نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۷، زمستان ۱۳۹۶
ص‌ص: ۲۱۵~۲۲۶

بررسی اثر گیاه دارویی خار مریم بر اندازه قطر هسته و شکست DNA اسپرم تیمار شده با کلرید کادمیوم در قوچ نژاد فراهانی

- **عاطفه خاوری**
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک.
- **مهدی خدایی مطلق** (نویسنده مسئول)
دانشیارگروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک.
- **حمیدرضا مومنی**
دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک.

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۵۳۴۷۶۹
Email: mmotlagh2002@gmail.com

چکیده

فلزات سنگین مانند کادمیوم دارای قدرت اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشند. انباشت کادمیوم به عنوان یک آلاینده زیست محیطی در اندام-های تولیدمثلی می‌تواند اثرات مخربی را از طریق القاء تنش اکسیداتیو بر روند اسپرماتوژنز و فراسنجه‌های اسپرم بگذارد. سیلیمارین ماده مؤثره موجود در دانه گیاه خار مریم یا ماریتیغال می‌باشد و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، تنش اکسیداتیو را مهار می‌کند. با توجه به اثرات مخرب کادمیوم بر دستگاه تناسلی و به خصوص اسپرم و خاصیت آنتی اکسیدانی سیلیمارین، این مطالعه با این هدف انجام شد تا مشخص نماید که آیا سیلیمارین قادر است از اثرات کادمیوم بر قطر هسته و شکست DNA اسپرم قوچ جلوگیری نماید. اسپرم مورد استفاده در مطالعه حاضر از اپیدیدیم بیضه‌های قوچ‌های فراهانی کشتار شده جمع‌آوری و به چهار گروه تقسیم شد. در هر نمونه، ۵×۱۰^{۶} اسپرم وجود داشت. تیمارهای آزمایشی شامل اسپرم‌های لحظه صفر، اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (شاهد)، اسپرم‌های تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه و اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۵ میکرومولار) همراه با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه بودند. برای بررسی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوز در هسته اسپرم از رنگ‌آمیزی Diff-Quick استفاده گردید. همچنین برای برآورد شکست DNA از رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ و تست SCD استفاده شد. آنالیز داده‌ها از طریق روش تجزیه واریانس یک طرفه صورت گرفت. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح خطای ۰/۰۵ انجام شد. در این پژوهش، قطر هسته اسپرم در گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافت. استفاده از سیلیمارین همراه با کلرید کادمیوم توانست کاهش قطر هسته اسپرم را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم به طور معنی‌داری جبران کند. همچنین نتایج نشان دادند که درصد شکست DNA در گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم در مقایسه با گروه شاهد (P<۰/۰۰۱) و گروه تیمار شده با سیلیمارین همراه با کلرید کادمیوم (P<۰/۰۱) به طور معنی‌داری افزایش یافت. سیلیمارین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی قادر است اثرات مخرب کلرید کادمیوم بر قطر هسته و تمامیت DNA اسپرم قوچ را مهار نماید.

واژه‌های کلیدی: کلرید کادمیوم، سیلیمارین، اسپرم، آپوپتوزیس، شکست DNA، قوچ فراهانی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 117 pp: 215-226

Investigation the effect of medicinal plant Silybum marianum on nucleus diameter and DNA fragmentation of sperm treated with cadmium chloride in Farahani's ram

By: A Khavari[1], M Khodaei-Motlagh[2*], HR Momeni[3]
1-M.Sc, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
2-Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resource, Arak University, Arak, Iran
3-Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
Corresponding author: E mail: mmotlagh2002@gmail.com

Received: May 2017 **Accepted: September 2017**

Heavy metals such as cadmium have a high oxidant property. Cadmium accumulation as an environmental pollutant in reproductive organs can exert detrimental effects via oxidative stress induction on spermatogenesis and sperm parameters. Silymarin is the effective substance in *Silybum marianum* seed and inhibits oxidative stress as a potent antioxidant. Due to the detrimental effects of cadmium on reproductive system especially on sperm and antioxidant property of silymarin, this study was conducted to investigate if silymarin can prevent cadmium effects on ram sperm nucleus diameter and DNA fragmentation. The sperm used in the current study was collected from the testis epidydim of slaughtered Farahani's ram and divided to four groups. There are 10^6 sperms in each sample. The experimental treatments included sperm at 0 hour, sperm at 180 minutes (control), sperm treated with cadmium chloride (10µM) for 180 minutes and sperm treated with silymarin (5 µM) and cadmium chloride (10 µM) for 180 minutes. Diff-Quick staining was used to investigate the apoptosis morphological features in sperm nucleus. Also, acridine orange staining and sperm chromatin dispersion (SCD) test were used for estimation of sperm DNA fragmentation. Data were analyzed using one way ANOVA. Comparison of treatment means was done by Tukey's test at 0.05 confidence level. In this research, the sperm nucleus diameter was significantly ($P< 0.05$) decreased in cadmium chloride-treated group when compared with control. The utilization of silymarin with cadmium chloride could compensate significantly the reduction in sperm nucleus diameter in cadmium chloride-treated group. The results also showed that the DNA fragmentation percentage was significantly increased in cadmium chloride-treated group in comparison to control ($P<0.001$) and silymarin with cadmium chloride-treated group ($P< 0.01$). Silymarin as a potent antioxidant can inhibit the detrimental effect of cadmium chloride on ram sperm nucleus diameter and DNA integrity.

