مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن کت اسپر۲ و پارامترهای مورفولوژیکی جنین در موش سوری مواجه‌شده با هورمون اتفون

رامین جهانگیرفرد[۱]، غلامرضا نجفی[۲*]، علی شالیزار جلالی[۳]، عباس احمدی[۲]، الهام زاده هاشم[۴]

۱. دکتری تخصصی آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار علوم تشریحی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشیار بخش بافت‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. استادیار بخش سم‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: اتفون، هورمونی است که برای تسریع روند رشد گیاهی به کار می‌رود. اغلب پس از ورود به بافت‌ها سبب ایجاد اختلال در دستگاه تولیدمثلی و کاهش قدرت باروری در اسپرم می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر اتفون بر پارامترهای مورفولوژیکی جنین و جایابی پروتئین کت اسپر۲ در اسپرم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۷۸ سر موش سوری نر و ماده نژاد NMRI به‌طور کاملاً تصادفی به گروه‌های کنترل و آزمایشی تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی اتفون را با دوزهای ۱۲۰، ۲۴۰ و ۴۸۰ mg/kg و همچنین گروه کنترل مثبت داروی نئوستیگمین (۰/۱ mg/kg) دریافت کردند. پس از تیمار، حیوانات بیهوش شدند و به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی گردیدند. سپس نمونه‌های اسپرم از دم اپیدیدیم برای ارزیابی PCR و ایمونوهیستوشیمیایی اخذ شدند و تا زمان بررسی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از پارامترهای مورفولوژیکی نشان داد که میزان درصد هچ‌شدگی، قابلیت زنده‌مانی، تعداد زاد و ولد و طول جنین در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل، کاهش داشت. همچنین کاهشی در بیان ژن کت اسپر۲ در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل دیده شد. نتایج ایمونوهیستوشیمیایی اسپرم مشخص کرد که مکان‌هایی برای جایابی پروتئین کت اسپر۲ در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: هورمون اتفون با تولید رادیکال‌های آزاد باعث کاهش ویژگی‌های ظاهری جنین می‌شود. همچنین با کاهش بیان ژن کت اسپر۲ و عدم‌جایابی پروتئین در اسپرم سبب اختلال در قدرت باروری و تولیدمثل می‌گردد.

کلیدواژه‌ها:
کت اسپر۲، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، اسپرم، موش

۱. مقدمه

میزان باروری انسان در کشورهای توسعه‌یافته و درحال‌توسعه رو به کاهش است (۱). همچنین آسیب‌های ساختاری و به‌هم‌خوردن تحرک اسپرم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (۲). یکی از نگرانی‌های بزرگ افزایش قابل‌ملاحظه ناباروری، مربوط به آلاینده‌های زیستی و از جمله آنها سموم ارگانوفسفره است که تأثیر بسیار منفی بر اندام‌های مختلف بدن دارند. سموم ارگانوفسفره گروهی هتروژن از ترکیبات هستند که همگی از اسید فسفریک مشتق می‌شوند و دارای دو زنجیره جانبی آلی و یک زنجیره جانبی اضافه می‌باشند. این زنجیره می‌تواند حاوی گروه‌هایی نظیر سیانید، تیوسیانات، هالید، فسفات،

* نویسنده مسئول: غلامرضا نجفی
نشانی: دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۹۱۴۱۴۸۰۵۸۵
رایانامه: G.najafi2006@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0002-1085-6043
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-4985-0850

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۸، شمارهٔ ۳، مرداد و شهریور ۱۴۰۰، ص ۳۸۶-۳۷۹
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

