مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷

اثر محافظتی سیلیمارین بر قابلیت حیات، قابلیت تحرک و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم

حمیدرضا مومنی Ph.D.[1*]، حوری سپهری Ph.D.[2]، مهری یوسفی M.Sc.[2]، نجمه اسکندری M.Sc.[1]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، ایران
۲- دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی، گروه فیزیولوژی جانوری، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h-momeni@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

چکیده

هدف: این پژوهش با این هدف انجام شد تا مشخص نماید که آیا سیلیمارین قادر است اثرات مخرب آلومینیوم را بر روی قابلیت حیات، قابلیت تحرک و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم قوچ مهار کند.

مواد روش‌ها: اسپرم‌های اپی‌دیدیمی قوچ فراهانی به پنج گروه ۱- اسپرم‌های لحظه صفر، ۲- اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳- اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید (0.5 mM) به‌مدت۱۸۰ دقیقه ۴- اسپرم‌های تیمار توام آلومینیوم کلراید (0.5 mM) + سیلیمارین (0.5 µM) به‌مدت ۱۸۰ دقیقه و ۵- اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین به‌مدت ۱۸۰ دقیقه تقسیم شدند. برای بررسی قابلیت حیات و پتانسیل غشای میتوکندری به‌ترتیب از سنجش MTT [3 – (4,5- dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] و رنگ آمیزی رودامین ۱۲۳ استفاده شد در حالی‌که قابلیت تحرک بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: تیمار اسپرم‌ها با آلومینیوم‌کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه درصد قابلیت حیات، حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها و پتانسیل طبیعی غشای میتوکندری را در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داد. همچنین این آلاینده به‌طور معنی‌داری موجب افزایش حرکات درجا و ساکن اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل شد. در گروه سیلیمارین+آلومینیوم، سیلیمارین به‌طور معنی‌داری توانست اثرات سمی آلومینیوم کلراید را بر این پارامترهای اسپرمی (به استثنای حرکات درجا) در مقایسه با گروه آلومینیوم مهار کند.

نتیجه‌گیری: آلومینیوم کلراید اثر سمی بر قابلیت حیات، قابلیت تحرک و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم قوچ دارد و سیلیمارین توانست اثرات مخرب آلومینیوم کلراید را بر روی پارامترهای مذکور جبران نماید.

واژگان کلیدی: آلومینیوم کلراید، اسپرم قوچ، پارامترهای اسپرم، سیلیمارین

مقدمه

آلومینیوم یک عنصر غیرضروری و سمی برای بدن انسان است (۱). با این‌حال انسان از راه‌های متعدد در معرض این عنصر قرار می‌گیرد. آلومینیوم در صنعت تصفیه آب (۲)، داروسازی، صنایع غذایی (۳)، تهیه رنگ و تهیه مواد آرایشی (۴) استفاده می‌شود. نشان داده شده است که پس از روند تصفیه آب، مقدار آلومینیوم در آن در حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد افزایش پیدا می‌کند (۲). این عنصر از طریق داروها، پوست صدمه دیده و دستگاه تنفس جذب و وارد بدن می‌شود (۵). به این ترتیب انسان و دام به‌طور فزاینده‌ای از طریق آب، هوا، صنعت، مواد دارویی و مواد افزودنی غذا در معرض این عنصر قرار می‌گیرند (۶). اثر آلومینیوم بر روی سیستم عصبی (۷)، استخوان‌ها (۸)، سیستم قلب و عروق (۹)، خون (۱۰)، دستگاه گوارش (۱۱) و دستگاه تولید مثل (۱۲) به اثبات رسیده است. آلومینیوم همچنین اثرات سویی در باروری داشته و نقش آن در بروز اختلالات دستگاه تناسلی مرد به اثبات رسیده است (۱۳). در این خصوص مشخص شده است که آلومینیوم باعث کاهش تعداد، تحرک و قابلیت حیات اسپرم (۱۴) می‌شود و اثرات مخربی بر تمامیت غشای پلاسمایی و تمامیت آکروزوم اسپرم دارد (۱۲).