Key words: Cadmium chloride, silymarin, sperm, apoptosis, DNA fragmentation, Farahani's ram

مقدمه

گیاه خار مریم از تیره کاسنی با نام علمی *Silybum marianum* و با نام‌های رایج ماریتیغال، خار علیص و عکوب در زبان فارسی و عربی شناخته می‌شود (زرگری، ۱۳۷۵). خار مریم اصالتاً بومی منطقه مدیترانه و گیاهی یک ساله یا دوساله از خانواده کاسنی می‌باشد و در سرتاسر نقاط دنیا از اروپا تا آسیا و از آفریقا تا آمریکای شمالی گسترده شده است. عصاره دانهٔ خشک این گیاه دارای ۱ الی ۴ درصد سیلیمارین است (Schulz و همکاران، ۱۹۹۷). سیلیمارین در واقع از گروهی از عناصر به نام فلاونولیگنان تشکیل شده است. عناصر فلاونولیگنان موجود در سیلیمارین عبارت از سیلی بارین، ایزوسیلابین، دی هیدروسیلیبین، سیلی‌دیانین و سیلی‌کرستین می‌باشند (Omidbaigi and Nobakht, 2001).

مطالعات بسیاری پیرامون اثرات سیلیمارین در محیط کشت بر انواع سلول‌ها صورت گرفته است که به اثرات آنتی‌اکسیدانی و

ضد سرطانی این عصاره گیاهی دلالت دارد (Soria و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شد، آنتی‌اکسیدان-هایی مانند سیلیمارین و کوارستین با ثبات بخشیدن به گانگلیوزیدهای غشایی، باعث تداوم غشاهای زیستی و افزایش توان حیاتی سلول‌ها شدند. از طرفی عوامل سرطان‌زا مانند آرسنیک، باعث ایجاد بدخیمی در سلول‌های پوست و القای تنش اکسیداتیو می‌شوند که سیلیمارین تا حدودی با هر دو پدیده مقابله می‌کند (Kittur و همکاران، ۲۰۰۲). سیلیمارین در سلول‌های کشت شده هیپوکامپ موش صحرایی باعث کاهش آپوپتوز می-شود. همچنین سیلیمارین در محیط کشت، باعث تمایز این سلول‌ها می‌گردد. از طرفی مشاهده شده است که سیلیمارین با مهار گیرنده‌های تیروزین‌کیناز که بوسیله فاکتور رشد فعال می-شوند، از رشد و تمایز بی‌رویه سلولی و به عبارت دیگر از سرطانی شدن آنها پیشگیری می‌نماید (Xiong و همکاران، ۲۰۰۳). سیلیمارین به عنوان آنتی‌اکسیدان بسیار قوی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شود (Dehmlow and Murawski, 1996). داده‌های حیوانی حاکی از آن است که در موش‌های صحرایی، افزایش مزمن بار آهن موجب تنش اکسیداتیو و آسیب کبدی شده که سیلیمارین این مسمومیت را مهار می‌کند (Alarcon de la Lastra و همکاران، ۱۹۹۵). علاوه بر این، سیلیمارین به عنوان تنظیم‌کننده مقدار گلوتاتیون درون سلولی و تثبیت‌کننده غشای سلولی مطرح است (Basiglio و همکاران، ۲۰۰۹). ساختمان پلی فنلی به همراه گروه متوکسی بر روی یکی از حلقه‌های فنلی آن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین را افزایش داده است (Kidd، ۲۰۰۹).

کادمیوم حتی در غلظت‌های کم به شدت برای اسپرم سمی بوده و باعث کاهش سریع حرکات اسپرم و کاهش مصرف اکسیژن توسط آن می‌شود (Alabi و همکاران، ۱۹۸۵). کلرید کادمیوم و کلرید جیوه، قابلیت نفوذ اسپرم به موکوس دیواره تخمک را کاهش می‌دهند (Eggert- Kruse و همکاران، ۱۹۹۲).

افزایش بدشکلی سر اسپرم در اسپرم موش‌ها در اثر تماس با کلرید کادمیوم نیز گزارش شده است (Mukherjee و همکاران، ۱۹۸۸).

کادمیوم یکی از عناصر سمی است که در محیط اطراف ما وجود دارد و با توجه به نیمه عمر طولانی آن، اثرات زیان‌باری بر بدن انسان می‌گذارد و می‌تواند از طریق مواد مصرفی مانند غذا، آب، هوا و دخانیات وارد بدن انسان شود (Mantau and Baudo ، ۱۹۹۲).

کادمیوم بر طبق نظر انجمن بین المللی ثبت سرطان (IACR) در گروه مواد سرطان‌زای نوع یک طبقه‌بندی شده و باعث پیشرفت انواع سرطان‌ها مانند سرطان ریه، پروستات، کلیه و کبد می‌شود. این ماده، همچنین باعث ناباروری، اختلال در عملکرد کلیه‌ها و آسیب شدید به مغز می‌شود (Nemmich و همکاران، ۲۰۰۷).

آپوپتوز، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که می‌تواند توسط انواعی از محرک‌های فیزیولوژیک و یا پاتولوژیک شروع شود. این فرآیند فعال، با چروکیدگی سلول، هسته و متراکم شدن سیتوپلاسم و آزاد شدن سیتوکروم C، فعال شدن کاسپازها و تشکیل اجسام آپوپتوتیک مرتبط است. کادمیوم می‌تواند موجب ایجاد آپوپتوز در بسیاری از بافت‌ها و سلول‌ها، هم در موجود زنده و هم در شرایط آزمایشگاهی شود (Mendez-Armenta and Rlos, 2007).

از آنجایی که با گسترش روند صنعتی شدن جوامع، میزان استفاده از کادمیوم و ورود آن به محیط زندگی انسان و دام افزایش یافته است و با توجه به اثرات مخرب این عنصر بر گوارش، پوست، دستگاه تنفس، دستگاه تناسلی، اسپرم و نقش آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین و با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای که در آن تأثیر همزمان سیلیمارین و کادمیوم بر اسپرم‌های قوچ فراهانی در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته باشد، صورت نگرفته لذا مطالعه حاضر با این هدف انجام شد تا مشخص شود که آیا سیلیمارین قادر است اثرات مخرب کادمیوم بر قطر هسته و شکست DNA را در اسپرم قوچ نژاد فراهانی مهار نماید.

