Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(97): 71-80

Effect of Silymarin on Plasma Membrane and Acrosome of Sperm Treated with Aluminum Chloride

Hamid Reza Momeni[1*], Houri Sepehri[2], Mehri Yosefi[2]

1- Department of Biology, Arak University, Arak, Iran
2- Department of Animal Physiology, Tehran University, Tehran, Iran

Received: 10 Jan 2015, Accepted: 25 Feb 2015

Abstract

Background: Aluminum, as an environmental pollutant, has destructive effects by inducing oxidative stress on male reproductive system and sperm. Silymarin, an effective substance extracted from Silybum marianum, is a potent antioxidant which inhibits oxidative stress. Because of toxic effects of aluminum and the antioxidant role of silymarin, this study was performed to investigate if silymarin can prevent the adverse effects of aluminum chloride on plasma membrane integrity and acrosome integrity in ram sperm.

Materials and Methods: In this experimental study, epididymal spermatozoa from Farahani's ram are divided into five groups: sperm at 0 hour, sperm at 180 minutes (control), sperm treated with aluminum chloride (0.5mM) for 180 minutes, sperm treated with silymarin (0.5µM) + aluminum chloride (0.5µM) for 180 minutes and sperm treated with silymarin (0.5µM) for 180 minutes. To evaluate sperm plasma membrane integrity and sperm acrosome integrity, propidium iodide-Hoechst and comassie brilliant blue staining were used, respectively. The results were analyzed using one-way ANOVA and $p<0.05$ was considered as significant level.

Results: The percentage of sperm plasma membrane integrity and acrosome integrity were significantly decreased in aluminum chloride group compared to the control. The simultaneous use of silymarin+aluminum chloride could significantly compensate the adverse effects of aluminum chloride on the sperm plasma membrane integrity and acrosome integrity compared to aluminum chloride.

Conclusion: Aluminum chloride induces toxic effect on ram sperm plasma membrane integrity and acrosome integrity and silymarin is able to compensate the adverse effect this pollutant on these parameters.

Keywords: Aluminum, Acrosome, Plasma membrane, Silymarin, Sperm

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Arak University, Arak, Iran.
Email: H-momeni@arak.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۴ (شماره پیاپی ۹۷)، تیر ۱۳۹۴، ۸۰-۷۱

اثر سیلیمارین بر غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید

حمیدرضا مومنی[1*]، حوری سپهری[2]، مهری یوسفی[3]

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- استاد، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۶

چکیده

زمینه و هدف: آلومینیوم به‌عنوان یک آلاینده زیست محیطی قادر است اثرات مخربی از طریق القا استرس اکسیداتیو بر دستگاه تولید مثل نر و اسپرم اعمال نماید. سیلیمارین ماده موثره عصاره گیاه خار مریم است و می‌تواند به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی استرس اکسیداتیو را مهار کند. با توجه به اثرات سمی آلومینیوم و نقش آنتی اکسیدانتی سیلیمارین، این پژوهش با هدف بررسی قابلیت سیلیمارین جهت مهار اثرات مخرب آلومینیوم بر تمامیت غشای پلاسمایی و تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، اسپرم‌های اپی‌دیدیمی قوچ فراهانی به پنج گروه اسپرم‌های لحظه صفر، اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (کنترل)، اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید (۰/۵ میلی‌مولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه، اسپرم‌های تیمار شده توام با آلومینیوم کلراید (۰/۵ میکرومولار) و سیلیمارین(۰/۵ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه و اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۰/۵ میکرو و مولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه تقسیم شدند. برای بررسی تمامیت غشا و تمامیت آکروزوم اسپرم، به‌ترتیب از رنگ‌آمیزی هم‌زمان هوخست-پروپیدیوم آیوداید و کوماسی برلیانت بلو استفاده شد. داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری برابر با $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: درصد تمامیت غشای پلاسمایی و تمامیت آکروزوم اسپرم در گروه تیمار شده با آلومینیوم کلراید به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین و آلومینیوم کلراید موجب شد که این اثرات به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه تیمار شده با آلومینیوم کلراید جبران شود.

