسیداتیو و آسیب به بخش ژنومی و هسته اسپرم می‌شود (۴ و ۵).

مقدار دوز درمانی مشتقات لیتیوم بسیار کم است و با افزایش اندکی در میزان مصرف آن، موجب مسمومیت و القا تنش اکسیداتیو می‌شود و کاهش مختصری در دوز موجب کاهش چشمگیر اثرات درمانی آن می‌شود (۶). لیتیوم باعث کاهش تحرک اسپرم انسان در شرایط *in vitro* می‌شود (۷).

سیلیمارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) استخراج می‌شود. سیلیمارین از لیپوپروکسیداسیون و آسیب غشای سلولی جلوگیری می‌کند (۸). سیلیمارین با اثرات مهم ضداکسیداتیو از طریق کاهش اکسیداسیون گلوتاتیون و افزایش سطح آن و نیز اثر بر آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD) به‌عنوان یک پاک کننده رادیکال‌های آزاد (۹) عمل می‌کند. همچنین سیلیمارین موجب مهار آسیب‌های وارده بر DNA از طریق پراکسید و آنیون‌های سوپراکسید می‌شود (۱۰).

مصرف سیلیمارین در موش‌های صحرایی که بیضه آن‌ها با ماده داکسی روبیسین مسموم شده بود، سبب حفظ تعداد اسپرم در سطح طبیعی، تولید روزانه اسپرم، سطح تستوسترون و اسپرماتوژنز در مقایسه با گروه شاهد مثبت شد (۱۱).

از آن‌جاکه لیتیوم، دارویی بسیار پرمصرف در روانپزشکی است و با توجه به کثرت بیماران مصرف‌کننده این دارو و خطر زیاد بروز عوارض تولیدمثلی ناشی از آن و به‌خصوص با توجه به اثرات مخرب لیتیوم بر دستگاه تناسلی و به‌ویژه اسپرم و نقش آنتی‌اکسیدانت سیلیمارین، و با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای که در آن تاثیر هم‌زمان سیلیمارین و لیتیوم را بر DNA و قطر هسته اسپرم قوچ در محیط برون تنی نشان دهد صورت نگرفته است، این پژوهش با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی سیلیمارین بر

مهار اثرات مخرب لیتیوم بر DNA و قطر هسته اسپرم قوچ فراهانی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با همکاری گروه علوم دامی و گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک صورت گرفت. به‌منظور انجام این تحقیق، سی و چهار عدد از بیضه‌های مربوط به قوچ نژاد فراهانی (با سن۴-۶ سال) بلافاصله پس از کشتار در کشتارگاه اراک، در مجاورت یخ به آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک انتقال داده شد. پس از انتقال بیضه‌ها به آزمایشگاه، اسپرم از اپی‌دیدیم استحصال شد.

نمونه‌ها با استفاده از سرنگ حاوی محیط کشت 25mM Ham's F10+HEPES، اسپرم زنده استحصال شده با روش Swim up از اسپرم مرده جدا شد و پس از مخلوط‌سازی نمونه‌های گرفته شده، به چهار گروه مختلف تقسیم شد. در هر نمونه ۵×۱۰^{۶} اسپرم وجود داشت. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از:

گروه اول: اسپرم زمان صفر، گروه دوم: اسپرم زمان ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، گروه سوم: اسپرم تیمار شده با لیتیوم کلراید به‌مدت ۱۸۰ دقیقه و گروه چهارم: اسپرم تیمار شده با سیلیمارین+لیتیوم‌کلراید به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. به‌منظور غلظت‌یابی لیتیوم‌کلراید، نمونه‌های اسپرم گروه سه به‌طور مجزا در معرض غلظت‌های، ۰/۲، ۰/۵ و یک میلی‌مولار لیتیوم‌کلراید به‌مدت ۱۸۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جهت غلظت‌یابی سیلیمارین، از نمونه‌های اسپرم گروه ۴ (سیلیمارین+ لیتیوم‌کلراید) استفاده گردید. بدین صورت که اسپرم این گروه در لوله‌های مجزا، ابتدا با غلظت‌های۰/۰۵، ۰/۱، و ۰/۱۵ میلی‌مولار سیلیمارین تیمار شده و پس از گذشت ۱۵ دقیقه، غلظت یک میلی‌مولار لیتیوم کلراید اضافه شد. لوله‌های حاوی نمونه به‌مدت ۱۸۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس نمونه‌های اسپرم گروه‌های اشاره شده در بالا هرکدام به‌طور جداگانه به‌منظور بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های ویژه هسته و ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. از رنگ آمیزی آکریدین اورنژ به‌منظور بررسی تمامیت ساختمان دورشته‌ای در مقابل تک‌رشته‌ای DNA و آزمون SCD(Sperm Chromatin Dispersion) جهت بررسی شکست DNA اسپرم استفاده شد.