مواد و روش‌ها

آماده سازی، گروه بندی و تیمار اسپرم‌ها

این تحقیق با همکاری گروه علوم دامی و گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک در آزمایشگاه تخصصی زیست‌شناسی انجام شد. بیضه‌های قوچ‌های تازه کشتار شده نژاد فراهانی داخل یخ از کشتارگاه موت‌آباد واقع در پنج کیلومتری شهر اراک تهیه و بلافاصله بعد از کشتار قوچ‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از ضدعفونی اولیه بیضه‌ها با نرمال سالین، پوست اطراف بیضه‌ها با قیچی ضدعفونی شده، برش داده شد. سپس با استفاده از اسکالپل استریل، چند برش در ناحیه دمی اپیدیدیم ایجاد و با استفاده از سرنگ، داخل لوله‌های فالکون استریل حاوی محیط کشت Ham's F10 (GIBCO) ریخته شد. به منظور Swim up اسپرم‌ها، لوله‌ها به مدت یک ساعت در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Bukowska و همکاران، ۲۰۱۱).

شمارش اسپرم‌ها براساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) انجام شد. به این صورت که سوسپانسیون محیط کشت حاوی اسپرم، به نسبت ۱ به ۹ با تثبیت‌کننده فرمالین ۴٪ رقیق شد. شمارش اسپرم با استفاده از هموسیتومتر نئوبار انجام شد و تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید. نمونه‌های اسپرم Swim up شده، شمارش و در لوله‌های اپندورف جداگانه تفکیک شدند به طوری که هر لوله حاوی ۵×۱۰^{۶} اسپرم بود. سپس لوله‌ها به چهار گروه شش تایی تقسیم شدند که شامل اسپرم‌های لحظه صفر، اسپرم‌های لحظه ۱۸۰ دقیقه (شاهد)، اسپرم‌های تیمار شده با کلرید کادمیوم به مدت ۱۸۰ دقیقه و اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین همراه با کلرید کادمیوم (سیلیمارین ۱۵ دقیقه قبل از کلرید کادمیوم مورد استفاده قرار گرفت) به مدت ۱۸۰ دقیقه بودند.

به منظور تعیین غلظت کلرید کادمیوم، نمونه‌های اسپرم گروه ۳ به طور جداگانه به مدت ۱۸۰ دقیقه در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰میکرومولار کلرید کادمیوم قرار گرفتند. برای تعیین غلظت سیلیمارین، نمونه‌های اسپرم گروه ۴ (سیلیمارین همراه با کلرید کادمیوم) در لوله‌های مجزا با غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار سیلیمارین تیمار و پس از ۱۵ دقیقه، محلول ۱۰ میکرومولار کلرید کادمیوم به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌های حاوی نمونه به مدت ۱۸۰ دقیقه در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اکریدین اورنژ، یک رنگ فلورسنت جهت تمایز DNA دو رشته‌ای سالم از DNA تک رشته‌ای دناتوره شده می‌باشد. اکریدین اورنژ در واکنش با مولکول DNA دو رشته‌ای، رنگ سبز درخشان و با مولکول DNA تک رشته‌ای، رنگ قرمز و با ملکول DNA حد واسط، رنگ زرد ایجاد می‌کند. در این رنگ‌آمیزی، با استفاده از محیط اسیدی میزان مقاومت DNA نسبت به دناتوره شدن سنجیده و در پایان رنگ‌آمیزی، درصد اسپرم‌های دارای DNA تک‌رشته‌ای (قرمز رنگ)، دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ) و حالت حد واسط (زرد رنگ) تعیین می‌شود. مراحل رنگ‌آمیزی به ترتیب زیر انجام گرفت (Tejada و همکاران، ۱۹۸۴). برای تهیه نمونه شاهد مثبت، ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم و محلول اکریدین اورنژ در یک لوله اپندورف ریخته و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه برای تهیه گسترش استفاده و با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر و نور آبی بررسی و عکس‌برداری شد.

ارزیابی شکست DNA اسپرم

برای ارزیابی درجات متفاوتی از شکست DNA اسپرم، از آزمایش SCD استفاده شد به این ترتیب که ابتدا لام‌ها با آگارز نرمال ۶۵٪ کوت و به سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم (۵×۱۰^{۶}) از هر گروه، مقدار ۷۰ میکرولیتر آگارز ۱٪ اضافه و با قراردادن یک لامل بر روی آن به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لامل‌ها به آرامی از روی لام‌ها جدا و هر لام به صورت افقی در دمای اتاق و در شرایط تاریکی به مدت ۷ دقیقه در محلول اسیدکلریدریک ۰/۰۸٪ قرار داده شد. سپس لام‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در محلول لیزکننده قرار گرفتند و بعد از آن دو

مرتبه به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس لام حاوی نمونه به مدت ۲ دقیقه در الکل ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ آبگیری شد. در پایان، لام‌ها در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه با رنگ Wright و PBS به نسبت ۱ به ۱، رنگ‌آمیزی شدند. گسترش‌ها با آب شستشو و پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰

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

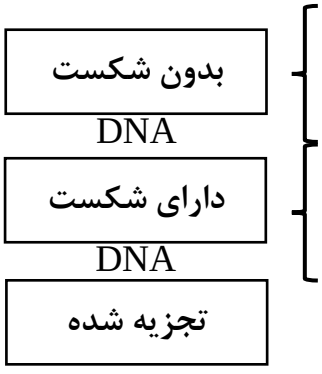
سلول اسپرم با DNA شکسته شده

ارزیابی جنبه مورفولوژیکی آپوپتوز در هسته اسپرم

به منظور بررسی کمی تغییرات هسته اسپرم‌های قوچ در گروه‌های مختلف از رنگ‌آمیزی Diff-Quick استفاده شد. در این رنگ-آمیزی، آکروزوم اسپرم به رنگ صورتی و هسته اسپرم به رنگ بنفش دیده می‌شوند (World Health Orqanization, 2010).