فنوکسی، تیوفنوکسی یا کربوکسیلات باشد (۷-۳). ارگانوفسفره‌ها عوامل شیمیایی مهارکننده کولین استراز هستند که به‌طور عمده به‌عنوان حشره‌کش و همچنین در کشاورزی برای تسریع روند رسیدن میوه‌ها استفاده می‌شوند. هورمون اتفون [1] یک ارگانوفسفره است و حضور آن در مواد غذایی مختلف (گوجه فرنگی، انگور و هندوانه) گزارش شده است (۷، ۸). مصرف محصولات آلوده به اتفون توسط انسان در درازمدت می‌تواند باعث افزایش آسیب‌هایی در ارتباط با سلامت آن باشد (۶، ۷). با توجه به تأثیرات سلولی و مولکولی اتفون از جمله تأثیر بر غلظت یون‌های درون‌سلولی و پایداری و زیست‌پذیری سلولی، تأثیرات بالقوه اتفون در دوزهای مختلف بر دستگاه تولیدمثلی بررسی شده است. اتیلن [2] تنظیم‌کننده رشد گیاهی مهمی است که بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و نمو گیاهان را تنظیم می‌کند. این هورمون، گازی‌شکل است و کاربرد آن در مزرعه، محدودیت دارد. اتفون و دیگر ترکیبات آزادکننده اتیلن، کاربرد تجاری اتیلن را در مزرعه ممکن می‌سازند (۹، ۱۰). اتفون با نام علمی ۲- کلرواتیل فسفونیک اسید [3] و نام تجاری اترل در دهه ۱۹۶۰ کشف شد و به‌صورت محلول آبی روی گیاهان پاشیده می‌شود (۶، ۱۰). ثابت شده است که اتفون در محلول‌هایی با pH پایین، پایدار است ولیکن با افزایش مقدار pH، به اتیلن و یون‌های فسفات و کلر تجزیه می‌شود (۵، ۸). مکانیسم اتفون به این صورت است که ابتدا اثرات نوروتوکسین دارد و سپس از طریق غلظت اتفون، خاصیت سمّی و به‌عنوان ماده فسفریلاسیون‌کننده از فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز به‌ویژه در پلاسمای برخی از حیوانات مثل رت، موش سوری، سگ و انسان، ممانعت می‌کند؛ در نتیجه مشاهده کردند که تأثیر سمّیت اتفون با دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر بافت‌های کلیه و کبد موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی نسبت به مالئیک هیدرازید بیشتر است. در دوزهای بالاتر هم باعث ایجاد گلومرولونفریت در کلیه می‌شود و در نتیجه بیان کردند که پیش‌روندهای رشد گیاه می‌توانند بر بافت‌های کبد و کلیه آسیب برسانند (۹، ۱۰). براساس مطالعات صورت گرفته، کاهشی در میزان سلول‌های خونی از جمله شمارش گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت گزارش شده است. همچنین باعث افزایش میزان بیلی روبین، اوره و کراتینین می‌شود؛ به عبارتی استفاده از هورمون اتفون در موش سوری باعث سرکوب سیستم ایمنی در بدن می‌شود. در نتیجه نشان دادند که چای سبز می‌تواند از اثرات سوء اتفون در بافت‌های مختلف بدن جلوگیری کند و اثرات محافظتی خود را اعمال کند. بنابراین مصرف چای سبز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مؤثر و کارآمد می‌باشد (۱۱). در بافت بیضه، ژنی به نام ژن کت اسپر دو [4] بیان می‌شود که این ژن در لقاح موفقیت‌آمیز پستانداران نقش اساسی دارد.

