

تأثیر سیلیمارین و لیتیم کلراید بر تمامیت DNA اسپرم اپی دیدیمی 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 پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۴

چکیده

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

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

نتیجه‌گیری: استفاده از سیلیمارین با آثار آنتی اکسیدانتی توانست سبب ممانعت از اثرات منفی لیتیم بر شکست DNA و آپوتوزیس هسته اسپرم شود.

واژگان کلیدی: سیلیمارین، شکست DNA، آپوتوزیس

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 deoxynucleotidyltransferase dUTP nick labelin SCD (Sperm Chromatin Dispersion) (g) و یا 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 آن که سطح پایین ROS (Reactive oxygen species) تأثیر فراوانی در عملکرد اسپرم دارد، زمانی که 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 لیتیم 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). لیتیم 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 ضد اکسیداتیو از طریق کاهش اکسیداسیون گلوکوتاتیون و افزایش سطح آن و نیز اثر بر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به‌عنوان یک پاک‌کننده 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 آن‌جا که لیتیم، 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 لیتیم بر دستگاه تناسلی و به‌ویژه اسپرم و نقش آنتی‌اکسیدانت سیلیمارین، و با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای که در آن تأثیر هم‌زمان سیلیمارین و لیتیم را بر DNA و قطر هسته اسپرم کوچ در محیط برون تنی نشان دهد صورت نگرفته است، این پژوهش با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی سیلیمارین بر

به منظور بررسی ماده ژنتیکی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی‌های ویژه هسته و ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. از رنگ آمیزی آکریدین اورنژ به منظور 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 آکریدین 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 حلقه‌های DNA 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

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. به منظور انجام این تحقیق، سی و چهار عدد از بیضه‌های مربوط به قوچ نژاد فراهانی (با سن ۴-۶ 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 5×10^6 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 به مدت ۱۸۰ دقیقه و گروه چهارم: اسپرم تیمار شده با سیلیمارین+لیتیوم کلراید به مدت ۱۸۰ دقیقه. به منظور غلظت‌یابی لیتیوم کلراید، نمونه‌های اسپرم گروه سه به طور مجزا در معرض غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و یک میلی‌مولار لیتیوم کلراید به مدت ۱۸۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جهت غلظت‌یابی سیلیمارین، از نمونه‌های اسپرم گروه ۴ (سیلیمارین+ لیتیوم کلراید) استفاده گردید. بدین صورت که اسپرم این گروه در لوله‌های مجزا، ابتدا با غلظت‌های ۰/۰۵، 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 به مدت ۱۸۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌های اسپرم گروه‌های اشاره شده در بالا هرکدام به طور جداگانه

فلورسانس بررسی می‌شود. انجام این آزمون به ترتیب 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 قبلاً با آگاروز ۶۵ درصد پوشانده شده بود قرار گرفت و با گذاشتن یک لامل روی آن به مدت چهار دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لامل از لام جدا شد و هر لام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار داده شد سپس به مدت ۲۵ دقیقه در محلول لیزکننده تثبیت شد. شستشو با آب مقطر به مدت پنج دقیقه (دو مرتبه) انجام شد و به مدت دو دقیقه در الکل ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ درصد آگیری شد و در دمای اتاق لام‌ها خشک شدند سپس نمونه‌ها با رنگ Wright و PBS به نسبت ۱:۱ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و مجدداً 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 به صورت 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 به منظور بررسی کمی تغییرات هسته‌ی اسپرم مورد مطالعه در گروه‌های مختلف از این روش رنگ‌آمیزی استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی آکروزوم اسپرم به رنگ صورتی، ناحیه پشت آکروزومی، قطعه میانی و دم بنفش تیره دیده می‌شود (۱). ابتدا نمونه‌های اسپرم Swim up شده شمارش و در لوله‌های اپندورف جداگانه به طوری که هر لوله حاوی 5×10^6 اسپرم بود وارد و به گروه‌های مختلف ذکر شده تقسیم شدند ($n=6$ 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 لیتیم کلراید و سیلیمارین: پودر لیتیم 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