به طور خلاصه از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم از گروه‌های مختلف، گسترش‌های نازکی تهیه شدند. گسترش‌ها با استفاده از تثبیت کننده متانول خالص به مدت ۲۵ ثانیه، تثبیت و سپس با محلول Diff-Quick-1 به مدت ۲۵ ثانیه و با محلول Diff-Quick-2 به مدت ۲۵ ثانیه رنگ‌آمیزی شدند. ارزیابی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر انجام و برابر، در هر نمونه تعداد ۲۰۰ سلول مشاهده و درصد شکست DNA به صورت حاصل جمع اسپرم‌های با هاله کوچک، بدون هاله و تجزیه شده محاسبه گردید.

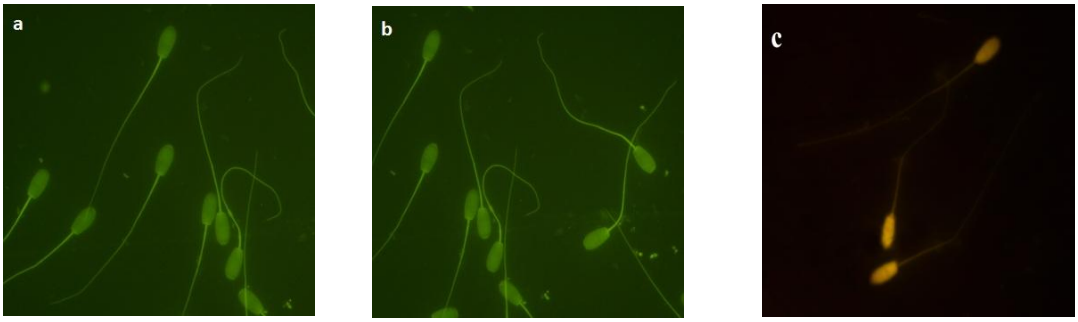
در این رنگ‌آمیزی میزان شکست DNA به ۵ حالت زیر در نظر گرفته شد.



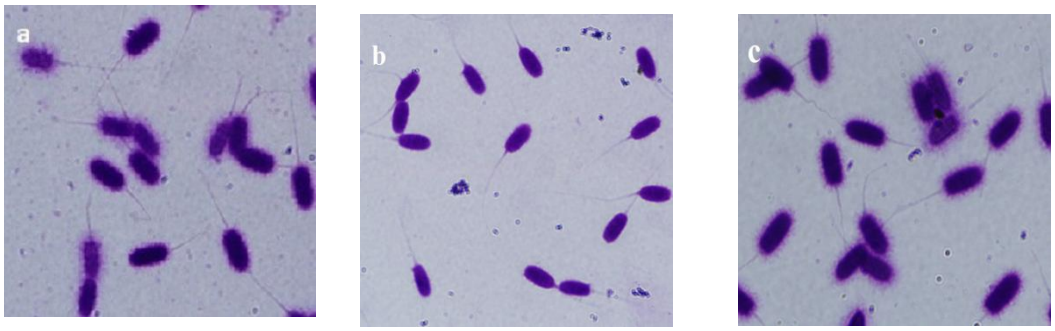
عکس‌برداری صورت گرفت. با استفاده از عکس‌های گرفته شده، اندازه‌گیری قطر کوچک هسته اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف توسط نرم‌افزار موتیک برای تعداد ۱۰۰ اسپرم انجام شد.

آنالیز داده‌ها

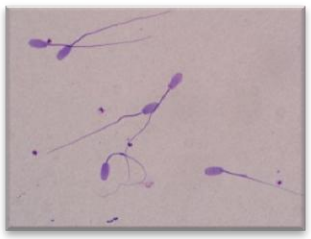
داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ (Norusis, 2008) و روش تجزیه واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی استفاده شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.



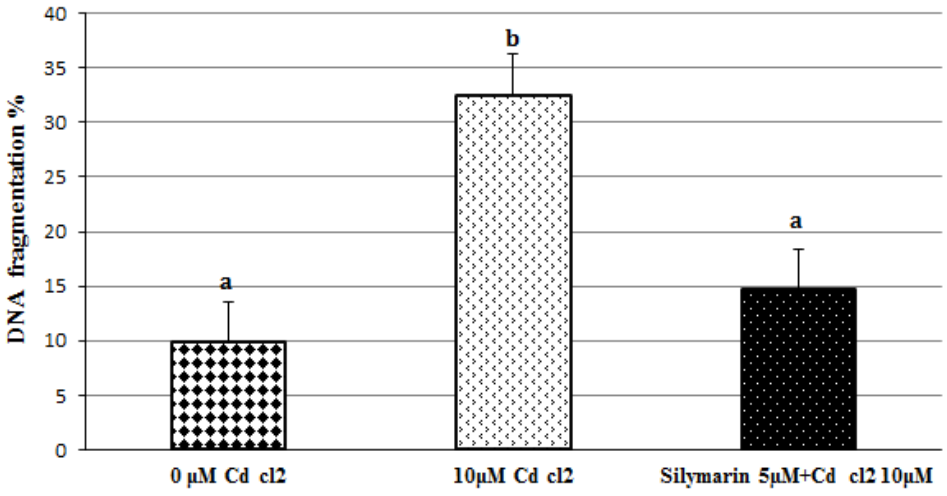
شکل ۱- بررسی دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA در نمونه‌های اسپرم قوچ. (a) شاهد: اسپرم دارای DNA دو رشته‌ای سالم (سبز رنگ)، (b) تیمار اسپرم‌ها با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) در مقایسه با شاهد تأثیر معنی‌داری بر دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشت، (c) کنترل مثبت: اسپرم قوچ با DNA تک رشته‌ای (به مواد و روش‌ها مراجعه شود) قرمز رنگ. رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر).