نتیجه‌گیری: آلومینیوم کلراید بر روی تمامیت غشای پلاسمایی و تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ اثر مخرب دارد و سیلیمارین قادر است اثرات سمی این آلاینده بر روی این پارامترها را جبران نماید.

واژگان کلیدی: آلومینیوم، آکروزوم، غشای پلاسمایی، سیلیمارین، اسپرم

* **نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه اراک، گروه زیست شناسی

Email:H-momeni@arak.ac.ir

مقدمه

آلومینیوم که به‌طور طبیعی در پوسته زمین وجود دارد به عنوان یک آلاینده زیست محیطی و عنصری سمی برای انسان محسوب می‌شود(۱). مقدار آلومینیوم موجود در مناطق صنعتی زیاد است و افراد ممکن است روزانه در معرض حدود ۰/۲ میلی‌گرم آلومینیوم قرار گیرند(۲). از طرفی، آلومینیوم در داروها، مواد آرایشی و بهداشتی، مواد غذایی و آب تصفیه شده وجود دارد(۳، ۴). شواهد حاکی است که پس از روند تصفیه آب، مقدار آلومینیوم موجود در آن در حدود ۰/۴ تا ۰/۵ درصد افزایش می‌یابد(۵). بدین ترتیب انسان و دام به طور فزاینده‌ای از طریق آب، هوا، صنعت، مواد دارویی، مواد افزودنی غذا و ... در معرض این عنصر قرار می‌گیرند(۱). شواهدی دال بر اثر سمیت آلومینیوم روی سیستم عصبی(۶)، دستگاه ادراری و استخوان(۲) و اختلال در هورمون‌های دخیل در اسپرماتوژنز(۷) وجود دارد. آلومینیوم هم‌چنین اثرات سوئی در باروری داشته(۸) و نقش آن در بروز اختلالات دستگاه تناسلی مرد به اثبات رسیده است. در این خصوص مشخص شده است که آلومینیوم باعث کاهش تعداد و تحرک اسپرم، قابلیت حیات(۹) و تحرک اسپرم‌ها می‌شود(۱۰). مطالعات نشان داده است که توانایی آلومینیوم در ایجاد سمیت در انسان و حیوان عمدتا به علت توانایی آلومینیوم در تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) و سایر رادیکال‌های آزاد و هم‌چنین تضعیف سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی در اندام‌هایی مثل بیضه، کبد، ریه و مغز است(۹). با توجه به اثرات سمی آلومینیوم و نقش محوری آن در القا استرس اکسیداتیو، استراتژی استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها و به‌خصوص آنتی‌اکسیدانت‌های 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 باشد. این امر احتمالا می‌تواند راه حل پیشنهادی مناسبی برای جلوگیری از روند ناباروری به‌خصوص در جوامع صنعتی باشد.

سیلیمارین، فلاونوئیدی است که به عنوان ماده موثر عصاره گیاه ماریتیغال یا خار مریم (Silybum marianum) شناخته شده است(۱۱) و اثرات دارویی متعددی از جمله خاصیت ضد التهابی و ضد سرطانی دارد(۱۲، ۱۳). علاوه بر این، سیلیمارین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی(۱۱)، تنظیم کننده مقدار گلوتاتیون درون سلولی و تثبیت کننده غشا سلولی مطرح است(۱۴). ساختمان پلی‌فنلی به‌همراه گروه متوکسی بر روی یکی از حلقه‌های فنلی آن خاصیت آنتی اکسیدانتی سیلیمارین را افزایش داده است(۱۵).

اگر چه آنالیز کلینیکی و سنتی منی در آزمایش اسپرمیوگرام (تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) برای سنجش پتانسیل باروری جنس مذکر مهم است، با این وجود، گزارش‌های متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند تمامیت غشا و هم‌چنین تمامیت آکروزوم فاکتورهای اساسی در سلامت اسپرم و تضمین باروری آن هستند(۱۶). از آن‌جا که تمامیت غشای پلاسمایی و صلاحیت عملکردی آن برای متابولیسم اسپرم، ظرفیت یابی، اتصال به تخمک، واکنش آکروزومی و در نهایت نفوذ به تخمک ضروری است، از این رو ارزیابی مشخصات غشای پلاسمایی می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای پیش بینی سلامت اسپرم و توانایی باروری آن ارائه نماید.