رنگ آکریدین اورنژ (Acros) ۰/۱۹ درصد در بافر سیترات فسفات با pH= ۲/۵ به صورت زیر تهیه شد:

۱۰۰ میلی‌گرم از پودر اکریدین اورنژ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. این محلول در تاریکی و در یخچال قرار داده شد.

آکریدین اورنژ در واکنش با مولکول DNA دو رشته‌ای رنگ سبز درخشان، در واکنش با مولکول DNA تک‌رشته‌ای رنگ قرمز و با DNA حد واسط رنگ زرد ایجاد می‌کند. در این روش رنگ‌آمیزی با استفاده از محیط اسیدی میزان مقاومت DNA به دناتوره شدن سنجیده می‌شود و در پایان رنگ‌آمیزی درصد اسپرم با DNA تک رشته‌ای (قرمز رنگ)، دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ) و حالت حدواسط (زرد رنگ) تعیین می‌شود (۱۲).

با توجه به مکانیسم متراکم شدن بیشتر DNA در اسپرم نسبت به سلول‌های سوماتیک، با استفاده از آزمون SCD می‌توان درجات متفاوتی از شکست DNA را با استفاده از بافر لیزکننده که منجر به شکسته شدن باندهای دی‌سولفید و خارج شدن پروتئین‌ها می‌شود، ارزیابی کرد. در این حالت حلقه‌های DNA خارج شده و هاله‌ای اطراف ساختار مرکزی هسته تشکیل می‌شود. پس از تیمار با اسید در اسپرمی که دارای DNA شکسته شده است، پراکندگی حلقه‌هایDNA به دام افتاده و بیانگر محدود شدن هاله‌ها یا عدم وجود آن‌ها می‌باشد که متفاوت از اسپرم است که فاقد شکست DNA است. اندازه هاله‌ها بر اساس نوع رنگ‌آمیزی، توسط میکروسکوپ نوری و یا

فلورسانس بررسی می‌شود. انجام این آزمون به‌ترتیب زیر انجام گرفت (۱).

آزمون SCD (Sperm chromatin dispersion):

طبق روش Ferandez و همکاران (۲۰۰۳) مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم را با ۷۰ میکرولیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس این نمونه روی لامی که قبلا با آگاروز ۶۵ درصد پوشانده شده بود قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن به‌مدت چهار دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لامل از لام جدا شد و هر لام به‌صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال به‌مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار داده شد سپس به‌مدت ۲۵ دقیقه در محلول لیزکننده تثبیت شد. شستشو با آب مقطر به‌مدت پنج دقیقه (دو مرتبه) انجام شد و به‌مدت دو دقیقه در الکل ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ درصد آبگیری شد و در دمای اتاق لام‌ها خشک شدند سپس نمونه‌ها با رنگ Wright و PBS به نسبت ۱:۱ به‌مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و مجددا با آب معمولی شستشو و سپس با میکروسکوپ بررسی میزان شکست DNA صورت گرفت که حالات‌های مختلف دیده شد: هسته اسپرم با هاله بزرگ Large Halo، هسته اسپرم با هاله متوسط Medium Halo، هسته اسپرم با هاله کوچک Small Halo، هسته اسپرم بدون هاله NO Halo، سلول اسپرم با DNA تجزیه شد.

در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم مشاهده و درصد شکست DNA به‌صورت حاصل جمع اسپرم با هاله کوچک، بدون هاله و تجزیه شده بیان شد.

