

تأثیر سیلیمارین بر تمامیت DNA و هسته اسپرم قوچ تیمار شده با سدیم آرسنیت

فرزانه اسکندری، M.Sc.، حمیدرضا مؤمنی، Ph.D.*

- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱

چکیده

هدف: این مطالعه با این هدف انجام شد تا مشخص شود که آیا سیلیمارین قادر است اثرات مخرب سدیم آرسنیت را بر روی تمامیت DNA و هسته اسپرم قوچ محافظت کند.

مواد و روش‌ها: اسپرم‌های گرفته شده از اپی‌دیدیم قوچ فراهانی (*Ovis aries*)، پس از Swim up به پنج گروه تقسیم شدند: ۱- اسپرم‌های لحظه صفر، ۲- اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳- اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت ($10\ \mu\text{M}$) به مدت ۱۸۰ دقیقه، ۴- اسپرم‌های تیمار توام سیلیمارین ($20\ \mu\text{M}$) + سدیم آرسنیت ($10\ \mu\text{M}$) به مدت ۱۸۰ دقیقه و ۵- اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ($20\ \mu\text{M}$) به مدت ۱۸۰ دقیقه. تمامیت DNA اسپرم قوچ با استفاده از تست Sperm Chromatin Dispersion (SCD)، به منظور بررسی شکستگی DNA و رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ، جهت بررسی دناتورده شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی تمامیت هسته اسپرم، پس از رنگ‌آمیزی با دیف-کوئیک، قطر هسته اسپرم اندازه‌گیری شد.

نتایج: در گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت، درصد شکستگی DNA نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش و قطر هسته به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی که این آلاینده زیست محیطی تأثیری بر دناتورده شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشت. کاربرد مشترک سیلیمارین + سدیم آرسنیت توانست شکستگی DNA و کاهش قطر هسته را نسبت به گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت به طور معنی‌داری جبران کند.

نتیجه گیری: سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی قادر است اثرات مخرب سدیم آرسنیت را بر شکستگی DNA و قطر هسته اسپرم قوچ جبران نماید.

واژگان کلیدی: اسپرم، آرسنیک، سیلیمارین

مقدمه

تقاضای روز افزون بشر برای غذا، ایجاد کارخانه‌ها، راه‌ها و استخراج معادن سبب شده که محیط زیست به انواع فلزات سمی آلوده شود. امروزه برخی از این آلاینده‌ها علاوه بر آلوده‌سازی محیط زیست و آب وارد چرخه‌های غذایی شده‌اند (۱). یکی از این آلاینده‌ها آرسنیک است که بیستمین عنصر فراوان موجود در پوسته زمین را تشکیل می‌دهد. در صنعت و صنایع ذوب فلزات این فلز نامحلول به‌طور مکرر به فرم‌های محلول آرسنات و آرسنیت تبدیل شده و پس از ورود به طبیعت سبب آلوده شدن منابع طبیعی و منابع آب آشامیدنی می‌شود (۲). علاوه بر این، کاربرد آرسنیک در ساخت شیشه، آفت کش‌ها، علف‌کش‌ها، مواد کشنده جوندگان، مواد نگه دارنده و محافظ چوب نیز موجب آلوده شدن محیط زیست می‌شود (۳). بدین ترتیب روند رو به افزایش ورود آرسنیک به محیط زیست موجب شده است که سلامت انسان و دام به مخاطره افتد. مطالعات نشان‌دهنده آثار مخرب آرسنیک بر سیستم تولیدمثل جانور نر می‌باشد که منجر به ناباروری آن‌ها می‌شود. طبق تحقیقات انجام شده، آرسنیک سبب کاهش وزن بیضه (۴)، افزایش قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش ذخیره اسپرماتوزوئید (۴ و ۵)، کاهش تعداد اسپرم‌های بالغ (۵ و ۶)، کاهش قابلیت حیات و تحرک اسپرم‌ها (۵ و ۷)، کاهش هورمون‌های دخیل در تولیدمثل شامل LH (Luteinizing Hormone)، FSH (Follicle Stimulating hormone) و تستوسترون (۴ و ۶) می‌شود. مشخص شده است که آرسنیک با تولید رادیکال‌های آزاد و القای استرس اکسیداتیو اثرات مخرب خود را اعمال می‌کند (۸ و ۹). علاوه بر این آرسنیک ممکن است سطح آنتی‌اکسیدانت‌های داخل سلولی را کاهش دهد (۱۰). در این صورت استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌تواند از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی، اثرات مخرب این آلاینده زیست محیطی را خنثی نماید. سیلیمارین ماده موثر به‌دست آمده از دانه یا میوه گیاه دارویی خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* است که به‌عنوان یک فلاونوئید پلی‌فنلی محسوب می‌شود و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی آن به اثبات رسیده است (۱۱ و ۱۲).