مطالعات نشان داده است که توانایی آلومینیوم در ایجاد سمیت در انسان و حیوان عمدتا به‌علت توانایی آلومینیوم در تولید گونه‌های واکنش‌گر (negyxO evitcaeR SOR ,seicepS) و سایر رادیکال‌های آزاد و همچنین مهار سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی در اندام‌هایی مثل بیضه، کبد، ریه و مغز است (۱۵). با توجه به اثرات سمی آلومینیوم و نقش محوری آن در القا استرس اکسیداتیو، استراتژی استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها و به‌خصوص آنتی اکسیدانت‌های گرفته شده از گیاهان دارویی می‌تواند با هدف افزایش ظرفیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی بدن گامی در جهت کمک به جاروب رادیکال‌های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو در بدن بردارد. این امر احتمالا می‌تواند راه حل پیشنهادی مناسبی برای جلوگیری از روند ناباروری به‌خصوص در جوامع صنعتی باشد.

سیلیمارین فلاونوئیدی است که به‌عنوان ماده موثر عصاره گیاه ماریتیغال یا خار مریم (*Silybum marianum*) شناخته شده (۱۶) و دارای اثرات دارویی متعددی از جمله خاصیت ضد التهابی و ضد سرطانی می‌باشد (۱۷-۱۸) علاوه بر این، سیلیمارین به‌عنوان یک ماده آنتی اکسیدانت قوی (۱۶)، تنظیم‌کننده مقدار گلوتاتیون داخل سلولی و تثبیت‌کننده غشا سلولی مطرح است (۱۹). خاصیت آنتی اکسیدانتی سیلیمارین به‌خاطر ساختمان پلی‌فنلی به‌همراه گروه متوکسی موجود بر روی یکی از حلقه‌های فنلی می‌باشد (۲۰). اثرات حفاظت سلولی سیلیمارین وابسته به خواص آنتی اکسیدانتی و جارو کردن رادیکال‌های آزاد آن می‌باشد و می‌تواند به‌طور مستقیم با اجزا غشا سلولی واکنش داده و سبب جلوگیری از هر گونه ناهنجاری در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت طبیعی غشا شود (۲۱). سیلیمارین با این خاصیت قادر است از فرایندهای پراکسیداسیون دخیل در ضایعات کبدی ناشی از تتراکلرورکربن، اتانول، پاراستامول و سایر مواد سمی کبدی پیشگیری کند (۲۲).

عواملی همچون قابلیت حیات، قابلیت تحرک و تمامیت میتوکندری‌ها در جهت فراهم نمودن موثر ATP برای تحرک اسپرم به‌عنوان فاکتورهای کلیدی در سلامت اسپرم محسوب می‌شوند و می‌توانند تضمین‌کننده 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 آلومینیوم بر دستگاه تولیدمثل نر و این که این اثرات احتمالا از طریق القا استرس اکسیداتیو اعمال می‌شود، این پژوهش با این هدف انجام شد تا مشخص شود که آیا سیلیمارین قادر است اثرات مخرب آلومینیوم بر قابلیت حیات، قابلیت

تحرک و تمامیت میتوکندری‌های اسپرم قوچ را مهار نماید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی، گروه‌بندی و تیمار اسپرم‌ها: در این تحقیق تجربی، بیضه‌های قوچ فراهانی بالغ بلافاصله بعد از ذبح در کشتارگاه اراک، در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی انتقال یافتند. به‌منظور جمع‌آوری اسپرم، چند برش در ناحیه دمی اپی‌دیدیم ایجاد شد و سپس اسپرم‌ها به‌وسیله سرنگ حاوی محیط کشت (*Human Tubal Fluid, HTF*) به‌درون لوله فالکون استریل وارد شدند. ابتدا پارامترهای غلظت و قابلیت تحرک اسپرم تعیین شد تا اطلاعات اولیه‌ای از لحاظ کیفیت اسپرم کسب شود. سپس نمونه‌های اسپرمی با کیفیت بالا از نظر تعداد و تحرک در انکوباتور ۷۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. شمارش اسپرم و بررسی قابلیت تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization, WHO) انجام شد. نمونه‌های اسپرم بعد از شمارش در لوله‌های اپندورف جداگانه تفکیک شد به‌طوری‌که هر لوله حاوی ۵×۱۰^{۶} اسپرم در محیط کشت باشد. سپس لوله‌های حاوی سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت به پنج گروه (n=۶ برای هر گروه) تقسیم شدند: ۱- اسپرم‌های لحظه صفر، ۲- اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳- اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید (۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه)، ۴- اسپرم‌های تیمار توام سیلیمارین (۰/۵ میکرومولار) و آلومینیوم‌کلراید (۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه) و ۵- اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۰/۵ میکرومولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه). لوله‌های حاوی نمونه‌های اسپرم در محیط کشت در طول مدت تیمار در انکوباتور $CO_۲$ دار و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. غلظت‌های اشاره شده از آلومینیوم کلراید و سیلیمارین به‌عنوان غلظت‌های موثر این مواد مد نظر می‌باشند که پس از غلظت‌یابی حاصل و برای کلیه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفته شد.