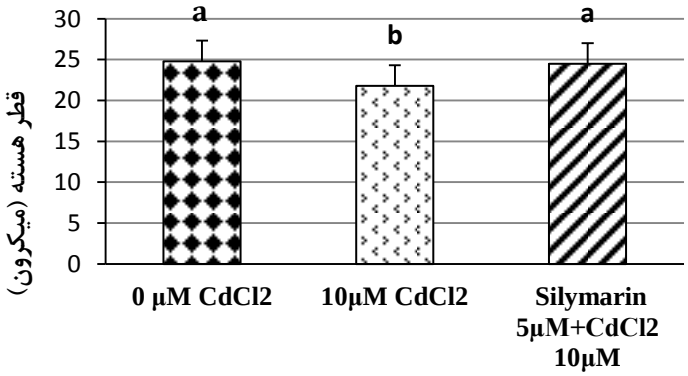
شکل ۲- بررسی شکست DNA در اسپرم‌های قوچ با استفاده از آزمایش SCD، (a) شاهد ـ اسپرم دارای هاله بزرگ و متوسط (بدون شکست DNA)، (b) اسپرم‌های تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه)ـ اسپرم بدون هاله (دارای شکست DNA)، (c) اسپرم‌های تیمار شده با سیلیمارین (۵ میکرومولار) و کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه)- تعداد اسپرم‌های هاله‌دار افزایش یافته است (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر).



شکل ۳- بررسی قطر هسته اسپرم به کمک رنگ‌آمیزی دیف کوئیک (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)



نمودار ۱- مقایسه درصد شکستگی DNA اسپرم قوچ به کمک آزمایش SCD. میزان شکستگی DNA اسپرم در گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰میکرومولار) نسبت به گروه شاهد (غلظت صفر) به طور معنی‌داری افزایش یافت. کاربرد همزمان سیلیمارین (۵ میکرومولار) و کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) توانست درصد شکستگی DNA اسپرم را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به طور معنی‌داری کاهش دهد. مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده‌اند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند (P<۰/۰۵).



نمودار ۲- بررسی قطر هسته اسپرم به کمک رنگ‌آمیزی دیف کوئیک. میانگین قطر هسته اسپرم‌ها در گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه در مقایسه با گروه شاهد (غلظت صفر) کاهش معنی‌داری داشت. کاربرد همزمان سیلیمارین (۵ میکرومولار) و کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به طور معنی‌داری جبران کند. مقادیر به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده‌اند. میانگین‌های دارای حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند (P<۰/۰۵).

جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوز در هسته اسپرم (بررسی قطر هسته اسپرم)

نتایج نشان دادند که قطر هسته اسپرم‌های تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه شاهد (غلظت صفر به مدت ۱۸۰ دقیقه) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) کاهش یافت. کاربرد همزمان سیلیمارین (۵ میکرومولار) و کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) تا حد گروه شاهد جبران کند (شکل ۳ و نمودار ۲).

نتایج

ارزیابی تمامیت DNA اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی-های ویژه هسته

در این بخش، از رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ و تست SCD استفاده شد.

بررسی ساختمان دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای DNA اسپرم

به منظور بررسی دناتوره شدن DNA (دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای) در اسپرم‌های قوچ تیمار شده با کلرید کادمیوم با غلظت ۱۰ میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه، بر روی گسترش‌های اسپرمی، رنگ‌آمیزی اکریدین اورنژ انجام شد. نتایج نشان دادند که تیمار اسپرم‌ها با کلرید کادمیوم با غلظت ذکر شده در مقایسه با شاهد (غلظت صفر و لحظه زمانی ۱۸۰ دقیقه) بر دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم تاثیری نداشت (شکل ۱).

بررسی شکست DNA اسپرم (تست SCD)

برای بررسی درجات متفاوتی از شکست DNA اسپرم از آزمایش SCD استفاده شد. نتایج نشان دادند که درصد شکست DNA در گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰میکرومولار به مدت ۱۸۰ دقیقه) نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) افزایش یافت. کاربرد همزمان سیلیمارین (۵ میکرومولار) و کلرید کادمیوم (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱۸۰ دقیقه توانست این اثر را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم (۱۰میکرومولار) به طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) تا حد گروه شاهد جبران کند (شکل ۲ و نمودار ۱).

بحث

نتایج این پژوهش نشان دادند که تیمار اسپرم‌ها با کلرید کادمیوم به مدت ۱۸۰ دقیقه موجب کاهش معنی‌داری در قطر هسته اسپرم نسبت به گروه شاهد شد. در مطالعه‌ای که اثرات کادمیوم بر سلول‌های پستانداران و سلول‌های U937 لنفوم انسان بررسی شد، کادمیوم منجر به القاء آپوپتوز گردید (Averbeck, 2006؛ Bertin and Li و همکاران، ۲۰۰۰). کادمیوم می‌تواند موجب ایجاد آپوپتوز در بسیاری از بافت‌ها و سلول‌ها، هم در موجود زنده و هم در شرایط آزمایشگاهی شود (Mendez-Armenta and Rlos, 2007). متراکم و تیره شدن هسته و کروماتین یکی از مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوز محسوب می‌شود (Chiu و همکاران، ۲۰۰۲؛ He و همکاران، ۲۰۰۹؛ Lane و همکاران، ۲۰۰۲).

کادمیوم با مکانیسم‌های مختلفی می‌تواند موجب متراکم شدن هسته اسپرم‌ها شود. در مطالعه‌ای نشان داده شد که کادمیوم با افزایش بیان کاسپازها منجر به آپوپتوز در سلول‌های پوششی عدسی چشم انسان می‌گردد (Song and Koh, 2012). در میان پروتئین‌هایی که توسط کاسپازها شکسته و تخریب می‌شوند می‌توان از پروتئین‌های اسکلت سلولی نظیر لامین، آلفا فودرین و اکتین نام برد (Chang and Yang, 2000). این احتمال وجود دارد که کادمیوم با فعال کردن کاسپازها به خصوص کاسپاز ۳ و ورود آن به هسته منجر به شکستگی پروتئین‌های هسته‌ای نظیر لامین و در نهایت فروپاشی هسته گردد.