DNA اسپرم نیمی از ژن‌های لازم برای ایجاد یک فرد کامل را به‌همراه دارد. مواد ژنتیکی اسپرم طبیعی برای لقاح

موفق و رشد جنین که در نهایت منجر به ایجاد یک نسل سالم می‌شود، مورد نیاز است. بنابراین DNA غیر طبیعی می‌تواند سبب ایجاد اختلال در فرایند تولید مثل شود (۱۳). مطالعات متعددی ارتباط بین کاهش توان باروری با درصد اسپرم‌های با DNA آسیب دیده را گزارش کردند (۱۴ و ۱۵). از آنجاکه با گسترش روند صنعتی شدن جوامع، میزان ورود آرسنیک به محیط زندگی انسان و دام افزایش یافته است و با توجه به اثرات مخرب آرسنیک بر تولید مثل و ناباروری احتمالاً از طریق القای استرس اکسیداتیو، لذا این مطالعه با این هدف انجام شد تا بررسی کند آیا سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی قادر است اثرات مخرب سدیم آرسنیت را بر تمامیت DNA و هسته اسپرم قوچ فراهانی مهار نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و روش جمع‌آوری اسپرم از ایپی‌دیدیم: بیضه‌های قوچ فراهانی بلافاصله بعد از ذبح در کشتارگاه اراک، دریافت و در مجاورت یخ کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی انتقال داده شد. نکات اخلاقی در مطالعات بالینی و حیوانی رعایت شد. ابتدا چند برش در ناحیه دمی ایپی‌دیدیم ایجاد و سپس اسپرم‌ها با سرنگ حاوی محیط کشت Ham's F10 (Sigma, USA) داخل یک لوله فالكون استریل وارد شدند. ابتدا پارامترهای تعداد و قابلیت تحرک اسپرم تعیین شد تا اطلاعات اولیه از لحاظ کیفیت اسپرم کسب شود. سپس نمونه‌های اسپرم با کیفیت بالا به منظور Swim up شدن، به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی سلامت (۱۶) انجام شد.

گروه‌بندی و تیمار اسپرم‌ها: نمونه‌های اسپرم Swim up شده بعد از شمارش در خانه‌های پلیت‌های استریل تفکیک شدند به‌طوری‌که هر خانه حاوی 5×10^6 اسپرم بود. سپس پلیت‌های حاوی اسپرم به ۵ گروه ($n=6$) برای هر گروه) به‌ترتیب زیر تقسیم شدند:

- ۱- اسپرم‌های لحظه صفر، ۲- اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، ۳- اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت ($10 \mu\text{M}$) به مدت ۱۸۰ دقیقه، ۴- اسپرم‌های تیمار توام سیلیمارین ($20 \mu\text{M}$) + سدیم آرسنیت ($10 \mu\text{M}$) به مدت ۱۸۰ دقیقه (سیلیمارین ۱۵ دقیقه قبل از سدیم آرسنیت

به کار برده شد)، ۵- اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ($20 \mu\text{M}$) به مدت ۱۸۰ دقیقه. اسپرم‌های گروه‌های مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در انکوباتور CO_2 دار نگهداری شدند.