سنجش قابلیت حیات اسپرم، سنجش MTT: برای ارزیابی قابلیت حیات اسپرم از روش سنجش MTT – 3] (4,5- dimethy lthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] استفاده شد (۲۳). بدین ترتیب سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت (حاوی ۵×۱۰^{۶} اسپرم) از گروه‌های مختلف در لوله‌های اپندورف جداگانه وارد شدند. سپس به‌هر کدام از لوله‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول غلیظ MTT (۵mg/ml) اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. لوله‌ها سپس با دور mpr ۶۰۰۰ به‌مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از برداشت محلول رویی در ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (OSMD) حل شد. سپس محلول با دور mpr ۴۰۰۰ به‌مدت چهار دقیقه مجددا سانتریفیوژ شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بنفش رویی در پلیت ۹۶ خانه وارد شد. سپس جذب نوری محلول بنفش رنگ حاصل با استفاده از دستگاه الایزا (ynamreG,citsongaid OCS) با طول موج ۵۰۵ نانومتر خوانده شد. درصد قابلیت حیات نمونه‌های اسپرم گروه‌های مختلف با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد قابلیت حیات} = \frac{\text{دانسیته نوری نمونه}}{\text{دانسیته نوری کنترل}} \times ۱۰۰$$

سنجش قابلیت تحرک اسپرم: سنجش حرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO, 2010) انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم گروه‌های پنج گانه روی لام چمبر با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و حرکات اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. حداقل پنج میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک ۲۰۰ اسپرم بررسی و درصد اسپرم‌های پیشرونده، درجا و بدون حرکت محاسبه شد.

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم-رنگ آمیزی رودامین ۱۲۳

پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم بر اساس روش ارائه شده توسط Johnson و همکاران (۲۴) انجام شد. به‌طور خلاصه به هر کدام از لوله‌های حاوی سوسپانسیون اسپرم در محیط کشت گروه‌های پنج گانه، پنج میکرولیتر از رنگ رودامین ۱۲۳ با غلظت نهایی mg/ml ۱ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگه‌داری شد. سوسپانسیون با دور g 300 به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد. سپس روی رسوب حاصل یک میلی‌لیتر از محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) اضافه، با دور g 300به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی دور ریخته شد. به منظور شستشوی اسپرم این مرحله دو مرتبه انجام شد. در مرحله آخر روی رسوب حاصل یک میلی‌لیتر از محلول PBS اضافه شد. بعد از پیپتاژ چند میکرولیتر از سوسپانسیون روی لام قرار گرفت و بعد از تهیه گسترش، توسط میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, DP71, Japan) مجهز به دوربین، با فیلتر مناسب با بزرگنمایی ×۱۰۰۰ تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش و اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری طبیعی به‌صورت درصد بیان شد. در این روش قطعه میانی اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری طبیعی به‌صورت رنگ سبز درخشان و قطعه میانی اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری آسیب دیده به‌صورت غیر درخشان ظاهر شدند.

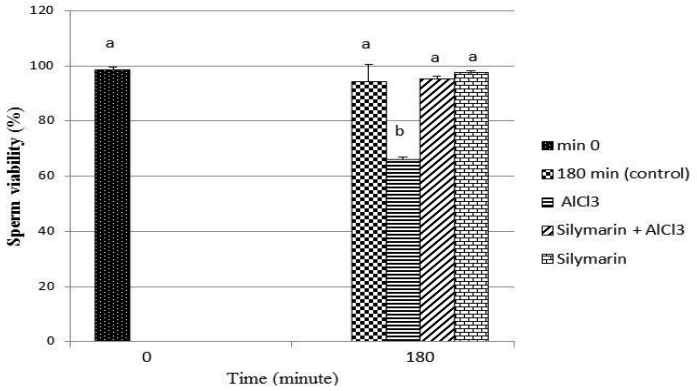
آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها: داده‌های حاصل به‌صورت میانگین ± انحراف معیار، بیان و توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تفاوت میانگین‌ها در سطح p <۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی قابلیت حیات اسپرم