با توجه به اثرات مخرب آلومینیوم بر تولید مثل و باروری و هم‌چنین نقش سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، این مطالعه با هدف بررسی قابلیت سیلیمارین جهت مهار اثرات مخرب آلومینیوم کلراید بر تمامیت غشا و تمامیت آکروزوم قوچ فراهانی صورت گرفت.

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 زیست شناسی انتقال داده شدند. به منظور جمع‌آوری اسپرم، چند برش در ناحیه دمی اپی‌دیدیم

ایجاد گردید و سپس اسپرم‌ها به وسیله سرنگ حاوی محیط کشت HTF (مایه لوله رحم انسان) داخل یک فالکون استریل شدند. ابتدا پارامترهای غلظت و قابلیت تحرک اسپرم تعیین شدند تا اطلاعات اولیه از لحاظ کیفیت اسپرم کسب گردد. سپس نمونه‌های اسپرمی که از نظر تعداد و تحرک کیفیت بالایی داشتند، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. شمارش اسپرم و بررسی قابلیت تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO)(۱۷) انجام گرفت. نمونه‌های اسپرم بعد از شمارش در لوله‌های اپندورف جداگانه تفکیک شدند، به‌طوری که هر لوله حاوی ۵×۱۰^{۶} اسپرم در محیط کشت بود. 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 (۰/۵میلی‌مولار به مدت ۱۸۰ دقیقه)، ۴- اسپرم‌های تیمار شده توام با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار و آلومینیوم‌کلراید ۰/۵میلی‌مولار به مدت ۱۸۰ دقیقه (سیلیمارین ۱۵ دقیقه قبل از تیمار با آلومینیوم‌کلراید به‌کار برده شد) و ۵- اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرو مولار به مدت ۱۸۰ دقیقه. لوله‌های حاوی نمونه‌های اسپرم طی مدت زمان تیمار در محیط کشت و در انکوباتور حاوی CO_2 با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی: برای ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم از رنگ‌آمیزی فلورسنت شامل هوخست و پروپیدیوم آیوداید استفاده شد(۱۸). به‌طور خلاصه، به هر یک از لوله‌های حاوی محلول اسپرم در محیط کشت گروه‌های پنج گانه، پنج میکرولیتر محلول هوخست (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیگما، آمریکا) اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس ۵ میکرولیتر از محلول پروپیدیوم آیوداید (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیگما، آمریکا) به محلول اسپرم اضافه و به مدت پنج دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از آن ۲۰ میکرولیتر از محلول اسپرم بر روی لام منتقل و با لامل پوشانده شد. سپس از طریق میکروسکوپ فلورسانس (الیمپوس، ژاپن) مجهز به دوربین با فیلتر مناسب و بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰، حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با غشا سالم و ناسالم محاسبه شد. در این رنگ‌آمیزی، هسته اسپرم‌های سالم به رنگ آبی (به علت عدم نفوذ پروپیدیوم آیوداید از غشای پلاسمایی) و هسته اسپرم‌های با غشای پلاسمایی آسیب دیده به رنگ قرمز-آبی مشاهده شدند.

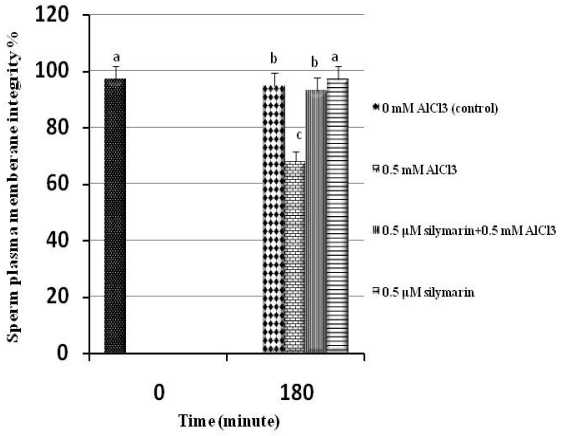
ارزیابی تمامیت آکروزوم: به منظور ارزیابی تمامیت آکروزوم، رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلو مورد استفاده قرار گرفت(۱۹). بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون اسپرم در محیط کشت گروه‌های پنج گانه روی لام قرار گرفت و از آن گسترش تهیه شد. سپس گسترش‌ها با محلول پارافرمالدئید ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در فسفات بافر سالین در (PBS) تثبیت شدند. لام‌ها پس از شستشو با محلول ۰/۲۵ درصد کوماسی برلیانت بلو (مرک، آلمان) رنگ‌آمیزی و سپس با آب شستشو شدند. سپس، بعد از خشک شدن، تعداد ۱۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰ شمارش و به صورت درصد بیان شد. در این رنگ آمیزی، آکروزوم سالم به رنگ آبی است، در حالی که آکروزوم صدمه دیده یا واکنش داده بی‌رنگ می‌ماند.