ارزیابی شکست DNA اسپرم توسط تست SCD (Sperm Chromatin Dispersion): با توجه به مکانیسم متراکم شدن بیشتر DNA در اسپرم نسبت به سلول‌های سوماتیک، با استفاده از تست SCD می‌توان درجات متفاوتی از شکست DNA را با استفاده از بافر لیز کننده که منجر به شکسته شدن باندهای دی‌سولفید و خارج شدن پروتئین‌ها می‌شود، ارزیابی کرد. برای انجام این تست، ابتدا لام‌ها با نرمال آگارز ۰/۶۵ درصد پوشیده شدند. سپس ۱۴۰ میکرولیتر از آگارز ۱ درصد با درجه ذوب پایین با ۶۰ میکرولیتر نمونه اسپرم مخلوط و یک لامل بر روی آن قرار داده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نگهداری شد. پس از جدا سازی لامل از لام، هر لام در دمای اتاق و در تاریکی به صورت افقی در محلول اسیدکلریدریک ۰/۸ درصد به مدت ۷ دقیقه قرار گرفت. سپس هر لام بعد از قرار گیری در محلول لیز کننده به مدت ۲۵ دقیقه، با آب مقطر به مدت ۵ دقیقه (دو بار) شسته و در هر یک از الکل‌های ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ درصد به مدت ۲ دقیقه آب‌گیری شد. پس از خشک شدن لام‌ها در دمای اتاق، رنگ‌آمیزی با رنگ Wright و PBS (1x) به نسبت ۱:۱ به مدت ۱۰ دقیقه انجام و سپس لام‌ها با آب معمولی شسته شدند (۱۷). با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $1000\times$ در هر نمونه ۲۰۰ اسپرم مشاهده و شکست DNA به صورت درصد اسپرم‌های بدون هاله (DNA شکسته شده) بیان شد.

بررسی DNA دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای (دنا توره شدن DNA) توسط رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ: برای رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت گروه‌های پنج گانه بر روی لام قرار داده شد و یک گسترش از نمونه تهیه شد. پس از خشک شدن گسترش‌ها در هوا، لام در محلول فیکساتور متانول-اسید استیک گلاسیل (به نسبت ۳ به ۱) به مدت ۱۴ ساعت قرار داده شد. سپس لام‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با محلول اکریدین اورنژ (۱۹ درصد در بافر سترات فسفات، $\text{pH}=2/5$) رنگ‌آمیزی شده و به مدت ۵

دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. لامل گذاری با استفاده از یک قطره محلول PBS (Phosphate (1x) Buffered Saline) توسط میکروسکوپ فلورسانس (OLYMPUS, DP71, Japan) مجهز به دوربین، با فیلتر مناسب و با استفاده از بزرگنمایی $1000\times$ ، در هر اسلاید ۱۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ پذیری در ۳ گروه شامل: اسپرم‌های سبز رنگ (با DNA طبیعی)، اسپرم‌های زرد رنگ (حالت حدواسط) و اسپرم‌های قرمز رنگ (با DNA دناتوره تک رشته‌ای) بررسی شدند. برای تهیه نمونه کنترل مثبت، ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم و محلول اکریدین اورنژ در یک لوله اپندورف ریخته شد. سپس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد (۱۸). بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از نمونه برای تهیه گسترش استفاده شد و با بزرگنمایی $1000\times$ بررسی و عکس گرفته شد.