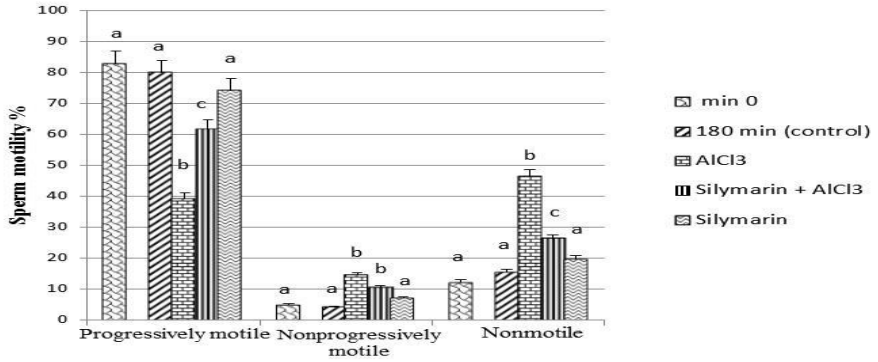
سنجش MTT نشان داد که درصد قابلیت حیات اسپرم در گروه‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین و آلومینیوم کلراید این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با آلومینیوم کلراید به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) تا حد گروه کنترل جبران کرد (نمودار ۱). این نمودار همچنین نشان می‌دهد که کاربرد سیلیمارین به‌تنهایی و همچنین انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه (کنترل) تغییر معنی‌داری را در درصد قابلیت حیات آن‌ها به‌ترتیب نسبت به گروه کنترل و لحظه صفر ایجاد نکرد.



نمودار ۱: ارزیابی قابلیت حیات اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین (۰/۵ میکرومولار) و آلومینیوم کلراید (۰/۵ میلی‌مولار) به‌کمک سنجش MTT. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n=6 برای هر گروه، p<0.05.

ارزیابی قابلیت تحرک اسپرم

در اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید نسبت به گروه کنترل، درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) داشت. در حالی‌که در این گروه درصد اسپرم‌های با حرکت درجا (p<۰/۰۵) و بدون حرکت (p<۰/۰۰۱) افزایش معنی‌داری را نشان داد (نمودار۲). در اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین+ آلومینیوم کلراید، سیلیمارین توانست کاهش حرکات پیش‌رونده اسپرم‌ها و افزایش اسپرم‌های بدون حرکت ناشی از آلومینیوم کلراید را به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه آلومینیوم کلراید جبران نماید (نمودار ۲).

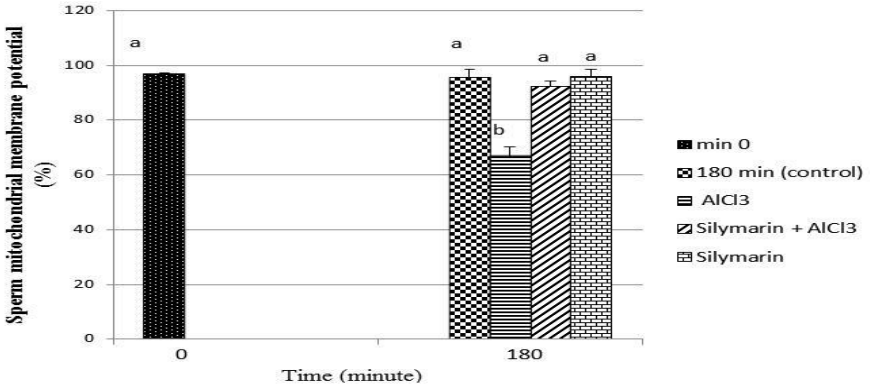


نمودار۲: ارزیابی قابلیت تحرک اسپرم (حرکات پیش‌رونده، حرکات درجا، و بی‌حرکت) قوچ در گروه‌های‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرو مولار و آلومینیوم کلراید ۰/۵ میلی‌مولار. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، n =6 برای هر گروه$p<0.05$.