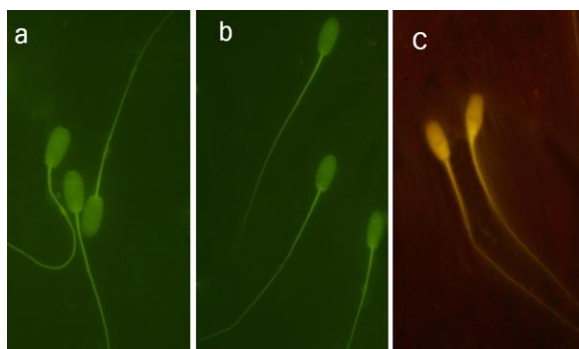
داده‌های حاصل به صورت میانگین \pm انحراف معیار و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از تست Tukey استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

به منظور بررسی تغییر ساختمان DNA (دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای)، اسپرم قوچ با غلظت یک میلی‌مولار لیتیم کلراید به مدت ۱۸۰ دقیقه تیمار و سپس

در مقایسه با گروه کنترل، اثری بر تغییر ساختار دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشت (شکل ۱).

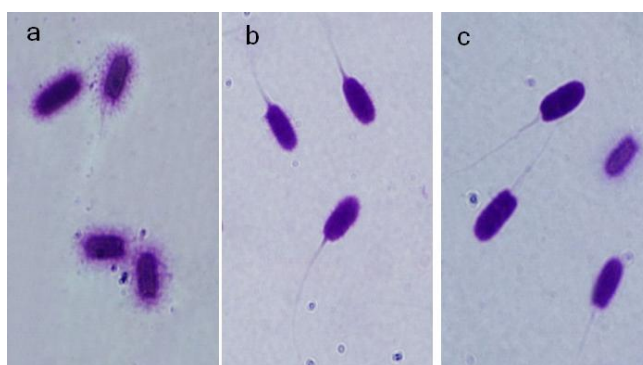
رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ بر روی گسترش‌های اسپرمی انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار اسپرم با لیتیم کلراید



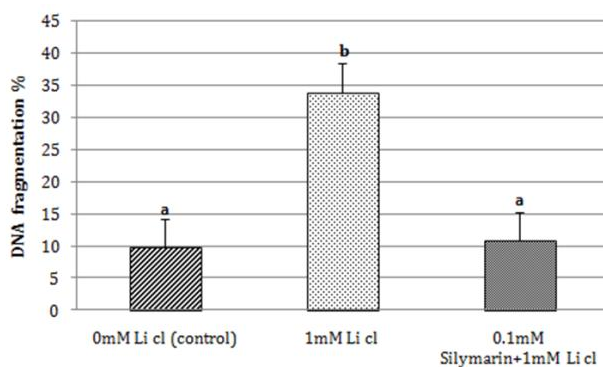
شکل ۱: ساختمان دو رشته‌ای DNA در اسپرم قوچ. (a) کنترل: اسپرم‌های سالم (سبز رنگ)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با لیتیم کلراید (۱ میلی‌مولار به مدت ۱۸۰ دقیقه): اسپرم‌ها با DNA دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ)، (c) کنترل مثبت: اسپرم‌ها با DNA تک رشته‌ای (قرمز رنگ). بزرگنمایی: $\times 1000$.

میلی‌مولار، ۱۸۰ دقیقه) کاهش معنی‌داری ($p < 0.01$) در درصد شکست DNA مشاهده شد، به طوری که درصد شکستگی DNA در گروه فوق در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین سیلیمارین توانست شکستگی DNA اسپرم ناشی از لیتیم کلراید را به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) جبران و نزدیک به سطح کنترل نماید (شکل ۱ و نمودار ۱).

جهت بررسی درجات متفاوتی از شکست DNA از آزمون SCD استفاده شد. نتایج نشان داد که درصد شکست DNA در گروه تیمار شده با لیتیم کلراید (یک میلی‌مولار، ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش یافت. از طرفی در گروه سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار) + لیتیم کلراید (یک میلی‌مولار، ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه لیتیم کلراید (یک