بررسی تغییرات کمی قطر هسته اسپرم-رنگ‌آمیزی دیف-کوئیک: برای بررسی کمی تغییرات هسته‌ای اسپرم از رنگ‌آمیزی دیف-کوئیک استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی آکروزوم اسپرم بنفش کم‌رنگ و هسته، قطعه میانی و دم بنفش تیره دیده می‌شود (۱۷). برای رنگ‌آمیزی، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم گروه‌های پنج گانه بر روی لام قرار داده شد و یک گسترش از نمونه تهیه شد. پس از خشک شدن گسترش‌ها، لام‌ها به مدت ۲۵ ثانیه به ترتیب در فیکساتور متانول خالص، محلول رنگ Diff-Quick-1 و محلول رنگ Diff-Quick-2 قرار داده شدند (۱۷). نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $1000\times$ ارزیابی و عکس‌گیری شد. با استفاده از عکس‌های گرفته شده، قطر کوچک هسته اسپرم‌ها در گروه‌های پنج گانه توسط نرم افزار موتیک برای تعداد ۱۰۰ اسپرم اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها

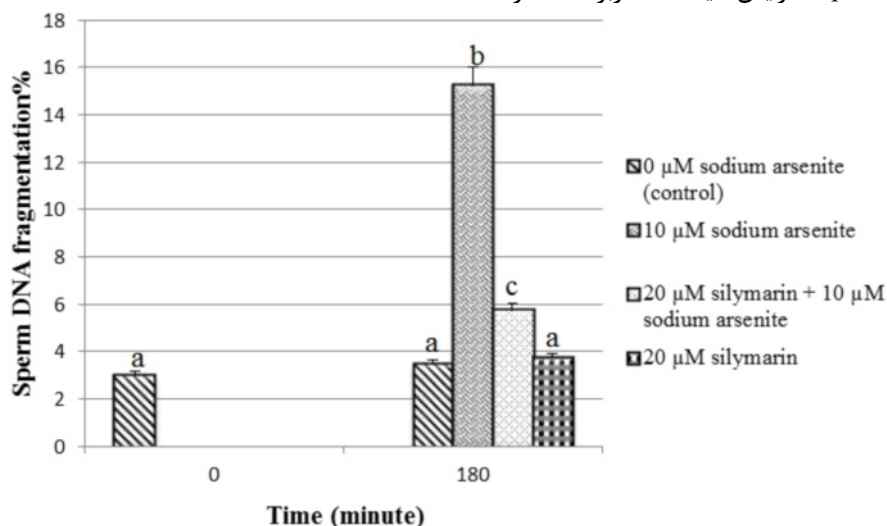
داده‌های حاصل به صورت میانگین \pm انحراف معیار با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از تست آماری Tukey's test استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

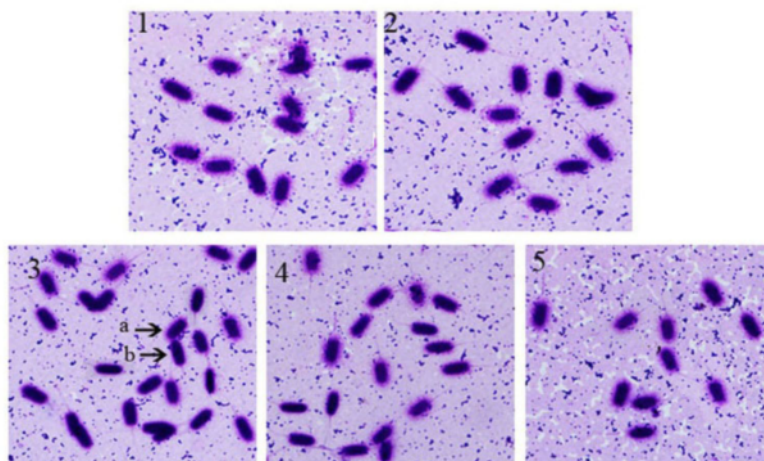
ارزیابی شکست DNA اسپرم

نتایج نشان داد که درصد شکستگی DNA در گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) به طور معنی داری ($p < 0/001$) افزایش یافت. کاربرد مشترک

سیلیمارین (۲۰ میکرومولار) + سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار) به طور معنی داری ($p < 0/001$) تا حد گروه کنترل جبران کند (شکل ۱ و ۲).