محققان چهار نوع از ژن کت اسپر۲ را در بیضه یافتند که شامل نوع ۱، ۲، ۳ و ۴ می‌باشد. نوع ۱ را محققان در سال ۲۰۰۱ شناسایی کردند که در کنترل تحرک اسپرم نقش دارد (۱۲). همچنین یک کانال کلسیمی را در اسپرم کد می‌کند که محصول آن تنها در قسمت اصلی دم اسپرم مستقر است و نیز جریان ورودی کلسیم به داخل اسپرم را کنترل می‌کند. کت اسپر نوع ۲ برای ایجاد یک حالت بیش‌فعال برای تحرک اسپرم ضروری است و این تحرک نیز لازمه لقاح موفق می‌باشد. پروتئین‌های نوع ۳ و ۴ با استفاده از ایمونوفلورسنت غیرمستقیم مشخص شده‌اند که در ناحیه آکروزومی سر اسپرم قرار دارند و ممکن است در واکنش آکروزومی نقش داشته باشند. لازم به توضیح است که در مورد بیان ژن کت اسپر۲ اختلاف‌نظر وجود دارد که برخی از پژوهشگران گزارش کردند بیان این ژن پیش از بلوغ جنسی پدیدار می‌شود این در حالی است که برخی از پژوهشگران نیز گزارش کردند بیان ژن کت اسپر۲ در موش‌های یک روزه، یک هفته و دو هفته (پیش از بلوغ جنسی) بیان نمی‌شود (۱۳، ۱۴). براساس مطالعات پیشین ثابت شده است که استفاده مزمن از هورمون اتفون باعث تغییرات اندکی بر پارامترهای تحرک و شمارش اسپرم در رت شده است. همچنین در راستای مطالعه قبلی گزارش شده است که هورمون اتفون هیچ‌گونه تغییراتی بر انسجام DNA اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده توسط آکریدین اورنج نداشته است. بنابراین مطالعه حاضر با بررسی تأثیر اتفون بر خصوصیات و ویژگی‌های مورفولوژیکی جنین‌ها، بیان ژن و همچنین جایابی پروتئین کت اسپر۲ در اسپرم موش سوری صورت پذیرفت.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۷۸ سر موش سوری نر و ماده بالغ (نژاد NMRI) آزمایش شدند. حیوانات از محل نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و در قفس‌هایی از جنس پروپیلن به مدت ۳۵ روز نگهداری شدند و غذای مخصوص و استاندارد (پلت) و آب به‌طور آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. گروه‌های موردمطالعه شامل: گروه ۱ (کنترل منفی) حیوانات در این گروه به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و هیچ ماده‌ای دریافت نکردند. گروه ۲ (کنترل شم) حیوانات در این گروه سرم فیزیولوژی را روزانه به‌صورت خوراکی دریافت کردند. گروه ۳ (دوز پایین) حیوانات در این گروه روزانه ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن هورمون اتفون را به‌صورت خوراکی دریافت کردند. گروه ۴ (دوز متوسط) حیوانات در این گروه روزانه ۲۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن هورمون اتفون را

1 Ethephon Hormon
2 Ethylene
3 2-Chloroethyl Phosphonic Acid
4 CatSper 2 Gene

به‌صورت خوراکی دریافت کردند. گروه ۵ (دوز بالا) حیوانات در این گروه روزانه ۴۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن هورمون اتفون را به‌صورت خوراکی دریافت کردند. گروه ۶ (کنترل مثبت) حیوانات در این گروه داروی نئوستیگمین بروماید را با دوز ۰/۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن را به‌صورت خوراکی دریافت کرده‌اند (۱۵، ۱۶). پس از اتمام دوره تیمار، ابتدا وزن‌کشی و سپس با استفاده از کتامین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند و اسپرم‌ها برای ارزیابی ژن کت اسپر۲ با استفاده از PCR و برای جایابی پروتئین کت اسپر۲ از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی استفاده شد. تحقیق حاضر با کد اخلاق (IR-UU-AEC-3/1105/آد) انجام پذیرفت.

مواد شیمیایی

هورمون اتفون تجاری ۴۸ درصد از شرکت سازنده واقع در استانبول ترکیه خریداری شد. همچنین داروی نئوستیگمین بروماید با درصد خلوص ۹۸ درصد به شکل پودر از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, CAS Number: 114-80-7) تهیه شد.

مطالعات ژنی- مولکولی

برای استخراج توالی ژن‌ها از بانک‌های اطلاعاتی و برای طراحی و سنتز جفت پرایمرهای اختصاصی از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک استفاده شد. بدین منظور از محلول ترایزول برای لیز کردن سلول‌ها استفاده گردید و سپس بقیه مراحل مطابق با متد Sambrook انجام شد (۱۷).

آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

نتایج حاصل از جذب نوری به دقت ثبت شد و به کمک آنها میزان زنده‌مانی سلول‌های اسپرم محاسبه شد. میانگین داده‌ها، انحراف از میانگین و نمودارهای ستونی مقایسه‌ای داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ محاسبه شدند. همچنین از نرم‌افزار Image J نسخه ۱/۵ برای پردازش و تحلیل باندهای ژل مربوط به محصولات PCR استفاده شد.