ارزیابی جنبه مورفولوژیکی آپوپتوزیس در هسته اسپرم یکی از روش‌های رنگ‌آمیزی برای تهیه لام‌های ریخت‌شناسی اسپرم با کنتراست و کیفیت بالا، رنگ آمیزی Diff-Quick است. در این تحقیق به‌منظور بررسی کمی تغییرات هسته‌ی اسپرم مورد مطالعه در گروه‌های مختلف از این روش رنگ‌آمیزی استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی آکروزوم اسپرم به‌رنگ صورتی، ناحیه پشت آکروزومی، قطعه میانی و دم بنفش تیره دیده می‌شود (۱). ابتدا نمونه‌های اسپرم Swim upشده شمارش و در لوله‌های اپندورف جداگانه به‌طوری‌که هر لوله حاوی ۵×۱۰^{۶} اسپرم بود وارد و به گروه‌های مختلف ذکر شده تقسیم شدند (n=۶ برای هر گروه). با استفاده از عکس‌های گرفته شده، اندازه-گیری قطر کوچک هسته اسپرم در گروه‌های مختلف توسط نرم افزار موتیک برای تعداد ۱۰۰ اسپرم انجام شد.

تهیه لیتیوم کلراید و سیلیمارین: پودر لیتیوم کلراید با وزن مولکولی ۴۲/۳۹۱ گرم از شرکت Merck تهیه شد و پودر سیلیمارین با وزن مولکولی ۴۸۲ گرم از شرکت سیگما خریداری شد.

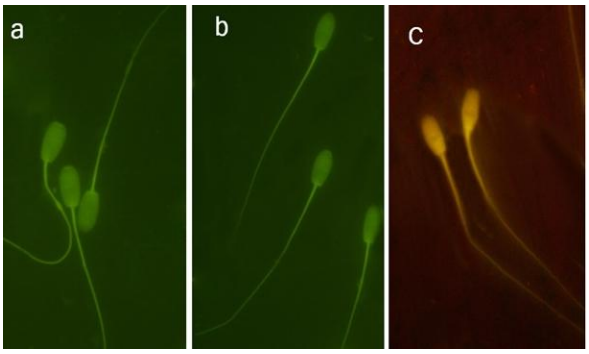
آنالیز آماری

داده‌های حاصل به‌صورت میانگین ± انحراف معیار و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از تست Tueky استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

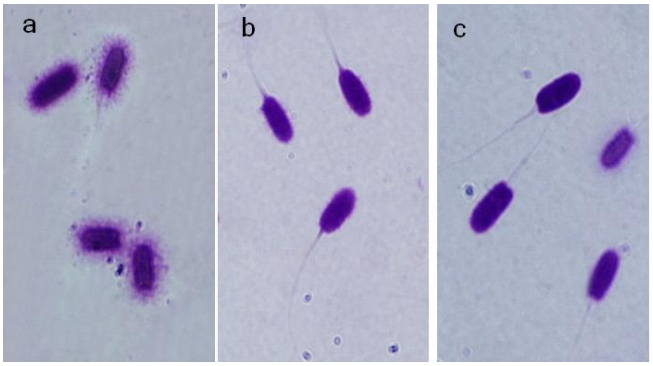
به‌منظور بررسی تغییر ساختمان DNA (دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای)، اسپرم قوچ با غلظت یک میلی‌مولار لیتیوم‌کلراید به‌مدت ۱۸۰ دقیقه تیمار و سپس

رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ بر روی گسترش‌های اسپرمی انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار اسپرم با لیتیوم کلراید در مقایسه با گروه کنترل، اثری بر تغییر ساختار دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشت (شکل۱).

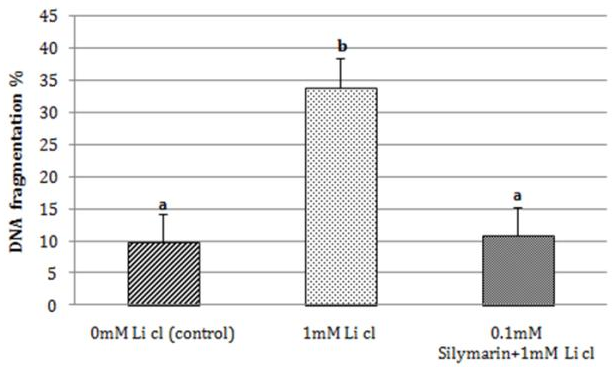


شکل۱: ساختمان دو رشته‌ای DNA در اسپرم قوچ. (a) کنترل: اسپرم‌های DNA دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با لیتیوم کلراید (۱ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه): اسپرم‌ها با DNA دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ)، (c)کنترل مثبت: اسپرم‌ها با DNA تک رشته‌ای (قرمز رنگ). بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.