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های حاصل به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند و از طریق آزمون آنوای یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها از تست توکی استفاده گردید و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

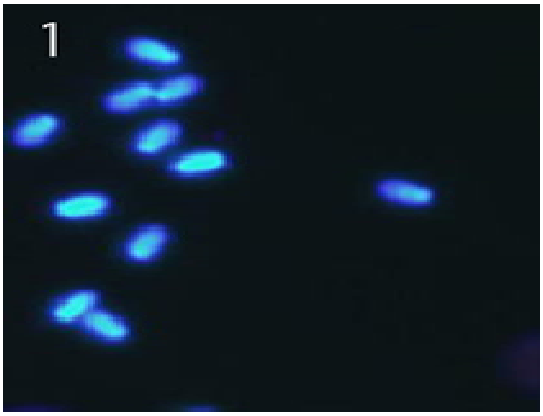
یافته‌ها

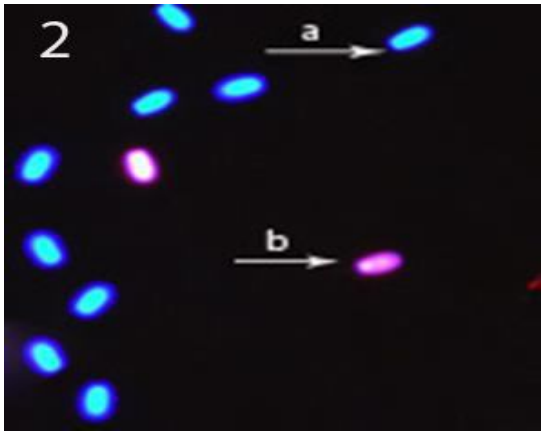
ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی: درصد تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم در گروه‌های تیمار شده با آلومینیوم‌کلراید نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر، لحظه

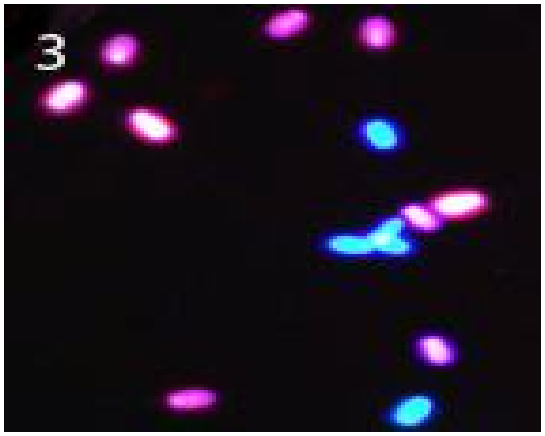
۱۸۰ دقیقه) به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین و آلومینیوم‌کلراید این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با آلومینیوم‌کلراید به‌طور معنی‌داری(p<۰/۰۰۱) تا حد گروه کنترل جبران کرد. هم‌چنین کاربرد سیلیمارین به‌تنهایی (۰/۵ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) موجب شد تا درصد تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری(p<۰/۰۵) افزایش یابد. (نمودار ۱، شکل ۱). این نمودار هم‌چنین نشان می‌دهد که انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه (کنترل) موجب کاهش معنی‌دار(p<۰/۰۵) درصد تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به لحظه زمانی صفر شده است.