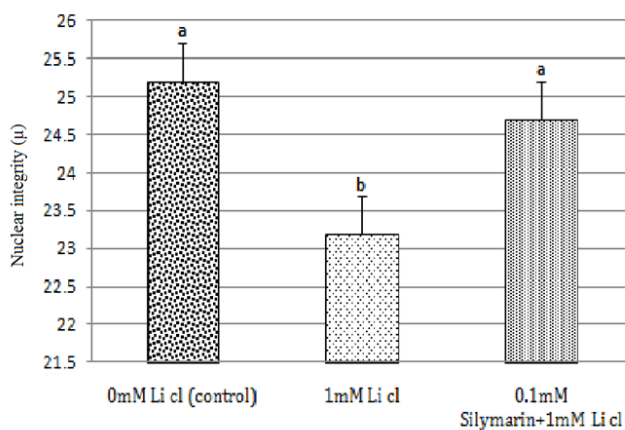
شکل ۲: بررسی شکست DNA در اسپرم‌های قوچ با استفاده از تست SCD. (a) اسپرم‌های گروه کنترل (۱۸۰ دقیقه): تشکیل هاله (عدم شکستگی DNA)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با لیتیم کلراید (۱ میلی‌مولار به مدت ۱۸۰ دقیقه): عدم تشکیل هاله بیانگر شکستگی DNA، (c) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۰/۱ میلی‌مولار) + لیتیم کلراید (۱ میلی‌مولار): تشکیل هاله در اکثریت بیانگر عدم شکستگی DNA. بزرگنمایی: $\times 1000$.



نمودار ۱: بررسی شکست DNA اسپرم قوچ به کمک تست SCD. درصد شکستگی DNA اسپرم در گروه تیمار شده با لیتیم کلراید (غلظت ۱ میلی مولار، ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر) به طور معنی داری ($p < 0.01$) افزایش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین (۰/۱ میلی مولار) و لیتیم کلراید (۱ میلی مولار) توانست اثرات مخرب لیتیم کلراید را در خصوص شکست DNA، نسبت به گروه تیمار شده با لیتیم کلراید (۱ میلی مولار) به طور معنی داری جبران کند. حروف غیر مشابه بیانگر معنی دار بودن میانگین‌ها می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. آنالیز واریانس یک طرفه، $n = 6$ برای هر گروه، مرز معنی داری $p < 0.05$.

تیمار با سیلیمارین (۰/۱ میلی مولار) + لیتیم کلراید (یک میلی مولار) افزایش معنی داری ($p < 0.05$) در قطر هسته اسپرم مشاهده شد. بنابراین سیلیمارین توانست کاهش در قطر هسته اسپرم توسط لیتیم کلراید را جبران نماید (نمودار ۲).

به منظور بررسی جنبه مورفولوژیکی آپوپتوزیس در هسته اسپرم از رنگ آمیزی Diff-Quick و سپس اندازه گیری قطر هسته اسپرم استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که قطر هسته اسپرم در گروه مورد تیمار با لیتیم کلراید (یک میلی مولار، ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ($p < 0.05$) داشته است. در حالی که در گروه



نمودار ۲: اندازه گیری قطر هسته اسپرم‌های قوچ مورد تیمار با لیتیم کلراید و سیلیمارین به کمک رنگ آمیزی Diff-Quick. تیمار اسپرم‌ها به مدت ۱۸۰ دقیقه با لیتیم کلراید (۱ میلی مولار) موجب کاهش معنی داری در قطر هسته اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. از طرفی تیمار با سیلیمارین (۰/۱ میلی مولار) + لیتیم کلراید (۱ میلی مولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه، قطر هسته اسپرم را نسبت به اسپرم‌های گروه لیتیم کلراید (۱ میلی مولار) به طور معنی داری افزایش داد. حروف غیر مشابه بیانگر معنی دار بودن میانگین‌ها می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. آنالیز واریانس یک طرفه، $n = 6$ ، $p < 0.05$.

بحث

نتایج بسیاری از مطالعات قابلیت آسیب DNA توسط لیتیم کلراید را نشان می‌دهد (۱۳ و ۱۴ و ۱۵). لیتیم کلراید باعث آسیب کروموزومی می‌شود ولی با این وجود به‌عنوان یک موتاژن بسیار ضعیف عمل می‌کند. پیشنهاد شده که لیتیم کلراید با ایجاد ممانعت از بازسازی DNA، آسیب به DNA را گسترش می‌دهد (۱۶). برخی مطالعات نشان داده است که لیتیم کلراید 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 لیتیم کلراید بر ساختمان دو رشته‌ای DNA (تغییر ساختار DNA) بی‌تأثیر بود. تاکنون مطالعه‌ای در این خصوص صورت نگرفته است با این حال در پژوهش حاضر علت عدم تأثیر لیتیم کلراید بر ساختمان دو رشته‌ای DNA می‌تواند ناشی از عوامل زیر باشد: DNA اسپرم به‌دلیل فشردگی در مقابل آسیب ناشی از لیتیم کلراید مقاوم باشد و یا ناشی از عدم تأثیر مدت زمان ۱۸۰ دقیقه برای اعمال اثر لیتیم کلراید باشد. همچنین ممکن است به‌دلیل عدم تأثیر غلظت استفاده شده جهت اعمال اثر لیتیم کلراید موثر نشده باشد.