جهت بررسی درجات متفاوتی از شکست DNA از آزمونSCD استفاده شد. نتایج نشان داد که درصد شکست DNA در گروه تیمار شده با لیتیوم کلراید (یک میلی‌مولار، ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) افزایش یافت. از طرفی در گروه سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار)+ لیتیوم کلراید (یک میلی‌مولار، ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه لیتیوم کلراید (یک میلی‌مولار، ۱۸۰ دقیقه) کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) در درصد شکست DNA مشاهده شد، به‌طوری‌که درصد شکستگی DNA در گروه فوق در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین سیلیمارین توانست شکستگی DNA اسپرم ناشی از لیتیوم کلراید را به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) جبران و نزدیک به سطح کنترل نماید (شکل ۱و نمودار۱).

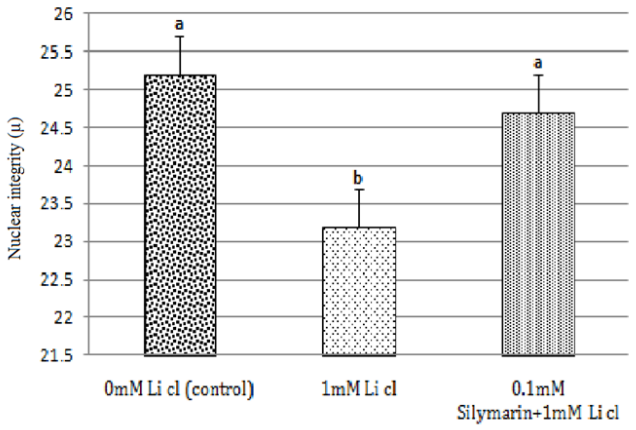


شکل ۲: بررسی شکست DNA در اسپرم‌های قوچ با استفاده از تست SCD. a) اسپرم‌های گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه): تشکیل هاله (عدم شکستگی DNA)، b) اسپرم‌های تیمار شده با لیتیوم کلراید (۱ میلی مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه): عدم تشکیل هاله بیانگر شکستگی DNA، c) اسپرم‌های تیمارشده با سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار)+ لیتیوم‌کلراید (۱ میلی‌مولار) : تشکیل هاله در اکثریت بیانگر عدم شکستگی DNA. بزرگنمایی: ×۱۰۰۰.



نمودار ۱: بررسی شکست DNA اسپرم قوچ به‌کمک تست SCD. درصد شکستگیDNA اسپرم در گروه تیمار شده با لیتیوم کلراید (غلظت ۱ میلی‌مولار،۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر) به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) افزایش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار) و لیتیوم کلراید (۱ میلی مولار) توانست اثرات مخرب لیتیوم کلراید را در خصوص شکست DNA، نسبت به گروه تیمار شده بالیتیوم کلراید (۱ میلی‌مولار) به‌طور معنی‌داری جبران کند. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها می‌باشد. مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه، n= ٦ برای هر گروه، مرز معنی‌داریp<0.05.

به‌منظور بررسی جنبه مورفولوژیکی آپوپتوزیس در هسته اسپرم از رنگ‌آمیزی Diff-Quick و سپس اندازه‌گیری قطر هسته اسپرم استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که قطر هسته اسپرم در گروه مورد تیمار با لیتیوم کلراید (یک میلی‌مولار، ۱۸۰دقیقه) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۵) داشته است. در حالی‌که در گروه تیمار با سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار)+ لیتیوم کلراید (یک میلی‌مولار) افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) در قطر هسته اسپرم مشاهده شد. بنابراین سیلیمارین توانست کاهش در قطر هسته اسپرم توسط لیتیوم کلراید را جبران نماید (نمودار ۲).