وضعیت ظاهری جنین

وضعیت مورفولوژیکی جنین‌ها به‌صورت ماکروسکوپی و به‌وسیله استرئومیکروسکوپ انجام گرفت.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

به‌منظور ارزیابی رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، ابتدا اسمیر اسپرم به مدت ۲۰ دقیقه با متانول فیکس و بعد از شستشو با بافر PBS، عمل بازیافت[1] توسط بافر سیترات انجام شد. پس از شستشوی مجدد، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب اکسیژنه ۳ درصد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با سرم ۱۰ درصد بز و در ادامه با آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی پلی کلونال کت اسپر، محصول شرکت سانتا کروز) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه (horse-radish peroxidaseanti-anti goat) به مدت ۲ ساعت روی نمونه‌ها قرار گرفت و با محلول سوبسترای DAB[2] در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت نمونه‌ها آب‌گیری و شفاف‌سازی شدند و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. در کل برای ارزیابی ایمونوهیستوشیمی از گروه کنترل منفی استفاده شد (۱۳).

آنالیز آماری

داده‌ها در بین گروه‌های موردمطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست تعقیبی بنفرونی مقایسه شدند. داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار بیان شدند و سطح ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳. یافته ها

۱.۳. نتایج وضعیت جنین و مطالعات مورفولوژی در حیوان زنده

۱.۱.۳. درصد هچ‌شدگی جنین

درصد هچ‌شدگی جنین‌ها در گروه کنترل منفی و کنترل شم ۱۰۰ درصد بود. در حالی که در گروه کنترل مثبت و همچنین گروه آزمایشی دوز پایین ۶۶/۷ درصد، گروه دریافت‌کننده دوز متوسط و بالا ۳۳/۶ درصد به‌دست آمد. با توجه به نتایج فوق چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیشترین زاد و ولد در گروه کنترل منفی و کنترل شم بود در حالی که کمترین زاد و ولد در گروه‌های دریافت‌کننده دوز متوسط و بالای اتفون ثبت شد (جدول ۱).

۲.۱.۳. تعداد جنین متولد شده

نتایج حاصل از مورفولوژی جنین نشان داد که تعداد جنین‌ها به‌طور متوسط در گروه کنترل منفی و کنترل شم ۱۲ عدد، در گروه دریافت‌کننده دوز پایین ۱۰ عدد، در گروه دوز متوسط ۸ عدد، در گروه دوز بالا ۷ عدد و همچنین در گروه کنترل مثبت ۱۱ عدد مشاهده و ثبت شد. آنالیز آماری نشان داد بین گروه‌های دریافت‌کننده دوز متوسط و بالا در مقایسه با گروه کنترل منفی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بنابراین

1 Retrival
2 Diaminobenzidine Substrate

چنین می‌توان گفت که تعداد جنین‌های متولد شده در این مطالعه کاملاً وابسته به دوز بود و کمترین میزان زاد و ولد در بیشترین دوز مصرفی اتفون دیده شد (جدول ۱).

۳.۱.۳. درصد زنده‌مانی جنین

نتایج ارزیابی درصد زنده‌مانی جنین‌ها نشان داد که کاهشی در میزان درصد زنده‌مانی جنین در گروه‌های دریافت‌کننده دوز بالا و کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل منفی مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در حالی که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده دوز پایین و متوسط نسبت به گروه کنترل منفی وجود نداشت. میزان درصد زنده‌مانی جنین کاملاً در حالت وابسته به دوز به‌شدت تحت تأثیر اثرات سمّی اتفون قرار گرفت (جدول ۱).

۴.۱.۳. وزن جنین

میانگین وزن جنین‌های متولد شده نشان داد بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. فقط در گروه دریافت‌کننده دوز بالای اتفون و کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش داشتند ($p<۰/۰۵$) (تصویر ۱، الف و جدول ۲).

۵.۱.۳. طول جنین

در این تحقیق برای اندازه‌گیری طول جنین از روش طول سری-نشیمنگاهی [1] و سری- پاشنه‌ای [2] استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی و گروه کنترل منفی از نظر طول جنین وجود نداشت. کاهش اندکی در میزان طول جنین در گروه دریافت‌کننده دوز بالای اتفون نسبت به گروه کنترل منفی مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱. مقایسه میانگین اثرات دوزهای مختلف هورمون اتفون بر میزان هچ، تعداد و قابلیت زنده مانی جنین

	گروه ۱ (کنترل منفی)	گروه ۲ (کنترل شم)	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز متوسط)	گروه ۵ (دوز بالا)	گروه ۶ (کنترل مثبت)
میزان هچ شدگی جنین (درصد)	۱۰۰	۱۰۰	۶۶/۷	۳۳/۶	۳۳/۶	۶۶/۷
میانگین تعداد جنین (عدد)	۱۲	۱۲	۱۰	۸	۷	۱۱
قابلیت زنده مانی جنین (درصد)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	صفر	۸/۶۹

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SD مدوّن شده‌اند.