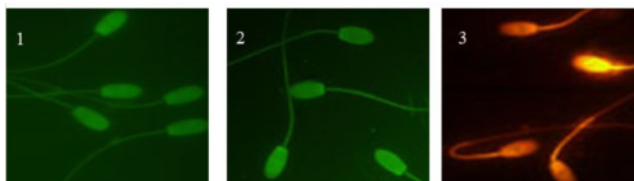
شکل ۱: ارزیابی شکستگی DNA اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین و سدیم آرسنیت توسط تست SCD (Sperm Chromatin Dispersion). مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کدحرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. آنالیز واریانس یک طرفه، تست توکی، $n=6$ برای هر گروه $p < 0/05$



شکل ۲: ارزیابی شکست DNA در اسپرم قوچ تیمار شده با سیلیمارین و سدیم آرسنیت به مدت ۱۸۰ دقیقه توسط تست SCD (Sperm Chromatin Dispersion). (۱) اسپرم‌های لحظه صفر (۲) اسپرم‌های گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰) (۳) اسپرم‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) (۴) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۲۰ میکرومولار + سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) (۵) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۲۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) (a) اسپرم با DNA سالم، با هاله (b) اسپرم با DNA شکسته شده، بدون هاله. بزرگنمایی $\times 1000$

بررسی دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA به تک رشته‌ای اسپرم-رنگ آمیزی اکریدین اورانژ

تیمار اسپرم‌ها با غلظت ۱۰ میکرومولار سدیم آرسنیت به مدت ۱۸۰ دقیقه در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه زمانی ۱۸۰ دقیقه)، تأثیری روی دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشت (شکل ۳).

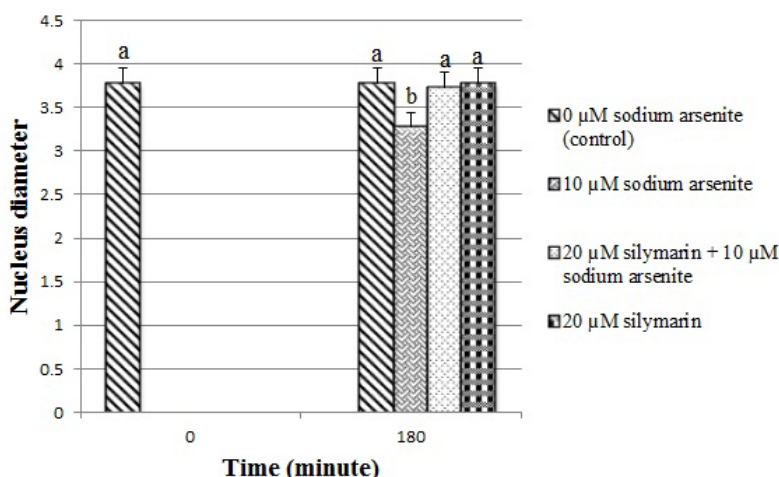


شکل ۳: ارزیابی دنا توره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم توسط رنگ آمیزی اکریدین اورنژ. ۱- اسپرم‌های گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه)، اسپرم با DNA دو رشته‌ای سالم سبز رنگ، ۲- تیمار اسپرم با سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) در مقایسه با کنترل تأثیر قابل توجهی بر دنا توره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA نداشت (۳) کنترل مثبت: اسپرم قوچ با DNA تک رشته‌ای زرد رنگ. بزرگنمایی $\times 1000$.

بررسی تغییرات قطر هسته اسپرم-رنگ آمیزی دیف کوئیک

($p < 0.001$) کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین ۲۰ میکرومولار + سدیم آرسنیت ۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت (۱۰ میکرومولار) به طور معنی داری ($p < 0.001$) تا حد گروه کنترل جبران کند (شکل ۴).