نمودار ۲: اندازه‌گیری قطر هسته اسپرم‌های قوچ مورد تیمار با لیتیوم کلراید و سیلیمارین به‌کمک رنگ‌آمیزیDiff-Quick. تیمار اسپرم‌ها به‌مدت ۱۸۰ دقیقه با لیتیوم کلراید (۱ میلی‌مولار) موجب کاهش معنی‌داری در قطر هسته اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. از طرفی تیمار با سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار)+ لیتیوم‌کلراید (۱ میلی‌مولار) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، قطر هسته اسپرم را نسبت به اسپرم‌های گروه لیتیوم کلراید (۱ میلی‌مولار) به‌طور معنی-داری افزایش داد. حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن میانگین‌ها می‌باشد. مقادیر به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است. آنالیز واریانس یک‌طرفه، n=٦، p<0.05

بحث

نتایج بسیاری از مطالعات قابلیت آسیب DNA توسط لیتیوم کلراید را نشان می‌دهد (۱۳ و ۱۴ و ۱۵). لیتیوم‌کلراید باعث آسیب کروموزومی می‌شود ولی با این وجود به‌عنوان یک موتاژن بسیار ضعیف عمل می‌کند. پیشنهاد شده که لیتیوم کلراید با ایجاد ممانعت از بازسازیDNA، آسیب به DNA را گسترش می‌دهد (۱۶). برخی مطالعات نشان داده است که لیتیوم‌کلراید مانع از بازسازی کل ژنوم، بازسازی مرتبط با رونویسی و در نتیجه تعمیر DNA می‌شود که این امر توسط جلوگیری مستقیم یک یا تعدادی از آنزیم‌های خاص صورت نمی‌گیرد بلکه بیشتر از طریق سازوکارهای غیرمستقیم مثل تغییر در بیان ژن، تغییرات بعد از ترجمه و یا تغییر در انتقال فرسته اثر خود را اعمال می‌کند (۱۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لیتیوم کلراید بر ساختمان دو رشته‌ای DNA (تغییر ساختارDNA) بی‌تاثیر بود. تاکنون مطالعه‌ای در این خصوص صورت نگرفته است با این حال در پژوهش حاضر علت عدم تاثیر لیتیوم کلراید بر ساختمان دو رشته‌ای DNA می‌تواند ناشی از عوامل زیر باشد: DNA اسپرم به‌دلیل فشردگی در مقابل آسیب ناشی از لیتیوم کلراید مقاوم باشد و یا ناشی از عدم تاثیر مدت زمان ۱۸۰ دقیقه برای اعمال اثر لیتیوم کلراید باشد. همچنین ممکن است به‌دلیل عدم تاثیر غلظت استفاده شده جهت اعمال اثر لیتیوم کلراید موثر نشده باشد.

در پژوهش حاضر شکست DNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که لیتیوم کلراید با ایجاد شکست در DNA اسپرم باعث قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. شکستگی DNA یکی از مشخصه‌های مرگ سلولی آپوپتوزیس و نکروزیس می‌باشد (۱۸).

از آن‌جا که نقش لیتیوم در القا آپوپتوزیس و شکستگی DNA گزارش شده است (۱۹ و۲۰)، لذا این احتمال وجود دارد که در پژوهش حاضر لیتیوم کلراید از طریق القا آپوپتوزیس موجب شکستگی DNA اسپرم شده باشد که اثر مشابهی با سدیم آرسینات بر سلول‌های اسپرم انسان داشت (۲۱). عوامل آنزیمی مختلفی می‌توانند در طی آپوپتوزیس منجر به شکستگی DNA گردند که از آن جمله می‌توان به نقش DNaseها (۲۲) و پروتئازهایی مثل کاسپازها (۲۳) در این پدیده اشاره نمود. این احتمال وجود دارد که فعال نمودن مستقیم DNaseها توسط لیتیوم کلراید منجر به شکستگی DNA اسپرم شده باشد. علاوه بر این، لیتیوم کلراید می‌تواند با القا آپوپتوزیس منجر به اختلال در سیستم غشایی میتوکندری‌ها و تغییر پتانسیل غشا این اندامک شود (۲۴) که این امر به نوبه خود منجر به آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوژنیک از جمله AIF (Apoptosis-inducing Factor) و اندونوکلئاز G از میتوکندری‌ها شود (۲۵). این عوامل به‌عنوان DNase محسوب می‌شوند که با ورود به هسته منجر به شکستگی DNA می‌شوند (۲۲). هم‌چنین این احتمال وجود دارد که لیتیوم کلراید با فعال نمودن کاسپازها از جمله کاسپاز ۳ در شکستگی DNA اسپرم نقش ایفا نموده باشد. در طی پدیده آپوپتوزیس در اثر محرک‌های القاکننده مرگ، کاسپاز ۳ فعال می‌شود که خود منجر به شکستگی ارتباط بین CAD و ICAD(Inhibitor of CAD) می‌شود. حال CAD فعال می‌تواند با ورود به هسته منجر به شکستگی DNA شود. مطالعات نشان می‌دهد که گونه‌های فعال اکسیژن با تاثیر بر غشای پلاسمایی و ساختار DNA اسپرم می‌توانند سبب بروز آسیب‌هایی در کروماتین و DNA اسپرم شوند (۲۶). از طرف دیگر مطالعات نشان دهنده وجود ارتباط مستقیم بین اختلال در ساختار کروماتین و کاهش کیفیت اسپرم می‌باشند (۲۲ و ۲۷ و ۲۸). با توجه به این نتایج، کاهش کیفیت اسپرم و ایجاد اختلال در تراکم کروماتین