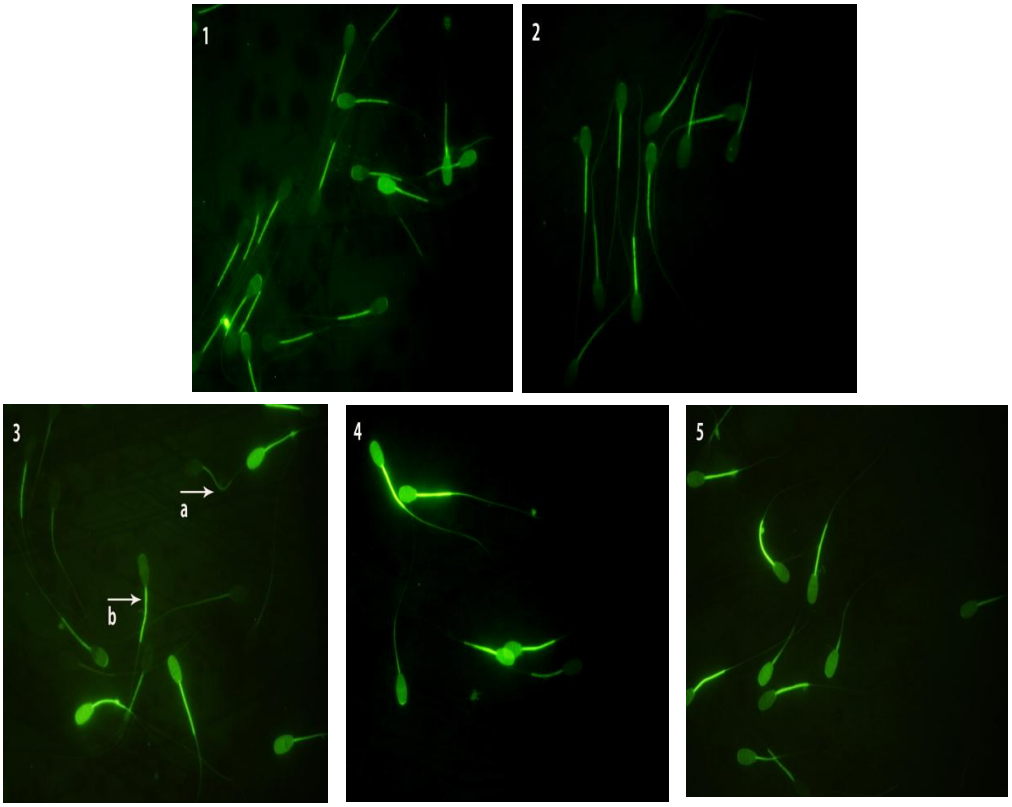
این نمودار همچنین نشان می‌دهد که کاربرد سیلیمارین به‌تنهایی و همچنین انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه تغییر قابل ملاحظه‌ای در سه سطح حرکتی اشاره شده به‌ترتیب نسبت به گروه کنترل و لحظه صفر ایجاد نکرده است.

ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم

نتایج نشان داد که درصد اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری طبیعی در گروه تیمار شده با آلومینیوم کلراید به‌مدت ۱۸۰ دقیقه نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) کاهش یافت. در گروه سیلیمارین + آلومینیوم کلراید به مدت ۱۸۰ دقیقه سیلیمارین توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با آلومینیوم کلراید به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) جبران کند (نمودار ۳ و شکل ۱). این نمودار همچنین نشان می‌دهد که کاربرد سیلیمارین به‌تنهایی و همچنین انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه تغییر قابل ملاحظه‌ای در درصد پتانسیل طبیعی غشای میتوکندری به‌ترتیب نسبت به گروه کنترل و لحظه صفر ایجاد نکرده است (نمودار ۳).



نمودار ۳: ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری در اسپرم قوچ تیمار شده با سیلیمارین (۰/۵ میکرومولار) و آلومینیوم کلراید (۰/۵ میلی‌مولار). مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، n=6 برای هر گروه، $p<0.05$



شکل ۱ : ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری در اسپرم قوچ تیمار شده با سیلیمارین و آلومینیوم کلراید توسط رنگ‌آمیزی رودامین ۱۲۳. ۱) اسپرم‌های لحظه صفر ۲) اسپرم‌های گروه کنترل (پس از ۰۸۱ دقیقه) ۳) اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه ٤) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار + آلومینیوم کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه ۵) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. a- اسپرم با پتانسیل غشای میتوکندری آسیب‌دیده با گردن غیر درخشان. b- اسپرم با پتانسیل غشای طبیعی، گردن اسپرم رنگ سبز درخشان بزرگنمایی x ۱۰۰۰.