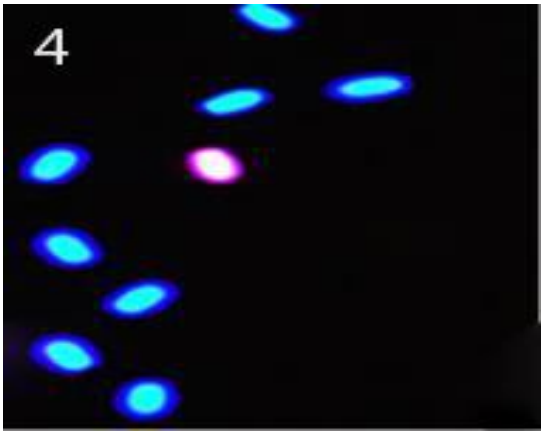


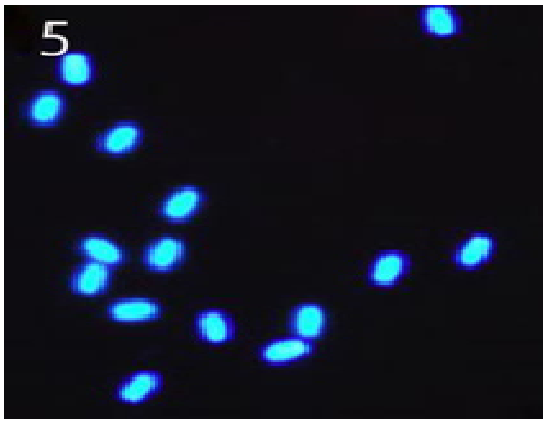
نمودار ۱. ارزیابی درصد تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین و آلومینیوم کلراید از طریق رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید. مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی، n=۶ برای هر گروه، (p<۰/۰۵))





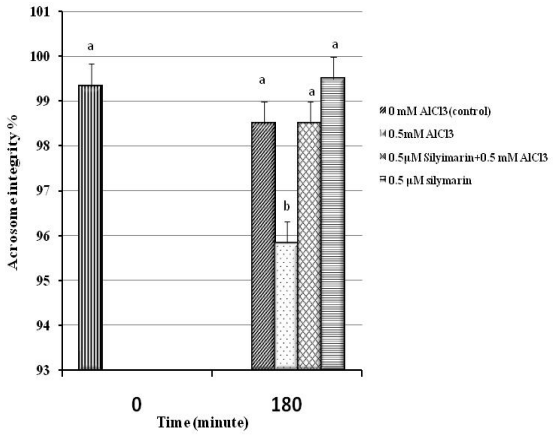




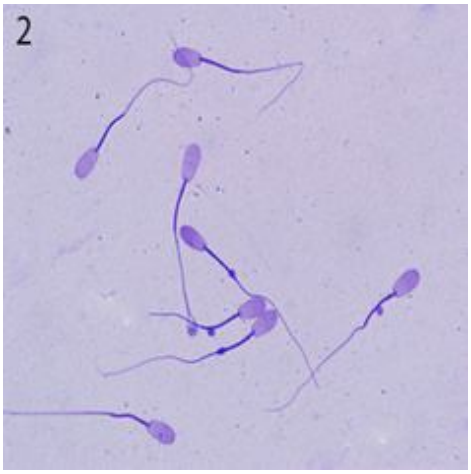


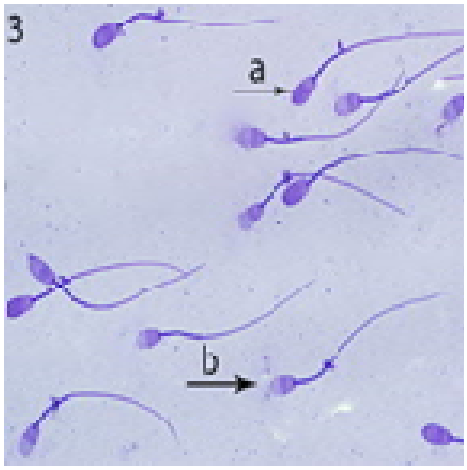
شکل ۱. ارزیابی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین و آلومینیوم کلراید از طریق رنگ‌آمیزی هوخست و پروپیدیوم آیوداید. ۱) اسپرم‌های لحظه صفر، ۲) اسپرم‌های گروه کنترل (غلظت صفر، ۰۸۱ دقیقه)، ۳) اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم‌کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۴) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار + آلومینیوم‌کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۵) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. بزرگنمایی ×۱۰۰۰. a: هسته اسپرم‌های زنده با غشای پلاسمایی سالم، رنگ هوخست را جذب کرده و آبی شده b: اسپرم مرده با غشای پلاسمایی آسیب دیده، علاوه بر هوخست، رنگ پروپیدیوم آیوداید را نیز جذب کرده است.