و شکستگی DNA اسپرم قوچ را می‌توان به افزایش ROS و استرس اکسیداتیو نسبت داد. در همین راستا مطالعه‌ای وجود دارد که بیانگر آسیب‌پذیر بودن DNA نسبت به سموم از جمله لیتیوم کلراید است (۲۹) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. از آن جا که نتایج استفاده از سیلیمارین به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در پژوهش حاضر نشان داد که سیلیمارین قادر به جبران اثرات مخرب لیتیوم کلراید در خصوص شکست DNA اسپرم می‌باشد، لذا این احتمال که لیتیوم کلراید از طریق القا تنش اکسیداتیو به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم (به‌واسطه تخریب میتوکندری‌ها و آزاد شدن AIF و اندونوکلئاز G) موجب شکستگی DNA شده است، قوت می‌یابد. عصاره پنیرک صحرایی توانست اثرات مخرب بیضه موش‌های تیمار شده با لیتیم را کاهش دهد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (۳۰). محققین گزارش کرده‌اند که موادی مانند هورمون ملاتونین هم قدرت ضداکسیدانتی و حفاظتی در مقابل اثر منفی لیتیوم بر بیضه‌ها دارند (۳۱). یکی از مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس متراکم شدن هسته و کروماتین می‌باشد (۱۸). از آن‌جا که لیتیوم کلراید قادر است آپوپتوزیس را در سلول‌های مختلف القا نماید (۳۲)، با اندازه‌گیری قطر هسته به بررسی جنبه مورفولوژیکی آپوپتوزیس در هسته اسپرم پرداخته شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که لیتیوم‌کلراید سبب کاهش معنی‌دار قطر هسته اسپرم شده است. مکانیسم اثر لیتیوم دقیق مشخص نیست، اما به‌دلیل شباهت یون لیتیوم به یون سدیم، جایگزین سدیم شده و در ایجاد پتانسیل عمل در سلول‌های عصبی اختلال ایجاد می‌کند، همچنین بر عملکرد واسطه‌های شیمیایی عصبی مثل‌نوراپی‌نفرین، سروتونین، دوپامین واستیل کولین و گیرنده‌های آن‌ها تاثیر می‌گذارد و با کاهش تولید پیام‌رسان ثانویه اینوزیتول تری فسفات ایجاد پاسخ‌سلولی را تضعیف می‌کند (۳۳ و ۳۴).