نتایج نشان داد که قطر هسته در گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت ۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه ۱۸۰ دقیقه) به طور معنی داری



شکل ۴: بررسی تغییرات قطر هسته اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین و سدیم آرسنیت-رنگ آمیزی دیف کوئیک. میانگین‌های با کدحرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می‌باشد. آنالیز واریانس یک طرف، تست توکی، $n=6$ برای هر گروه $p < 0.05$.

شکست DNA اسپرم می‌باشد (۲۳ و ۲۴). بنابراین این احتمال وجود دارد که شکستگی DNA و متراکم شدن هسته اسپرم در این پژوهش نیز ناشی از القای استرس اکسیداتیو توسط سدیم آرسنیت باشد. در جهت حمایت از این احتمال نتایج ما نشان داد که سیلیمارین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی (۱۱ و ۱۲) توانست اثرات مخرب سدیم آرسنیت را در خصوص تمامیت DNA و هسته اسپرم بهبود بخشد. اینکه استرس اکسیداتیو حاصل از سدیم آرسنیت از چه مکانیسم و مسیری منجر به شکستگی DNA و متراکم شدن هسته اسپرم شده است به تحقیق بیشتری نیاز دارد. با این حال، باتوجه به اینکه شکستگی DNA و متراکم شدن هسته به ترتیب از مشخصه‌های بیوشیمیایی (۲۵) و مورفولوژیکی (۲۶) آپوپتوزیس محسوب می‌شوند، این فرضیه قوت می‌گیرد که در این پژوهش سدیم آرسنیت احتمالاً با تولید رادیکال‌های آزاد و

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که سدیم آرسنیت موجب افزایش درصد شکستگی DNA و کاهش قطر هسته اسپرم قوچ شد و سیلیمارین توانست اثرات مخرب این آلاینده زیست محیطی را بر این پارامترها مهار نماید. ترکیبات آرسنیک برای سلول سمی هستند (۱۹) که از جمله خواص سمی آن می‌توان به القای استرس اکسیداتیو اشاره کرد (۲۰). آرسنیک با تولید رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (reactive oxygen species, ROS) (۲۱) و یا کاهش سطح آنتی‌اکسیدانت‌های داخل سلولی (۸) می‌تواند نقش خود را در القای استرس اکسیداتیو ایفا نماید. مشخص شده است که آرسنیک با تولید ROS یا ایجاد اختلال در عملکرد آنزیم‌های ترمیم کننده DNA سبب آسیب به DNA می‌شود (۱۳). مطالعات متعدد بیانگر رابطه مستقیم بین افزایش ROS و

به علت زمان تأثیر و غلظت سدیم آرسنیت برای اعمال اثر بر روی دنا توره شدن DNA باشد. علاوه بر این فشردگی زیاد کروماتین در اسپرم بالغ به وسیله بسته بندی توسط پروتامین طی اسپرمیوژن (۳۷) ممکن است علت عدم دنا توره شدن DNA توسط سدیم آرسنیت باشد.

نتیجه گیری

سدیم آرسنیت سبب شکستگی DNA و کاهش قطر هسته اسپرم قوچ شد. از آنجا که سیلیمارین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی توانست اثرات مخرب سدیم آرسنیت را بر این پارامترهای اسپرم مهار نماید، احتمالاً این آلاینده زیست محیطی اثرات خود را بر این پارامترها از طریق القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس اعمال نموده است.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در گروه زیست شناسی دانشگاه اراک انجام شده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی افرادی که در این پژوهش یاری نموده اند به ویژه سرکار محترم خانم نجمه اسکندری کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی به عمل می آورند.