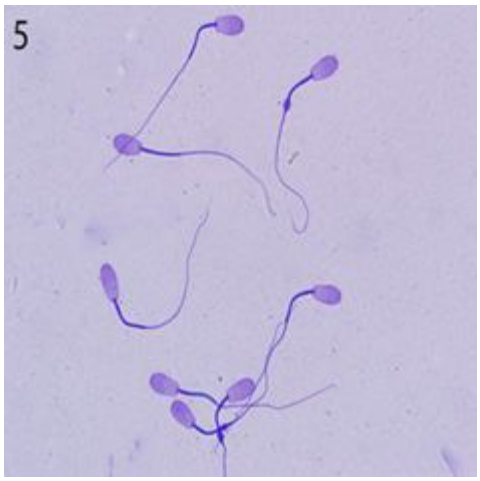
ارزیابی تمامیت آکروزوم: درصد تمامیت آکروزوم در گروه تیمار شده با آلومینیوم‌کلراید نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. کاربرد مشترک سیلیمارین و آلومینیوم‌کلراید توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با آلومینیوم‌کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) تا حد گروه کنترل جبران کند (نمودار ۲، شکل ۲). این نمودار هم‌چنین نشان می‌دهد که انکوباسیون اسپرم‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه (غلظت صفر) تغییر قابل ملاحظه‌ای در درصد تمامیت آکروزوم نسبت به لحظه زمانی صفر ایجاد نکرده است.



نمودار۲. ارزیابی درصد تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین و آلومینیوم کلراید از طریق رنگ‌آمیزی کوماسی برلیانت بلو. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر می‌باشند (آنالیز واریانس یک‌طرفه، تست توکی n=۶ برای هر گروه، ($p<۰/۰۵$))







شکل ۲. ارزیابی تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ در گروه‌های تیمار شده با سیلیمارین و آلومینیوم کلراید از طریق رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلو. ۱) اسپرم‌های لحظه صفر، ۲) اسپرم‌های گروه کنترل (غلظت صفر ،۱۸۰ دقیقه)، ۳) اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۴) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار و آلومینیوم کلراید ۰/۵ میلی‌مولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه، ۵) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین ۰/۵ میکرومولار به‌مدت ۱۸۰ دقیقه. a: آکروزوم سالم b: آکروزوم صدمه دیده، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰

بحث

نتایج این پژوهش بیان‌گر اثرات سمی آلومینیوم کلراید بر روی تمامیت غشا پلاسمایی و تمامیت آکروزوم اسپرم‌های اپی‌دیدیمی قوچ فراهانی بود و سیلیمارین توانست اثرات زیان آور این آلاینده را بر روی این پارامترهای اسپرم جبران کند.

غشای پلاسمایی اسپرم ساختمانی است که با فرایندهای مهم از جمله قابلیت تحرک، واکنش آکروزومی و الحاق اسپرم با تخمک که برای لقاح موفق حیاتی هستند مرتبط می‌باشد. آلاینده‌های زیست محیطی با تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مهمی هستند که اخیراً نقش آن‌ها در خصوص تضعیف عملکرد اسپرم و از این رو ناباروری آن مورد توجه قرار گرفته است.

نتایج این پژوهش نشان داد که درصد تمامیت غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت. دقیقاً مشخص نیست که آلومینیوم با چه مکانیسم(هایی) منجر به اختلال در این پارامترهای عملکردی اسپرم شده است. با توجه به این که واکنش آکروزومی یک فرایند غشایی است که با الحاق غشا خارجی آکروزوم و غشا پلاسمایی اسپرم صورت می‌گیرد، بنابر این در پژوهش حاضر منطقی است که بتوان واکنش آکروزومی غیر طبیعی و هم‌چنین اختلال در تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم القا شده از طریق آلومینیوم کلراید را در مجموع به ضعف ساختمانی و عملکرد غشا اسپرم نسبت داد.