شکل ۱. مشاهده وضعیت مورفولوژیکی جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

جدول۲: مقایسه میانگین اثرات دوزهای مختلف هورمون اتفون بر وزن جنین، طول جنین و مورفولوژی جنین

	گروه ۱ (کنترل منفی)	گروه ۲ (کنترل شم)	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز متوسط)	گروه ۵ (دوز بالا)	گروه ۶ (کنترل مثبت)
وزن جنین (گرم)	۱/۶۵^{a}	۱/۶۱^{a}	۱/۶۵^{a}	۱/۵۳^{a}	۱/۴۷^{b}	۱/۳۹^{c}
میانگین طول جنین (سانتی متر)	۲/۱۸^{a}	۲/۱۷^{a}	۲/۴۸^{a}	۲/۲۷^{a}	۱/۷۳^{b}	۱/۳۳^{b,c}
مورفولوژی جنین	سالم و بدون ناهنجاری	سالم و بدون ناهنجاری	سالم و بدون ناهنجاری	سالم و بدون ناهنجاری	تراتوژن، ناقص الخلقه زایی و کرانیوپاگوس	تراتوژنی و ناقص الخلقه زایی

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SD مدوّن شده‌اند.

1 Crown-Rump Length (CRL)
2 Crown-Heel Length (CHL)

۶.۱.۳. مورفولوژی جنین

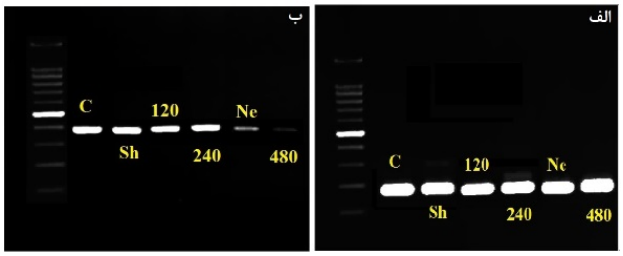
در بررسی حاضر جنین‌ها در گروه‌های کنترل منفی، کنترل شم، دوز پایین و متوسط از نظر مورفولوژی کاملاً سالم و بدون ناهنجاری متولد شدند. تنها در گروه دریافت‌کننده دوز بالا جنین‌ها از ناحیه دست و پا ناقص‌الخلقه[1] بودند و همچنین دو جنین از قسمت پس سری به همدیگر چسبیده بودند و یک ناهنجاری کرانیوپاگوس[2] ایجاد کرده بودند. شایان ذکر است که تمامی جنین‌های گروه دوز بالا به‌صورت مرده متولد شدند. همچنین حالت‌های مختلف تراتوژنی در گروه کنترل مثبت به‌وضوح مشاهده شد. علایم ماکروسکوپیک تراتوژنی به‌صورت نقص در رشد ارگانوژنز دیده شد و تنها دو جنین از گروه دوز بالا با ارگانوژنز کامل متولد شدند. رشد پاها نسبت به دست‌ها تکامل‌یافته‌تر بود و فقط یک عدد جنین دارای علایم حیاتی و نشانه‌های تنفسی بود. (جدول۲).

۲.۳. بیان ژن

کاهشی در بیان ژن کت اسپر۲ بین گروه‌های دریافت‌کننده اتفون در مقایسه با گروه کنترل منفی دیده شد. در مطالعه حاضر، هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده دوز پایین و متوسط وجود نداشت. همچنین کاهش نسبی بین گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل شم و کنترل منفی مشاهده شد (تصویر۲، ب). در بررسی حاضر نتایج نشان داد که میزان بیان ژن بتا اکتین به‌عنوان یک ژن کنترل خانه‌دار داخلی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. فقط یک کاهش نسبی بین گروه دریافت‌کننده بیشترین دوز اتفون نسبت به گروه کنترل منفی وجود داشت (تصویر ۲، الف).