با توجه به اینکه در اثر افزایش غیرطبیعی یون‌های کلسیم داخل سلولی، پروتئازهای وابسته به کلسیم، فعال می‌شوند در صورت وجود مقدار بالای کادمیوم، این فلز جانشین کلسیم می‌شود (Goering و همکاران، ۱۹۹۵) و می‌تواند نقش کلسیم را تقلید نماید لذا این احتمال وجود دارد که کادمیوم از این طریق منجر به فعال‌سازی پروتئازهای وابسته به کلسیم مثل کالپین‌ها گردد. فعال-سازی کالپین‌ها باعث فعال شدن کاسپاز- ۱۲ و گسترش تخریب-های سلولی می‌گردد (Wlodkowic و همکاران، ۲۰۰۹). در طی آپوپتوز، فرم فعال این آنزیم قادر است پروتئین‌های غشایی و اسکلت سلولی که تمامیت غشا و سلول را تضمین می‌نمایند، تخریب نماید (Ray و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین مشخص شده است که این پروتئاز قادر است پروتئین‌های ماتریکس هسته که تمامیت هسته را تضمین می‌کنند، مورد حمله قرار داده و منجر به فروپاشی ساختار هسته و تغییراتی از جمله متراکم شدن هسته و کروماتین شود (Mellgren، ۱۹۹۱).

احتمال دیگری که وجود دارد این است که تنش اکسیداتیو با فعال کردن پروتئازها منجر به شکسته شدن پروتئین‌های اسکلت هسته و در نتیجه متراکم شدن هسته می‌گردد. افزایش واسطه‌های فعال اکسیژن یکی از مکانیزم‌های ایجاد آسیب توسط کادمیوم در بافت

بیضه است (Arabi، ۲۰۰۶). مطالعات نشان می‌دهند که ارتباط معنی‌داری بین تولید رادیکال آزاد اکسیژن و آپوپتوز وجود دارد. تنش اکسیداتیو بر چندین جز سلول نظیر DNA و پروتئین‌ها اثر گذاشته و موجب تغییراتی در ساختمان آنها می‌شود. این تغییرات ساختمانی نیز به نوبه خود موجب تغییرات مهمی در عملکرد آن‌ها شده و در نهایت منجر به ایجاد آسیب می‌شوند (Pathak and Khandelwal, 2007). با توجه به این که در این مطالعه سیلیمارین با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی (Soria و همکاران، ۲۰۰۷) و هم چنین با خاصیت تثبیت‌کنندگی غشای اسپرم (Feher and Lengyel, 2012) توانست اثرات مخرب کلرید کادمیوم بر تمامیت غشاء و واکنش آکروزومی اسپرم را خنثی نماید، احتمال عملکرد کلرید کادمیوم با مکانیسم القای تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد.

با توجه به اینکه در پژوهش حاضر سیلیمارین به عنوان یک آنتی-اکسیدان قوی در گروه به طور همزمان تیمار شده با سیلیمارین و کلرید کادمیوم توانست کاهش قطر هسته اسپرم را نسبت به گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم به طور معنی‌داری تا حد گروه شاهد جبران کند لذا این احتمال که در پژوهش حاضر، کاهش قطر هسته اسپرم در اثر کلرید کادمیوم از طریق القای تنش اکسیداتیو صورت گرفته باشد، قوت می‌یابد.

نتایج بررسی حاضر نشان دادند که در گروه تیمار شده با کلرید کادمیوم، میزان شکست DNA نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. در مطالعه‌ای که بر اسپرم موش‌های تیمار شده با مقادیر مختلف کادمیوم (۱، ۲، ۳ میلی‌گرم به ازای گرم وزن بدن) به مدت ۳۵ روز انجام شد، کادمیوم منجر به افزایش قطعه قطعه شدن DNA گردید (Oliveira و همکاران، ۲۰۰۹). نشان داده شده است که کادمیوم منجر به افزایش آسیب DNA در سلول‌های لایدیگ کشت شده موش صحرایی می‌شود (Yang و همکاران، ۲۰۰۳). کادمیوم قابلیت تخریب DNA اسپرم را دارد (Filipic and Hei, 2004). در مطالعه‌ای که بر سلول‌های کبدی موش صحرایی تیمار شده با ۵ تا ۲۰ میلی‌گرم کادمیوم به ازای هر گرم وزن بدن صورت گرفت، کادمیوم منجر به آسیب به DNA سلول‌های کبدی شد (Yu و همکاران، ۲۰۰۷).

عوامل مختلفی موجب شکستگی DNA می‌شوند. یکی از این عوامل می‌تواند به افزایش کلسیم داخل سلولی مربوط باشد. طبق مطالعات گذشته، در صورت وجود مقدار بالای کادمیوم، این فلز جانشین کلسیم می‌شود (Goering و همکاران، ۱۹۹۵). افزایش غیرطبیعی یون کلسیم داخل سلولی منجر به مرگ سلول می‌شود (Mattson and Chan, 2003). افزایش یون کلسیم موجب عملکرد غیرطبیعی اندامک‌های سلولی از جمله میتوکندری‌ها می-گردد. تجمع بیش از اندازه کلسیم در این اندامک موجب تغییر ولتاژ غشای میتوکندری و باز شدن منافذ این اندامک شده که در نتیجه منجر به آزاد شدن پروتئین‌های آپوپتوژنیک همچون سیتوکروم C، فاکتورهای القاء کننده آپوپتوز و اندونوکلئاز G از این اندامک می‌شود (Jeong and Seol, 2008). در طی آپوپتوزیس، فاکتورهای القاء کننده آپوپتوز و اندونوکلئاز G از سیتوزول وارد هسته شده و به عنوان نوکلئاز باعث قطعه قطعه شدن DNA و تراکم کروماتین می‌شوند (Bayir and Kagan, 2008؛ Kim و همکاران، 2006؛ Parcellier و همکاران، ۲۰۰۸). سیتوکروم C باعث القای تشکیل آپوپتوزوم شده و باعث فعال شدن کاسپاز ۹ می‌گردد. کاسپاز ۹ فعال هم به نوبه خود فعال‌سازی پروتئولیتیک کاسپازهای اثر کننده (کاسپاز ۳، ۶ و ۷) را کاتالیز کرده و منجر به قطعه قطعه شدن و تجزیه DNA در سلول‌های دستخوش آپوپتوز می‌گردد (Bayir and Kagan, 2008؛ Su و همکاران، ۲۰۰۶؛ Kim و همکاران، ۲۰۰۶؛ Scott، ۲۰۱۰). بدین ترتیب که کاسپاز ۳ فعال، منجر به فعال کردن آنزیم کاسپاز داکسی ریبونوکلئاز می‌شود. آنزیم کاسپاز داکسی ریبونوکلئاز در شرایط طبیعی به صورت متصل به مهارکننده آنزیم کاسپاز داکسی ریبونوکلئاز می‌باشد. کاسپاز فعال، مهارکننده آنزیم کاسپاز دی ریبونوکلئاز را شکسته و موجب جدا شدن مهارکننده از آنزیم کاسپاز داکسی ریبونوکلئاز می‌شود. این امر موجب فعال شدن آنزیم مذکور می‌گردد. آنزیم فعال شده از سیتوپلاسم وارد هسته شده و منجر به شکستگی DNA می-گردد (Sakahira و همکاران، ۱۹۹۸).