عوامل القاکننده آپوپتوزیس قادر به فعال نمودن پروتئازهایی از جمله کاسپازها و کالپین‌ها در سلول می‌باشند (۲۳). طی آپوپتوزیس شکل فعال این آنزیم‌ها قادر هستند پروتئین‌های ماتریکس هسته از جمله لامین‌ها (که تمامیت هسته را تضمین می‌نمایند) را مورد حمله قرار داده و منجر به فروپاشی ساختار هسته‌ای و تغییراتی از جمله متراکم شدن هسته و کروماتین شود (۲۹). از آن‌جا که در طی آپوپتوزیس فعال شدن این پروتئازها توسط تنش اکسیداتیو گزارش شده است (۲۳) لذا این احتمال وجود دارد که لیتیوم کلراید با القا تنش اکسیداتیو و در نتیجه فعال نمودن پروتئازهایی از جمله کاسپازها و کالپین‌ها منجر به شکستن پروتئین‌های هسته‌ای شده و بدین ترتیب موجب متراکم شدن هسته یا کاهش قطر هسته شده باشد. در مطالعه حاضر استفاده از سیلیمارین سبب جبران کاهش ایجاد شده در قطر هسته توسط لیتیوم کلراید گردید. با توجه به اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانتی سیلیمارین، این احتمال وجود دارد که در پژوهش حاضر سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت با مهار مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس قادر به جبران کاهش قطر هسته شده است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده اثرات مخرب کلرید لیتیم بر تمامیت DNA و همچنین القا آپوپتوزیس در اسپرم‌های قوچ بود. در مطالعه حاضر استفاده از سیلیمارین سبب جبران کاهش ایجاد شده در قطر هسته و شکستگی DNA اسپرم ناشی شده از لیتیم کلراید شد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در گروه زیست شناسی دانشگاه اراک و با حمایت مالی این دانشگاه صورت گرفته است. نویسندگان

این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی افرادی که در این پژوهش یاری نموده‌اند، به‌عمل می‌آورند.

منابع

1. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. Journal of Andrology. 2003; 24(1): 59-66.

2. Ecerhardt MK. Reactive Oxygen Metabolites: Chemistry and Medical Consequences. 1th Ed. New York CRC press. 2001.

3. Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre J. Analysis of free radicals in biological systems. Berlin: Birkhauser verlag. 1995. 21.

4. O'Flaherty C. Redox regulation of mammalian sperm capacitation.Asian Journal of Andrology. 2015; 17(4): 583-90.

5. Liu Y, O'Flaherty C. In vivo oxidative stress alters thiol redox status of peroxiredox in 1 and 6 and impairs rat sperm quality. Asian Journal of Andrology. 2017; 19(1): 73–79.

6. Cade JR. Lithium salts in the treatment of Psychotic excitement. Medical Journal of Australia. 1991; 36: 349-352.

7. Raoof, NT., Pearson, RM. Turner, P. Lithium inhibits human sperm motility in vitro Department of Clinical Pharmacology, St Bartholomew's Hospital Medical College, London EClA 7BE, British Journal of Clinical Pharmacology. 1989; 28: 715-717.

8. Jurjus AR, Khoury NN. Animal models of inflammatory bowel disease. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2004; 50(2): 81-92.

9. Radko L, Cybulski W. Application of silymarin in human and animal medicine. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research. 2007; 1(1): 022-026.

10. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. Phytomedicine, 2007; 14(2-3): 129-135.

11. Srinivas P, Vijaykran M, Mahes HV, Ganes H. Evaluation of the Protective Effect of silymarin on Doxorubicin Induced chronic Testicular Toxicity in Parts. International Journal of Pharmacology and Biological Sciences. 2013; 4(1): 473-484.

12. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. Journal of Andrology. 2001; 22 (1): 45-53.

13. Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri AK. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic—a review. Mutation Research. 2001; 488(2): 171–194.

14. Rossman TG. Mechanism of Lithium carcinogenesis: an integrated approach. Mutat Res. . 2003; 533(1-2): 37-65.

15. Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India.About this result. Mutation Research. 2003; 534(1-2): 133–143.

16. Raboch J, Smolik P, Soucek K, Raboch J, Krulik R. Spermiologic finding during longterm lithium therapy. Activitas Nervosa Superior. 1981; 23: 274-275.

17. Macleod J, Swan RC, Aitken GA. Lithium: its effect on human spermatozoa, rat testicular tissue and upon rats in vivo. American Journal of Physiology. 1949; 157:177-183.

18. Shariatzadeh SM, Malekirad, AA., Fani, A., Dezfoolian, A. Free radicals and antioxidants. Aeezh publication. 2007; 37-38.(In Farsi).

19. Marmol F. Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium". Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 2008. 32 (8): 1761–1771.

Lithium induced telomere attrition, chromosome stability, and apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2003; 278: 31998-32004.

21. Momeni HR, Bakhtiari, A., Soleimani Mehranjani, M., Abnosi MH., Eskandari, N., Rafeie, M. Evaluation of viability and apoptosis in human sperm treated with sodium arsenite. Journal of Cell and Tissue. 2014; 4(4): 381-388 (In Farsi).