اسپرم به دلیل وجود اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان در غشای پلاسمایی خود در برابر شوک‌های اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است(۲۰). پراکسیداسیون این لیپیدها موجب تخریب ساختمان و کاهش فعالیت آنزیم و کانال‌های یونی غشا می‌شود(۲۱). اگر چه اسپرم حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی سیتوپلاسمی مثل کاتالاز، گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز متعلق به سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد، با این حال، به دلیل اندک بودن سیتوپلاسم اسپرم، مقدار این آنزیم‌ها نسبتا کم بوده و از این

رو سامانه حفاظتی اسپرم را محدود می‌سازد(۲۲). غلظت فیزیولوژیک ROS برای بلوغ اسپرم، ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی آن ضروری است(۲۳). اگرچه افزایش اندک ROS به وسیله سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانتی اسپرم بی‌اثر می‌شود و از آسیب اکسیداتیو به اسپرم محافظت می‌نماید، با این وجود تولید مقدار زیاد ROS این سامانه را مختل می‌کند و موجب استرس اکسیداتیو می‌شود(۲۴).

از آن‌جا که آلومینیوم قادر است با القا استرس اکسیداتیو اثرات مخرب خود را در افزایش رادیکال‌های آزاد و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی اعمال نماید(۲۵)، بدین ترتیب مفروض می‌گردد که اختلالات ایجاد شده در تمامیت غشای پلاسمایی و واکنش آکروزومی اسپرم‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید احتمالاً به اثرات مخرب این آلاینده در القا استرس اکسیداتیو مربوط است که به نوبه خود با افزایش رادیکال‌های آزاد از جمله ROS موجب پراکسیداسیون لیپید و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانت‌های اسپرم شده است. با توجه به این که در این پژوهش سیلیمارین با خواص آنتی اکسیدانتی قوی(۲۶) و هم‌چنین تثبیت کننده غشا(۲۷) توانست اثرات مخرب آلومینیوم کلراید را بر تمامیت غشا و واکنش آکروزومی اسپرم خنثی نماید، احتمال عملکرد آلومینیوم کلراید با مکانیسم القا استرس اکسیداتیو قوت می‌گیرد. سنجش شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و هم‌چنین اندازه‌گیری آنزیم‌های سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانتی اسپرم در گروه‌های تیمار شده با آلومینیوم کلراید و سیلیمارین می‌تواند به منظور تشخیص این احتمالات در پژوهش‌های آتی مد نظر قرار گیرد.

واکنش آکروزومی، یک فرایند اگزوسیتوز وابسته به کلسیم می‌باشد(۲۸). مطالعات مختلف بیان‌گر آن است که آلومینیوم در افزایش کلسیم درون سلولی نقش دارد(۲۹). بنابراین این احتمال وجود دارد که القا واکنش آکروزومی زودرس و غیر طبیعی از طریق آلومینیوم کلراید به واسطه‌ای تاثیر این آلاینده بر افزایش غیر طبیعی یون کلسیم در اسپرم صورت گرفته باشد. اندازه‌گیری غلظت درون سلولی این یون در اسپرم‌های در معرض آلومینیوم روشن گر این احتمال است.

نتایج این پژوهش که با نتایج قبلی هم‌راستاست(۳۰) نشان داد که انکوباسیون اسپرم بعد از سه ساعت موجب کاهش معنی‌دار تمامیت غشای پلاسمایی نسبت به گروه کنترل می‌شود. این اثر ممکن است ناشی از افزایش ROS باشد(۳۰). افزایش معنی‌دار تمامیت غشای پلاسمایی در گروه سیلیمارین به‌تنهایی نسبت به گروه کنترل خود می‌تواند گواهی بر این ادعا باشد که سیلیمارین با خاصیت آنتی اکسیدانتی خود ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی اسپرم‌ها را افزایش داده و احتمالا از این طریق موجب افزایش تثبیت غشا شده است.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آلومینیوم کلراید تمامیت غشای پلاسمایی و تمامیت آکروزوم اسپرم قوچ را کاهش می‌دهد و سیلیمارین می‌تواند اثرات مخرب آلومینیوم کلراید بر روی پارامترهای مذکور را جبران نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از زحمات سرکار خانم نجمه اسکندری کارشناس ارشد آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه اراک کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