بحث

قابلیت حیات و تحرک اسپرم از جمله پارامترهایی است که منعکس‌کننده صلاحیت عملکرد اسپرم است و با قابلیت الحاق موفق اسپرم با تخمک مرتبط می‌باشند. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار اسپرم قوچ فراهانی با آلومینیوم کلراید سبب کاهش معنی‌داری در قابلیت حیات، پتانسیل طبیعی غشای میتوکندری و اختلال در طرح‌های حرکتی اسپرم شد و سیلیمارین توانست اثرات زیان آور این آلاینده را بر روی این پارامترهای اسپرم جبران کند. اینکه آلومینیوم با چه مکانیسم(هایی) منجر به اختلال در این پارامترهای عملکردی اسپرم شده است قابل بحث است. احتمالات متعددی وجود دارد که طی آن آلومینیوم توانسته است اثرات نامطلوب خود را اعمال نموده باشد. با توجه به این‌که آلاینده‌های زیست محیطی با تولید رادیکال‌های آزاد و القا استرس اکسیداتیو نقش مهمی در خصوص ضعف عملکردی اسپرم و بنابراین ناباروری دارند، این‌طور می‌توان فرض کرد که آلومینیوم با قابلیت القا استرس اکسیداتیو اثرات مخرب را بر روی این پارامترهای اسپرم ایجاد نموده باشد. رادیکال‌های آزاد معمولا از طریق فعالیت طبیعی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت موجود در سلول از بین می‌رود. از طرف دیگر مواد سمی نظیر آلومینیوم، با کاهش تولید PTA رادیکال‌های آزاد بیشتری تولید می‌نمایند. این عدم توازن بین رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی باعث تولید استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۵). علاوه بر این، آلومینیوم از طریق مهار آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی می‌تواند استرس اکسیداتیو را القا نموده (۲۶) و باعث کاهش عمل‌کرد میتوکندری شود (۲۷).

مطالعات نشان داده‌اند که قابلیت تحرک و متابولیک اسپرم توسط پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از رادیکال‌های آزاد معیوب شده و به‌دنبال آن موجب کاهش قابلیت تحرک و حیات اسپرم می‌شود (۲۸). از آنجا که غشای پلاسمایی اسپرم غنی از اسیدهای چرب غیراشباع (که برای سیالیت غشای پلاسمایی اسپرم و در نتیجه قابلیت تحرک و ادغام غشاها به‌منظور لقاح ضروری است) و همچنین دارای سیستم آنتی اکسیدانتی ضعیف می‌باشد، بنابراین به پراکسیداسیون لیپید توسط رادیکال‌های آزاد بسیار حساس است (۲۹). رادیکال‌های آزاد سبب مهار یک یا تعداد بیشتری از آنزیم‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و گلیکولیز در سیتوپلاسم می‌شود و در نتیجه تولید PTA را به‌وسیله اسپرم محدود می‌کند. کاهش PTA نیز موجب کاهش فسفوریلاسیون وابسته به PTA پروتئین‌های آکسونم (که برای تحرک اسپرم ضروری است) می‌شود (۲۹). از این رو کاهش قابلیت تحرک اسپرم می‌تواند با آسیب میتوکندریایی مرتبط باشد (۳۰). آلومینیوم می‌تواند با اختلال در آنزیم‌های میتوکندری در عملکرد این اندامک اختلال ایجاد کند و بدین ترتیب تحرک اسپرم را تحت تاثیر قرار دهد (۳۱). علاوه بر این، فلزات سنگین قادر به تجمع در بافت‌های جانوران بوده و در فرایند تکامل اسپرم نیز تاثیرات منفی دارند. این فلزات همچنین با اتصال به پروتئین و یا آنزیم‌های موثر بر متابولیسم تاژک اسپرماتوزوئید موجب تغییر ساختار تاژک، دژنره شدن پروتئین‌ها و توقف تحرک اسپرم می‌شوند (۳۲).

اثر آسیب‌رسان غیر مستقیم آلومینیوم بر روی پتانسیل غشای میتوکندری و همچنین قابلیت حیات از طریق القای استرس اکسیداتیو به این‌صورت قابل توجیه است که رادیکال‌های آزاد با اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها از طرفی سبب نفوذپذیر شدن غشای خارجی و داخلی میتوکندری و در نهایت آزادسازی پروتئین های پیش آپوپتوزی محدود به فضای بین دو غشا و همچنین از دست رفتن پتانسیل غشای داخلی میتوکندری می‌گردد و از طرف دیگر با آسیب به آنزیم‌های میتوکندریایی سبب اختلال در سنتز ATP و همچنین اختلال در اعمال متابولیکی میتوکندری می‌گردد. رادیکال‌های آزاد همچنین با اکسید کردن منافذ غشای میتوکندری سبب باز شدن آن‌ها می‌شوند (۳۳). این منافذ کمپلکس پروتئینی بزرگ هستند که در محل ارتباط بین غشای