در پژوهش حاضر شکست DNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که لیتیم 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 لیتیم در القا آپوپتوزیس و شکستگی DNA گزارش شده است (۱۹ و ۲۰)، لذا این احتمال وجود دارد که در پژوهش حاضر لیتیم 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 پروتئازهای مثل کاسپازها (۲۳) در این پدیده اشاره نمود. این احتمال وجود دارد که فعال نمودن مستقیم DNaseها توسط لیتیم کلراید منجر به شکستگی DNA اسپرم شده باشد. علاوه بر این، لیتیم 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 آپوپتوزیک 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 لیتیم 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 تأثیر 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

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 لیتیم 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 سلیمارین سبب جبران کاهش ایجاد شده در قطر هسته توسط لیتیم کلراید گردید. با توجه به اثبات خاصیت آنتی‌اکسیداتیو سلیمارین، این احتمال وجود دارد که در پژوهش حاضر سلیمارین 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 سلیمارین 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 زیست‌شناسی دانشگاه اراک و با حمایت مالی این دانشگاه صورت گرفته است. نویسندگان

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 لیتیم کلراید است (۲۹) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. از آن‌جا که نتایج استفاده از سلیمارین به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت در پژوهش حاضر نشان داد که سلیمارین قادر به جبران اثرات مخرب لیتیم کلراید در خصوص شکستگی DNA اسپرم می‌باشد، لذا این احتمال که لیتیم کلراید از طریق القا تنش اکسیداتیو به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم (به‌واسطه تخریب میتوکندری‌ها و آزاد شدن AIF و اندونوکلاز 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 ضد اکسیداتیو و حفاظتی در مقابل اثر منفی لیتیم بر بیضه‌ها دارند (۳۱). یکی از مشخصه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس متراکم شدن هسته و کروماتین می‌باشد (۱۸). از آن‌جا که لیتیم 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 لیتیم کلراید سبب کاهش معنی‌دار قطر هسته اسپرم شده است. مکانیسم اثر لیتیم دقیق مشخص نیست، اما به‌دلیل شباهت یون لیتیم به یون سدیم، جایگزین سدیم شده و در ایجاد پتانسیل عمل در سلول‌های عصبی اختلال ایجاد می‌کند، همچنین بر عملکرد واسطه‌های شیمیایی عصبی مثل نوراپی‌نفرین، سروتونین، دوپامین و استیل‌کولین و گیرنده‌های آن‌ها تاثیر می‌گذارد و با کاهش تولید پیام‌رسان ثانویه اینوزیتول تری فسفات ایجاد پاسخ سلولی را تضعیف می‌کند (۳۳ و ۳۴).

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 Rats. *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.

این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی افرادی که در این پژوهش یاری نموده‌اند، به عمل 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 peroxiredoxin 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. Raof, NT., Pearson, RM. Turner, P. Lithium inhibits human sperm motility in vitro Department of Clinical Pharmacology, St Bartholomew's Hospital Medical College, London EC1A 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

- 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 ZJ. Early 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. Oxidative stress and male infertility. *Journal of Andrology*. 2000; 23:737-52.
 27. Spano M, Bonde JP, Hyollund HI, Kolstad HA. Sperm chromatin 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 bipolar affective disorders; Report of the NIMH collaborative study group comparing lithium carbonate imipramine combination. *Archives of General Psychiatry Journal*. 1947; 41: 1096-104.

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

Choobineh T, M.Sc.¹, Khodaei-Motlagh M, Ph.D.^{2*}, Momeni HR, Ph.D¹, Darbandi N, Ph.D¹

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 for 180 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 expansion (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 significantly compensate these effect compared to the lithium chloride 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