منابع

1. Soni MG, White SM, Flamm WG, Burdock GA. Safety evaluation of dietary aluminum. Regulatory toxicology and pharmacology. 2001; 33(1): 66-79.
2. Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL. The clinical impact of aluminium overload in renal failure. Nephrology Dialysis Transplantation. 2002; 17(suppl 2):9-12.
3. Lione A. The prophylactic reduction of aluminium intake. Food and Chemical Toxicology. 1983; 21(1):103-9.
4. Shore D, Wyatt RJ. Aluminum and Alzheimer's disease. The Journal of nervous and mental disease. 1983; 171(9):553-8.

5. Miller RG, Kopfler FC, Kelty KC, Stober JA, Ulmer NS. The occurrence of aluminum in drinking water. Journal (American Water Works Association). 1984:84-91.
6. Shaw C, Tomljenovic L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. Immunologic research. 2013; 56(2-3): 304-16.
7. Shahraki M, Mony EP, Asl SZ, Sarkaki A, Shahraki A. Effects of Aluminium Chloride Injection in Lateral Ventricle on Serum Gonadothropines, Testosterone and Spermatogenesis in Rats. Journal of Medical Sciences. 2008; 8(4):410-4.
8. Bataineh H, Al-Hamood M, Elbetieha A. Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts. Human & experimental toxicology. 1998; 17(10):570-6.
9. 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):97-107.
10. Verma A, Kanwar K. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. Asian J Androl. 1999; 1(3):151-4.
11. Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R. An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. Forschende Komplementärmedizin/ Research in Complementary Medicine. 2007; 14(2):70-80.
12. Kaur M, Agarwal R. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to bedside? Toxicology and applied pharmacology. 2007; 224(3):350-9.
13. Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. Cancer letters. 2008; 269(2):352-62.
14. Basiglio CL, Pozzi EJS, Mottino AD, Roma MG. Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. Chemico-biological interactions. 2009; 179(2):297-303.
15. 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.
16. Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. Theriogenology. 2003; 60(8):1539-51.
17. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction: Cambridge university press; 1999.
18. Sutradhar B, Park J, Hong G, Choi S, Kim G. Effects of trypsinization on viability of equine chondrocytes in cell culture. Pak Vet J. 2010; 30:232-8.
19. Morakinyo A, Iranloye B, Adegoke O. Basic research Calcium antagonists modulate oxidative stress and acrosomal reaction in rat spermatozoa. 2011; 7(4):613-8.
20. Laudat A, Lecourbe K, Guéchot J, Palluel A-M. Values of sperm thiobarbituric acid-reactive substance in fertile men. Clinica chimica acta. 2002; 325(1):113-5.
21. Griveau J, Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. International journal of andrology. 1997; 20(2):61-9.
22. Zini A, Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase-and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. International journal of andrology. 1993; 16(3): 183-8.
23. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. 2010; 48(5): 425-35.
24. De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of reproduction. 1997; 2(1):48-54.
25. Gutiérrez-Pérez O, de Lourdes Juárez-Mosqueda M, Carvajal SU, Ortega MET. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. Cryobiology. 2009; 58(3): 287-92.
26. 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 sciences. 2007; 81(17): 1397-402.
27. Feher J, Lengyel G. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. Current pharmaceutical biotechnology. 2012; 13(1):210-7.
28. Michaut M, De Blas G, Tomes CN, Yunes R, Fukuda M, Mayorga LS. Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa. Developmental biology. 2001; 235(2): 521-9.
29. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1988; 1(8): 623-34.
30. Feitosa WB, Rocha AMd, Mendes CM, Milazzotto MP, Delboni C, Visintin J, et al. Kinetics of changes in plasma membrane related to apoptosis and necrosis in bovine sperm cells at different incubation times. Braz J Vet Res Anim Sci. 2008; 45: 398-404.