داخلی و خارجی میتوکندری قرار دارند و هنگامی که باز می‌شوند به کلسیم و همچنین دیگر ترکیبات با جرم مولکولی کم ماتریکس اجازه می‌دهد که به راحتی میتوکندری را ترک کنند و در نتیجه سبب بالا رفتن غلظت کلسیم در حد کشنده و از دست رفتن پتانسیل غشای میتوکندری (که برای سنتز PTA ضروری است) می‌گردد (۳۳). افزایش غیر طبیعی یون کلسیم داخل سلولی منجر به کاهش قابلیت حیات و سرانجام مرگ سلولی می‌شود (۳۴). بدین ترتیب که افزایش این یون موجب تجمع بیش از اندازه کلسیم در میتوکندری‌ها شده و منجر به تغییر ولتاژ غشای این اندامک و باز شدن منافذ آن می‌شود که به‌واسطه آن موجب آزاد شدن پروتئین‌های آپوپتوژنیک همچون سیتوکروم C، فاکتورهای القاکننده آپوپتوزیس (FIA) و آندونوکلئاز G از این اندامک می‌شود (۳۵).

با توجه به مطالب اشاره شده این‌طور می‌توان فرض کرد که در این پژوهش آلومینیوم با القا استرس اکسیداتیو منجر به کاهش قابلیت تحرک و قابلیت حیات و همچنین اختلال در پتانسیل طبیعی غشا میتوکندری اسپرم شده است. برای بررسی این فرضیه کاربرد یک آنتی اکسیدانت می‌تواند اثرات مخرب آلومینیوم ناشی از القای استرس اکسیداتیو را جبران نماید. در این خصوص، در تحقیق حاضر نشان داده شد که سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی (۳۶) توانست کاهش قابلیت حیات، کاهش درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده، افزایش درصد اسپرم‌های ساکن و همچنین کاهش درصد اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری طبیعی را در گروه تیمار شده با سیلیمارین + آلومینیوم کلراید به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه تیمار شده با آلومینیوم کلراید جبران کند. لذا این احتمال وجود دارد که سیلیمارین از طریق حذف و یا کاهش رادیکال‌های آزاد و یا افزایش سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی اسپرم توانسته است با مهار استرس اکسیداتیو، اختلالات حاصل از آلومینیوم کلراید را در پارامترهای اسپرم از جمله قابلیت حیات، تحرک و پتانسیل غشای میتوکندری بهبود بخشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلومینیوم کلراید قابلیت حیات، قابلیت تحرک و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم را کاهش داد و سیلیمارین توانست اثرات مخرب آلومینیوم کلراید را بر روی پارامترهای مذکور جبران نماید. بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید و همچنین آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی اسپرم در گروه‌های مورد آزمایش که جهت پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌شود می‌تواند در جهت تقویت این نتیجه‌گیری کمک نماید.

منابع

1. Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2007; 10 Suppl 1: 1-269.

2. Tomperi J, Pelo M, Leiviska K. Predicting the residual aluminum level in water treatment process. Drink. Water Eng. Sci. 2013; 6(1): 39-46.

3. Stahl T, Taschan H, Brunn H. Aluminium content of selected foods and food products. Environ. Sci. Eur. 2011; 23(1): 1-11.

4. Pineau A, Fauconneau B, Sappino AP, Deloncle R, et al. If exposure to aluminium in antiperspirants presents health risks, its content should be reduced. J Trace Elem Med Biol. 2014; 28(2): 147-50.

5. Exley C. Human exposure to aluminium. Environ Sci Process Impacts. 2013; 15(10): 1807-1816.

6. Soni MG, White SM, Flamm WG, Burdock GA. Safety evaluation of dietary aluminum. Regul Toxicol Pharmacol. 2001; 33(1): 66-79.

7. Shaw CA Tomljenovic L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in

humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. Immunol Res. 2013; 56(2-3): 304-16.

8. Malluche HH. Aluminium and bone disease in chronic renal failure. Nephrol Dial Transplant. 2002; 17 Suppl 2: 21-4.

9. ElMazoudy RH Bekhet GA. In ovo toxico-teratological effects of aluminum on embryonic chick heart and vascularization. Environ Sci Pollut Res Int. 2016; 23(21): 21947-21956.

10. Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Perez G, et al. Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein. Biochim Biophys Acta. 2002; 1558(2): 142-50.

11. Pineton de Chambrun G, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, et al. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. Mucosal Immunol. 2014; 7(3): 589-601.

12. Berihu BA. Histological and Functional Effect of Aluminium on Male Reproductive System. Int J Pharm Sci Res. 2015; 6(8): 1122-1132.

13. Klein JP, Mold M, Mery L, Cottier M, et al. Aluminum content of human semen: implications for semen quality. Reprod Toxicol. 2014; 50: 43-8.