۳.۳. ایمونوهیستوشیمی

هیچ‌گونه واکنش رنگی نسبت به ایمونوهیستوشیمیایی کت اسپر۲ در گروه کنترل منفی و کنترل شم مشاهده نشد (تصویر ۳، الف). زیرا در نمونه‌های کنترل منفی و کنترل شم در مرحله انکوبه کردن، به جای آنتی بادی اولیه از PBS یک‌صدم مولار استفاده شد. همچنین واکنش رنگی ایمونوهیستوشیمیایی کت اسپر۲ در گروه‌های دریافت‌کننده دوز پایین، متوسط و بالای اتفون اثرگذار نبود (تصویر ۳، ج). در ضمن رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی فقط در گروه کنترل مثبت غالباً در ناحیه آکروزومی سر اسپرم جایابی شد (تصویر ۳، ب). همچنین در گروه نبود رسوب قهوه‌ای‌رنگ در رنگ‌آمیزی بدون آنتی‌بادی اولیه، نشان‌دهنده اختصاصی بودن واکنش آنتی‌بادی اولیه می‌باشد. در حالی که در گروه‌های آزمایشی، نبود رسوب قهوه‌ای‌رنگ دال بر اثرات توکسیک هورمون اتفون مرتبط است.

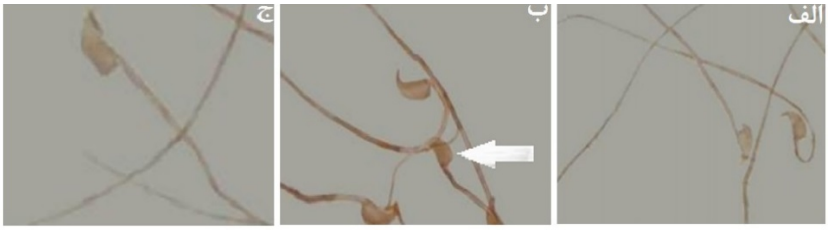


شکل ۲. باندهای بتا–اکتین (تصویر الف) و باندهای ژن کت اسپر ۲ (تصویر ب) در اسپرم موش سوری

جدول ۳. مقایسه میانگین بیان ژن کتسپر۲ نسبت به بتا اکتین در گروه‌های مختلف آزمایشی

	گروه ۱ کنترل منفی	گروه ۲ کنترل شم	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز متوسط)	گروه ۵ (دوز بالا)	گروه ۶ (کنترل مثبت)
کت اسپر ۲	۱/۷۲±۰/۰۱^{a}	۱/۴۹±۰/۲۲^{a}	۰/۸۳±۰/۰۲^{b}	۰/۷۸±۰/۰۱^{b}	۰/۴۷±۰/۰۴^{c}	۱/۱۲±۰/۱۲^{d}
بتا - اکتین	۱/۰۷±۰/۰۶^{a}	۰/۹۴±۰/۰۳^{a}	۰/۹۰±۰/۰۱^{a}	۰/۸۵±۰/۰۱^{a}	۰/۷۹±۰/۰۱^{b}	۰/۸۷±۰/۰۳^{a}

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SD مدوّن شده‌اند.



شکل ۳. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی اسپرم موش سوری

1 Teratogenicity
2 Craniopagus

جدول ۳. مقایسه میانگین بیان ژن کتسپر۲ نسبت به بتا اکتین در گروه‌های مختلف آزمایشی

	گروه ۱ کنترل منفی	گروه ۲ کنترل شم	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز متوسط)	گروه ۵ (دوز بالا)	گروه ۶ (کنترل مثبت)
کت اسپر ۲	۱/۷۲±۰/۰۱^{a}	۱/۴۹±۰/۲۲^{a}	۰/۸۳±۰/۰۲^{b}	۰/۷۸±۰/۰۱^{b}	۰/۴۷±۰/۰۴^{c}	۱/۱۲±۰/۱۲^{d}
بتا - اکتین	۱/۰۷±۰/۰۶^{a}	۰/۹۴±۰/۰۳^{a}	۰/۹۰±۰/۰۱^{a}	۰/۸۵±۰/۰۱^{a}	۰/۷۹±۰/۰۱^{b}	۰/۸۷±۰/۰۳^{a}

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. داده‌ها بر اساس Mean±SD مدوّن شده‌اند.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