با افزایش کلسیم داخل سلولی، نوکلئازهای وابسته به کلسیم نیز فعال و منجر به شکستگی DNA می‌شوند. در طی آپوپتوز، نقش نوکلئازهای داخلی فعال شده بوسیله کلسیم که با شکستن DNA

از نواحی بین نوکلئوزوم، منجر به تشکیل قطعات نوکلئوزومی DNA بر روی ژل آگارز می‌شوند، به اثبات رسیده است (Nagata، ۲۰۰۵). افزایش شکست DNA اسپرم می‌تواند ناشی از تولید رادیکال آزاد توسط کادمیوم و تخریب سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز باشد. در مطالعه‌ای که بر سلول‌های کشت شده میلوئید انسان صورت گرفت، کادمیوم و تنش اکسیداتیو ناشی از آن منجر به آسیب DNA شد (Bagchi و همکاران، ۲۰۰۰).

با توجه به اینکه در پژوهش حاضر سیلیمارین به عنوان یک آنتی-اکسیدان قوی در گروه تیمار شده به طور همزمان با سیلیمارین و کلرید کادمیوم توانست شکستگی DNA ناشی از کلرید کادمیوم را مهار نماید. لذا این احتمال که در پژوهش حاضر شکستگی DNA در اثر کلرید کادمیوم از طریق تنش اکسیداتیو صورت گرفته باشد، قوت می‌یابد. بدین ترتیب که سیلیمارین مانند ویتامین C و E به عنوان یک از بین برنده رادیکال‌های آزاد (Sies و همکاران، ۱۹۹۲)، رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در اثر اکسیداسیون سلولی را از بین برده باشد (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش شده است که ذخیره‌سازی اسپرم قوچ به شکل مایع به همراه سیلیمارین و کاپروئیک اسید موجب حفظ کیفیت اسپرم و ممانعت از اکسیداسیون لیپیدهای آن می‌شود (Roostaei-Ali Mehr and Parisoush, 2016). جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد (Agarwal and Saleh, 2002) و از این طریق منجر به جلوگیری از شکست DNA می‌گردند.

نتیجه‌گیری

کلرید کادمیوم به عنوان یک آلاینده زیست محیطی احتمالاً با القای تنش اکسیداتیو، ناهنجاری‌هایی را در قطر هسته و سلامت DNA اسپرم قوچ ایجاد نموده و سیلیمارین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است اثرات مخرب این آلاینده را بر این پارامترهای حیاتی اسپرم جبران نماید.

منابع

زرگری، ع. (۱۳۷۵) گیاهان دارویی (چاپ پنجم)، انتشارات دانشگاه تهران. جلد سوم، صص. ۳۸-۳۴.

Agarwal, A., Prabakaran, S.A. and Sikka, S.C. (2007). Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: Evidence- based analysis. *American Urological Association*. 26: 2-11.

Agarwal, A. and Saleh, R.A. (2002). Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*. 29: 817-827.

Alabi, N.S., Whanger, P.D. and Wu, A.S.H. (1985). Interactive effects of organic and inorganic selenium with cadmium and mercury on spermatozoal oxygen consumption and motility *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 33 :911-919.

Alarcon de la Lastra, A.C., Martin, M.J., Motilva, V., Jimenez, M., La Casa, C. and Lopez, A. (1995). Gastroprotection induced by silymarin, the hepatoprotective principle of *Silybum marianum* in ischemia-reperfusion mucosal injury: role of neutrophils. *Planta Medica*. 61: 116-119.

Arabi, R. (2006). Cadmium as an etiology of sperm dysfunction in Holstein bulls. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 7: 29-36.

Bagchi, D., Joshi, S.S., Bagchi, M., Balmoori, E.J., Benner, C.A., Kuszynski, S. *et al*. (2000). Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 14: 33-41.

Basiglio, C.L., Pozzi, E.J.S., Mottino, A.D. and Roma, M.G. (2009). Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. *Chemicobiological Interactions*. 179: 297-303.

Bayir, H. and Kagan, V.E. (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis- there is nothing more practical than a good theory. *Critical Care*. 12: 1-11.

Bertin, D. and Averbeck, T. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. *Biochimie*. 88: 1549-1559.

Bukowska, D., Kempisty, B., Sikora, J., Jackowska, M., Wozna, M., Antosik, P. *et al*. (2011). The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. *Veterinarni Medicina*. 56: 248–254.

Chang, H.Y. and Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 821- 846.

Chiu, R., Novikov, L., Mukherjee, S. and Shields, D. (2002). A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *Journal of Cell Biology*. 159: 637-648.