منابع

1. Ng JC. Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. *Environ Chem*. 2005; 2(3): 146-60.
2. Lee TC, Wang-Wuu S, Huang RY, Lee KCC, et al. Differential effects of pre-and posttreatment of sodium arsenite on the genotoxicity of methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 1986; 46(4 Part 1): 1854-7.
3. Akter KF, Owens G, Davey DE, Naidu R. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2005; 184: 97-149.
4. Jana K, Jana S, Samanta PK. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 4(9): 1-13.
5. Mukherjee S, Mukhopadhyay P. Studies on arsenic toxicity in male rat gonads and its protection by high dietary protein supplementation. *Al Ameen J Med Sci*. 2009; 2(1): 73-7.

بنابراین القای استرس اکسیداتیو، یک یا چند مسیر از مسیرهای آپوپتوزیس را در اسپرم فعال نموده و از این طریق منجر به شکستگی DNA و متراکم شدن هسته اسپرم شده باشد. رادیکال های آزاد می توانند به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم از طریق فعال کردن مسیر داخلی آپوپتوزیس سبب شکستگی تک رشته ای یا دو رشته ای DNA شوند (۲۷ و ۲۸). در این مسیر رادیکال های آزاد قادرند غشای خارجی میتوکندری را نفوذپذیر و موجب آزاد سازی پروتئین های پیش آپوپتوزی مستقر در فضای بین دو غشای میتوکندری مثل سیتوکروم c، AIF (Apoptosis Inducing Factor) اندونوکلئاز G و CAD (Caspase-Activated DNase) به داخل سیتوسل شوند (۲۹). سیتوکروم c مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس وابسته به کاسپاز را فعال می کند (۳۰). انواع کاسپازهای فعال شده از طریق کاسپاز ۳ سبب فعال سازی اندونوکلئازهای سلولی و در نهایت شکستگی DNA می شوند (۳۱). همچنین سایر پروتئین های پیش آپوپتوزی شامل AIF و اندونوکلئاز G و CAD می توانند پس از انتقال به هسته، سبب شکستگی DNA و همچنین تراکم کروماتین شوند (۳۲ و ۳۳).

ماتریکس یا اسکلت هسته ای شامل پروتئین های متعددی از جمله لامین ها می باشد که نقش مهمی در حفظ تمامیت هسته دارند و واجد ارتباطاتی با کروماتین و غشای هسته می باشند (۳۴). مطالعات نشان می دهند که لامین ها در طی آپوپتوزیس شکسته شده (۳۵) و بدین ترتیب موجب فروپاشی ساختار هسته می شوند. مشخص شده است که در فرایند آپوپتوزیس کاسپاز ۶ می تواند به عنوان یک پروتئاز لامین عمل نماید (۳۶). بنابراین این احتمال وجود دارد که در این پژوهش سدیم آرسنیت با القای استرس اکسیداتیو منجر به آغاز فرایند آپوپتوزیس شده و در این مسیر با فعال نمودن نوکلئازها و پروتئازها به ترتیب سبب شکستگی DNA و متراکم شدن هسته شده باشد. بررسی جزئیات مربوط به شکستگی DNA از طریق الکتروفورز و همچنین بررسی فعالیت کاسپازها در اسپرم های تیمار شده با سدیم آرسنیت و سیلیمارین می تواند در اثبات یا رد فرضیه مطرح در این پژوهش کمک نماید.

نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که سدیم آرسنیت بر روی دنا توره شدن DNA بی تأثیر بود. این نتیجه می تواند

17. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003; 24(1): 59-66.
18. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, et al. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 1984; 42(1): 87-91.
19. Lau A, He Q, Chiu J. A proteome analysis of the arsenite response in cultured lung cells: evidence for in vitro oxidative stress-induced apoptosis. *Biochem J.* 2004; 382 (Pt 2): 641-50.
20. Flora SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(2): 257-81.
21. Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderón-Aranda ES, et al. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 177(2): 132-48.
22. De Vizcaya-Ruiz A, Barbier O, Ruiz-Ramos R, Cebrian ME. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2009; 674(1): 85-92.
23. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 2005; 95(4): 503-7.
24. Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005; 322(1): 33-41.
25. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, et al. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45(7): 923-34.
26. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994; 73(8): 2013-26.
27. Lynn S, Gurr JR, Lai HT, Jan KY. NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000; 86(5): 514-9.
6. Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM, et al. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. *Asian J Androl.* 2003; 5(1): 27-32.
7. Eskandari F, Momeni HR. Protective effect of silymarin on viability, motility and mitochondrial membrane potential of ram sperm treated with sodium arsenite. *Int J Reprod Biomed.* 2016; 14(6): 397-402.
8. Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2004; 255(1-2): 67-78.
9. Kessel M, Liu SX, Xu A, Santella R, et al. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem.* 2002; 234(1): 301-8.
10. Kannan GM, Flora SJS. Chronic arsenic poisoning in the rat: treatment with combined administration of succimers and an antioxidant. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004; 58(1): 37-43.
11. Hadaruga DI, Hadaruga NG. Antioxidant activity of hepatoprotective Silymarin and Silybum marianum L. extract. *Chem Bull "Politehnica" Univ Timisoara, Rom Ser Chem Environ Eng.* 2009; 54(68): 104-7.
12. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(3): 803-6.
13. Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, et al. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14(3): 384-95.
14. Spanò M, Bonde JP, Hjellund HI, Kolstad HA, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril.* 2000; 73(1): 43-50.
15. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1997; 56(3): 602-7.
16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization; 2010.

33. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001; 412(6842): 95-9.
34. Martelli AM, Bareggi R, Bortul R, Grill V, et al. The nuclear matrix and apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 1997; 108(1): 1-10.
35. Gruenbaum Y, Wilson KL, Harel A, Goldberg M, et al. Review: nuclear lamins-structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol*. 2000; 129(2): 313-23.
36. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol*. 2000; 129(2): 346-58.
37. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(6): 746-57.
28. Liu F, Jan KY. DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(1): 55-63.
29. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gurp M, et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004; 23(16): 2861-74.
30. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006; 13(9): 1423-33.
31. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276(10): 7320-6.
32. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001; 410(6828): 549-54.

Effect of silymarin on DNA and nuclear integrity of ram sperm Treated with sodium arsenite

Eskandari F. M.Sc., Momeni HR. Ph.D

- Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

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

Received: 31 Dec. 2016

Accepted: 28 May. 2017

Abstract

Aim: This study was performed to investigate if silymarin can prevent the adverse effects of sodium arsenite on ram sperm DNA and nuclear integrity.

Material and Methods: Epididymal sperm obtained from Farahani's ram (*Ovis aries*) was swim up and divided into five groups: 1. Sperm at 0 hour, 2. sperm at 180 minutes (control), 3. sperm treated with sodium arsenite (10 μ M) for 180 minutes, 4. sperm treated with silymarin (20 μ M) + sodium arsenite (10 μ M) for 180 minutes and 5. sperm treated with silymarin (20 μ M) for 180 minutes. Ram's sperm DNA integrity was assessed by SCD (Sperm Chromatine Dispersion) test to study DNA fragmentation and Acridine orange staining was used to estimate DNA denaturation (double-strand DNA versus single-strand DNA). To evaluate sperm nuclear integrity, Diff-quick staining was used and sperm nuclear diameter was measured.

Results: DNA fragmentation percent and nuclear diameter of the spermatozoa were significantly increased and decreased, respectively, in sodium arsenite group compared to the control samples. While this toxicant had no effect on sperm DNA denaturation. In silymarin + sodium arsenite group, silymarin was able to significantly ameliorate the adverse effects of sodium arsenite on these sperm parameters compared to sodium arsenite group.

Conclusion: Silymarin as a potent antioxidant could compensate the adverse effects of sodium arsenite on DNA fragmentation and nuclear diameter of ram sperm.

Key words: Arsenic, Silymarin, Spermatozoa