سموم ارگانوفسفره، یکی از مهم‌ترین سموم شیمیایی می‌باشد که در قسمت‌های مختلف از جمله کشاورزی و همچنین به‌عنوان حشره‌کش به کار می‌رود (۵-۳). یکی از مهم‌ترین این سموم، سم اتفون است که در امور کشاورزی برای بهبود در تسریع روند رشد گیاهی استفاده می‌شود (۶، ۱۶). ماهیت اتفون به‌عنوان هورمون رشد اثبات شده است (۸، ۱۶). اتفون پس از ورود به داخل بافت‌ها، از طریق بری فعل و انفعالات داخل سلولی می‌تواند فعالیت میتوکندری را مختل کند. این ارگانل در تولید گونه‌های فعال اکسیژن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. رادیکال‌های آزاد تولید شده در اثر سموم ارگانوفسفره گزارش شده است. همچنین در این راستا رادیکال‌های آزاد متعاقب مصرف اتفون در بافت‌های مختلف بدن تولید می‌شوند. براساس مطالعات قبلی نشان داده شده است که سیستم ROS می‌تواند از عملکرد طبیعی بافت‌ها از جمله دستگاه تناسلی جلوگیری کند. این سیستم باعث می‌شود که تولید و ذخیره انرژی به شکل ATP در داخل سلول‌ها کاهش پیدا کند (۱۷). به هر حال برای ادامه فعالیت بافت‌ها به‌خصوص برای تحرک اسپرم وجود ATP ضروری می‌باشد. در قطعه میانی سلول‌های اسپرمی، میتوکندری‌های فراوانی برای تأمین ATP اسپرم وجود دارد. بررسی‌های انجام شده مشخص کرده‌اند که اتفون قادر به ایجاد حالت‌های مختلف تراتوژنیک و موتاژنیک می‌باشد. در مطالعه حاضر، ویژگی‌های مورفولوژیکی جنین‌ها نشان داده‌اند که برخی علائم تراتوژنیکی؛ از جمله وجود چسبندگی ناحیه پس‌سری به عبارتی ناهنجاری کرانیوپاگوس در جنین‌های تازه متولد شده مشاهده شد. به علاوه، کاهش طول سری- نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه مصرف‌کننده دوز بالای اتفون آشکار شد. این کاهش احتمالاً به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو مرتبط باشد. با توجه به اثرات توکسیک اتفون در شرایط لقاح داخل آزمایشگاهی، تا کنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در زمینه تأثیرات اتفون بر موش آبستن پرداخته نشده است. از نتایج پارامترهای مورفولوژیکی جنین چنین می‌توان گفت که در گروه‌های دریافت‌کننده اتفون میزان هچ‌شدگی جنین، تعداد جنین، طول جنین و به‌طور کلی مورفولوژی آن در مقایسه با گروه کنترل کاهش نسبی نشان داده‌اند. هم‌سو با مطالعه حاضر، رائوف و همکاران (۲۰۱۱) بیان داشتند که اتفون با خاصیت سمّیت‌زایی و توانایی عبور از سد خونی- جفتی در دوران آبستنی موش سوری می‌تواند تأثیرات سوئی همانند تراتوژنیک، موتاژنیک و همچنین تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی بر جنین داشته باشد (۸). همچنین اظهار داشته‌اند که این تأثیرات سوء بر جنین احتمالاً در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد سمّی مرتبط بوده است. براساس مطالعات صورت گرفته گزارش شده است که سموم ارگانوفسفره باعث کاهش بیان ژن در بافت‌های مختلف بدن می‌شوند. با این حال در بررسی حاضر نیز مشخص شد که کاهشی در میزان بیان ژن کت اسپر۲ در اسپرم وجود دارد و به دنبال آن اسپرم، توانایی ظرفیت‌یابی خود را از دست می‌دهد و در نتیجه سبب کاهش قدرت باروری می‌گردد (۸، ۱۳). احتمال می‌رود این کاهش محسوس در اثر آزاد شدن رادیکال‌های سمّی و برخی اختلالات در ساختارهای کروموزومی پدیدار شوند. هم‌سو با این بررسی بابازاده و نجفی (۲۰۰۷) بیان داشتند که افزایشی در میزان آسیب DNA و مرگ‌ومیر سلول‌های اسپرمی و همچنین کاهشی در میزان قابلیت زنده‌مانی اسپرم متعاقب مصرف سم کلرپیریفوس در شرایط لقاح داخل آزمایشگاهی مشاهده شده است (۱۸).