22. Irvine DS, Twigg JP, Gordon, EL., Fulton, N., Milne, PA. DNA integrity in human spermatozoa. Journal of Andrology. 2000; 21(4): 33-443.

23. Sanock D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. Reproductive Biology and Endocrinology. 2004; 2: 12-19.

24. Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of Lithium toxicity and carcinogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry. 2004; 250(2): 67-78.

25. Zhang HB, Lu S M, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJEarly apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. Asian Journal of Andrology. 2008; 10(2): 227-235.

26. Saleh R, Agarwal A. Oxitative stress and male infertility. Journal of Andrology. 2000; 23:737-52.

27. Spano M, Bonde JP, Hyollund HI, Kolstad HA. Sperm chromation damage impairs human fertility. Fertility and Sterility. 2000; 73(1): 43-50.

28. Evenson DP, Darzynkiewicz Z. Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science. 1980; 210(4474): 1131-33.

29. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology. 2000; 48(6): 835-50.

30. Saad AB, Rjeibi I, Alimi H, Ncib S, Smida A, Zouari N, Zourgui L. Lithium induced, oxidative stress and related damages in testes and heart in male rats: The protective effects of Malvasylvestris extract. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2017; 86: 127-135.

20. Liu L, Trimarchi RJ, Navarro P, Blasco MA, Keefa D. Oxidative stress contributes to

31. Shokri S, Kazemi M, Firouzjaei MA, Hemadi M, Moayeri A, Ganjkhani M, Nejatbakhsh R. Melatonin protects testes against lithium-pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in rats: a time course study. Andrologia. 2015; 47(3): 343-53.

32. Shen MR, Yang RC, Chen SS. Effect of Lithium and haloperidol on human sperm motility in-vitro. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1992; 44(6): 534-6.

33. Odagaki Y, Koyama T, Matsubara S, Yamashita I. Effects of lithium on the beta – adrenergic receptor adenylate cyclase system in rat cerebral cortical membranes. Japanese Journal of Pharmacology. 1991; 55(4): 407-14.

34. Prien RF, Kupfer, DJ, Mansky PA, Small JC, Tuason VB, Voss CB, Johnson WE. Drug therapy in the prevention of recurrences in unipolar and biopolar affective disorders; Report of the NIMH collaborative study group comparing lithium carbonate imipramine combination. Archives of General Psychiatry Journal. 1947; 41: 1096-104.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2018; 9(1) *Original Article*

Effect of silymarin and lithium chloride on DNA integrity in epidydimal ram sperm

Choobineh T, M.Sc.[1], Khodaei-Motlagh M, Ph.D.[2]*, Momeni HR, Ph.D[1], Darbandi N, Ph.D[1]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resource, Arak University, Arak, Iran*

* Email corresponding author: mmotlagh2002@gmail.com

Received: 20 Apr. 2018 Accepted: 1 Jul. 2018

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the effect of silymarin and lithium chloride on DNA integrity and nucleus of ram sperm.

Material and Methods: In this study, Farahani's ram testes were obtained from Arak slaughterhouse immediately after ram daily slaughter and transferred to the research laboratory. A few incisions were made in the epididymis, and spermatozoa were then washed into a sterile falcon tube by Ham's F10 medium. collected spermatozoa of ram were divided into four groups: 1. Sperm at 0 hour, 2. Sperm incubated for180 minutes (control), 3. Sperm treated with lithium chloride for 180 minutes and 4. Sperm treated with silymarin + lithium chloride for 180 minutes. DNA integrity and DNA fragmentation were investigated by acridine orange staining sperm chromatin expersion (SCD) test respectively. Morphological feature of apoptosis in sperm nucleus was assessed using Diff-Quick staining. Data were analyzed using one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Turkey's test .

Results: The percentage of DNA fragment and apoptosis were significantly increased in lithium chloride-treated group compared to the control. In silymarin+ lithium chloride group, Silymarin could signicantly compensate these effect compared to the lithium choloride group.

Conclusion: Silymarin as a potent antioxidant could prevent toxic effect of lithium on DNA fragmentation and apoptosis in sperm nucleus.

Keywords: Silymarin, DNA fragmentation, apoptosis