14. Yousef MI, El-Morsy AM, Hassan MS. Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. Toxicology. 2005; 215(1-2): 97-107.

15. Yousef MI, Kamel KI, El-Guendi MI, El-Demerdash FM. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. Toxicology. 2007; 239(3): 213-23.

16. Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, et al. An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. Forsch Komplementmed. 2007; 14(2): 70-80.

17. Kaur M Agarwal R. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to bedside? Toxicol Appl Pharmacol. 2007; 224(3): 350-9.

18. Ramasamy K Agarwal R .Multitargeted therapy of cancer by silymarin. Cancer Lett. 2008; 269(2): 352-62.

19. Basiglio CL, Sanchez Pozzi EJ, Mottino AD, Roma MG. Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. Chem Biol Interact. 2009; 179(2-3): 297-303.

20. Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. Altern Med Rev. 2009; 14(3): 226-46.

21. Pradhan SC Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med Res. 2006; 124(5): 491-504.

22. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillan E, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Soto J, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. World J Hepatol. 2014; 6(3): 144-9.

23. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011; 731: 237-45.

24. Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. J Cell Biol. 1981; 88(3): 526-35.

25. Bernard A. Cadmium & its adverse effects on human health. Indian J Med Res. 2008; 128(4): 557-64.

26. Sanchez-Iglesias S, Mendez-Alvarez E, Iglesias-Gonzalez J, Munoz-Patino A, et al. Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. J Neurochem. 2009; 109(3): 879–888.

27. Becaria A, Campbell A, Bondy SC. Aluminum as a toxicant. Toxicol Ind Health. 2002; 18(7): 309-20.

28. Agarwal A Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am. 2002; 29(4): 817-27.

29. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl. 2000; 21(6): 895-902.

30. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod. 2002; 17(3): 704-9.

31. Zatta P, Ibn-Lkhayat-Idrissi M, Zambenedetti P, Kilyen M, et al. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. Brain Res Bull. 2002; 59(1): 41-5.

32. Dietrich GJ, Dietrich M, Kowalski RK, Dobosz S, et al. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. Aquat Toxicol. 2010; 97(4): 277-84.

33. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4(7): 552-65.

34. Mattson MP, Duan W, Guo Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. J Neurochem. 2003; 84(3): 417-31.

35. Jeong SY Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. BMB Rep. 2008; 41(1): 11-22.

36. Soria EA, Eynard AR, Quiroga PL, Bongiovanni GA. Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. Life Sci. 2007; 81(17-18): 1397-402.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2018; 9(2) *Original Article*

Protective effect of silymarin on viability, motility and mitochondrial membrane potential in spermatozoa treated with alominium.

Momeni HR, Ph.D.[1*], Sepehri H, Ph.D. [2], Yosefi M, M.Sc. [2], Eskandari N, M.Sc.[1]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran
2. Department of Animal Physiology, Faculty of Biology, Tehran University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: h-momeni@araku.ac.ir

Received: 17 Sep. 2018 Accepted: 25 Feb. 2018

Abstract

Aim: This study was performed to investigate if silymarin can prevent the adverse effects of aluminum chloride on viability, motility and mitochondrial membrane potential in ram sperm.

Material and Methods: Epididimal spermatozoa from Farahani's ram were divided into five groups: 1. Sperm at 0 hour, 2. Sperm at 180 minutes (control), 3. Sperm treated with aluminum chloride (0.5 mM) for 180 minutes, 4. Sperm treated with silymarin (0.5 μM) + aluminum chloride (0.5 mM) for 180 minutes and 5. Sperm treated with silymarin (0.5 μM) for 180 minutes. In order to evaluate viability and mitochondrial membrane potential in the groups, MTT ((3-4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltenyltetrazolium bromide) assay and Rhodamine 123 staining were used respectively. Sperm motility was done according to World Health Organization (WHO) protocol. Data were analysed using one-way ANOVA fallowed by Tukey's test.

Results: The percentage of sperm viability, progressive motility and intact mitochondrial membrane potential were significantly decreased in the aluminum chloride group compared to the control. This pollutant also significantly increased the percentage of non-progressively motile and non-motile sperm compared to the control group. In silymarin + aluminum chloride group, silymarin could significantly compensate the adverse effect of aluminum chloride on the sperm parameters (except to non-progressively motile) compared to the aluminum chloride group.

Conclusions: Aluminum chloride has toxic effect on ram sperm viability, motility and intact mitochondrial membrane potential and silymarin is able to compensate the adverse effect of aluminum chloride on these sperm parameters.

Keywords: Aluminum chloride, ram sperm, silymarin, sperm parameters