Dehmlow, C. and Murawski, N. (1996). Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of Arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Science*. 58: 1591-1600.

Eggert-Kruse, W., Rohr, G., Jochum, R., Adolph, M. and Runnebaum, B. (1992). The effect of heavy metals on the *in vitro* interaction between human sperm and cervical mucus. *Deutsche Medizinsche Wochenschrift*. 117: 1383-1389.

Feher, J. and Lengyel, G. (2012). Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 210-217.

Filipic, M. and Hei, T.K. (2004). Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation Research*. 546: 81-91.

Goering, L., Waalkes, M.P. and Klassen, C.D. (1995). Toxicology of cadmium, toxicology of metals. *Biochemical Aspects (Handbook of Experimental Pharmacology).* Springer-Verlag. 115: 189-213.

He, B., Lu, N. and Zhou, Z. (2009). Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 21: 900-912.

Jeong, S.Y. and Seol, D.W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*. 41: 11-22.

Kidd, P.M. (2009). Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the *silymarin*, *curcumin*, green tea, and grape seed extracts. *Alternative Medicine Review*. 14: 226-246.

Kim, R., Emi, M. and Tanabe, K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 57: 545-553.

Kittur, S., Wilasrusmee, S., Pedersen, W.A., Mattson, M.P., Straube-West, K., Wilasrusmee, C., Jubelt, B. and Kittur, D.S. (2002). Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on neurons in culture. *Journal of Molecular Neuroscience*. 18: 265-269.

Lane, J.D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F.A., Woodman, P.G. and Allan, V.J. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *Journal of Cell Biology*. 156: 495-509.

Li, M., Kondo, T., Zhao, Q., Li, F., Tanabe, K., Arai, Y. *et al*. (2000). Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+}-calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 39702-39709.

Mantau, H. and Baudo, R. (1992). Sources of cadmium, its distribution and turnover in the freshwater environment. *International Agency for Research on Cancer Scientific Publication*. 118: 133-148.

Mattson, M.P. and Chan, S.L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology*. 5: 1041-1043.

Mellgren, R.L. (1991). Proteolysis of nuclear proteins by mu-calpain and m-calpain. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 13920-13924.

Mendez-Armenta, M.M. and Rlos, C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23: 350-358.

Mukherjee, A., Giri, A.K., Sharma, A. and Talukder, G. (1988). Relative efficacy of short-term tests in detecting genotoxic effects of cadmium chloride in mice *in vivo*. *Mutation Research*. 206: 285-296.

Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology*. 23: 853-875.

Nemmich, S., Chbane-Sari, D. and Guriaud, P. (2007). Role of α-tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in wistar rats blood, liver and brain. *Chemico-Biology Interactions*. 170: 221-230.

Norusis, M. (2008). SPSS 16.0 Guide to Data Analysis 2nd Edition. Mc Graw Hill, USA.

Oliveira, H., Spano, M., Santos, C. and Pereira, M. (2009). Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. Reproductive Toxicology .28: 550-555.

Omidbaigi, R. and Nobakht, A. (2001). Nitrogen fertilizer affecting growth, seed yield and active substances of milk thistle. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4: 1345-1349.

Parcellier, A., Tintignac, L.A., Zhuravleva, E. and Hemmings, B.A. (2008). PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal*. 20: 21-30.

Pathak, N. and Khandelwal, S. (2007). Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicology Letters*. 169: 95-108.

Ray, S.K., Matzelle, D.C., Wilford, G.G., Hogan, E.L. and Banik, N.L. (2000). E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats. *Brain Research*. 867: 80-89.

Roostaei-Ali Mehr, M. and Parisoush, P. (2016). Effect of different levels of Silymarin and Caproic acid on storage of ram semen in liquid form. *Reproduction in Domestic Animals*. 51: 569-574.

Sakahira, A., Hideki, R., Enari, X., Masato, O., Nagata, F. and Shigekazu, P. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391: 96–99.

Schulz, V., Hansel, R. and Tyler, V.E. (1997). Rational Phytotherapy: *A Physicians' Guide to Herbal Medicine.* Springer, *Berlin*, p: 306.

Scott, L. (2010). The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion*. 10: 316-320.

Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A.R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 669: 7-20.

Song, N. and Koh, J. (2012). Effects of cadmium chloride on the cultured human lens epithelial cells. *Molecular Vision*. 18: 983-988.

Soria, E.A., Eynard, A.R., Quiroga, P.L. and Bongiovanni, G.A. (2007). Differential effects of quercetin and silymarin on arsenate-induced cytotoxicity in two human breast adenocacinoma cell lines. *Life Science*. 81: 1397-1402.

Su, C.L., Huang, L.L., Huang, L.M., Lee, J.C., Lin, C.N. and Won, S.J. (2006). Caspase-8 acts as a key upstream executor of mitochondria during justicidin A-induced apoptosis in human hepatoma cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 29: 580: 3185-3191.

Tejada, L., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J. and Friedman, S.A. (1984). Test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility*. 42: 87-91.

Wlodkowic, D., Skommer, J., McGuinness, D., Hillier, C. and Darzynkiewicz, Z. (2009). ER–Golgi network-A future target for anti-cancer therapy. *Leukemia Research*. 33: 1440- 1447.

World Health Organization. (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.15th Edition, Cambridge University *Press*. PP: 21-23.

Xiong, S., Zhao, Q., Rong, Z., Huang, G., Huang, Y., Chen, P. *et al*. (2003). hSef inhibits PC-12 cell differentiation by interfering with Ras-mitogen-activated protein kinase MAPK signaling. *The Journal of Biological chemistry*, 278: 50273-50282.

Yang, J., Arnush, M., Chenc, Q., Wu, C., Pang, B. and Jiang, X. (2003). Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reproductive Toxicology*. 17: 553–560.

Yu, R., He, L.F. and Chen, X.M. (2007). Effects of cadmium on hepatocellular DNA damage, proto-oncogene expression and apoptosis in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. 20: 146-153.