همچنین اتفون توانست بیان ژن کت اسپر۲ در اسپرم را در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل کاهش دهد. این کاهش نشان‌دهنده کمرنگ شدن قدرت باروری می‌باشد. در همین راستا احتمال می‌رود جایابی نشدن پروتئین کت اسپر۲ در اسپرم گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل، مربوط به اختلالات کروموزومی و سمّیت رادیکال‌های آزاد باشد. ولی برای نتیجه‌گیری دقیق و قطعی، نیاز به مطالعات کمّی و کیفی بیشتری در این زمینه می‌باشد؛ از این رو پیشنهاد می‌شود در صورت امکان از مصرف این هورمون در کشاورزی اجتناب گردد یا حداقل طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با رعایت انتخاب دوز مناسب اقدام کنند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکترای تخصصی با ثبت پایان‌نامه به شماره ۱۱۲۸/پد/۳ در دانشکده دامپزشکی مورد موافقت قرار گرفته است.

References

[1]. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional and Global Trends in Infertility Prevalence since, A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. PLoS Med 2012;9(12):1-12.

[2]. Jahangirfard R, Najafi G, Shalizar Jalali A, Ahmadi A, Zadeh-hashem E. The Effect of Ethephon Investigation on Sperm Parameters and in Vitro Fertilizing Potential in Adult Male Mice. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2020;10(3):2545-2557.

[3]. Mokhtar HI, Abdel HA, Elmazoudy RH, Abdel wahab WM, Saad MI. Effect of methomylon fertility, embryotoxicit y and physiological parameters in female rats. J of App. Pharm. Sci. (JAPS).2013;3:109-119.

[4]. Zhang L, Li S, Liu X, Song C, Liu X. Effects of ethephon on physicochemical and quality properties of kiwifruit during ripening. Postharvest biology and technology. 2012;1;65:69-75.

[5]. Yazar S, Baydan E. The subchronic toxic effects of plant growth promoters in mice. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;55:17-21.

[6]. Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voesenek LACJ. The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. Trends in Plant Science. 2006;11:176-183.

[7]. Marsden E, Leroy M. Teratology studies in the mouse. In Teratogenicity Testing. Humana Press, Totowa, NJ. 2013;111-123.

[8]. Abdel raouf A, Girgis SM. Mutagenic, Teratogenic and biochemical effects of etephon on pregnant mice and their fetuses, Global Vet j. 2011;6(3):251-257.

[9]. Zaccaroni M, Della Seta D, Farabollini F, Fusani L, Dessi-Fulgheri F. Developmental Exposure to Very Low Levels of Ethynilestradiol Affects Anxiety in a Novelty Place Preference Test of Juvenile Rats. Neurotoxicological Research. 2016;30:553-562. PMID:27358038.

[10]. Bhadoria P, Nagar M, Bahrioke V, Bhadoria A. Effect of ethephon on the liver in albino rats: a histomorphometric study. Biomedical journal. 2015;1;38(5.(

[11]. Abou-Zeid SM, Allam T, El Bahrawy A, Mohamed A. Ameliorating effects of green tea on ethephon-induced immunotoxicity and oxidative stress in mice. Int J Pharm Sci & Scient Res. 2018; 4:1.

[12]. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature. 2001;413:603-609.

[13]. Mohammadi S, Movahedin M, Moula SJ. Effects of selenium on catsper expression in aged mouse testis. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2010;32(1):73-79 .

[14]. Nikpour P, Moula SJ, Movahedi M. Evaluation of catsper gene expression in mouse testis at different aged. 2002;119-125.

[15]. Seda B. Akinci, Nadir Ulu. Omer Z. Yondem, Pinar firat, M. Oguz Guc, Meral Kanbak, Ulku Aypar. Effect of neostigmine on organ injury in murine endotoxemia: Missing facts about the cholinergic Anti inflammatory Pathway. World J of Surgery 2005;29:1483-1489.

[16]. Nada HA, AL-Twaty, Saleha YM Alakilli. Genotoxic effect of an organophosphorus pesticide "Ethephon" on Somatic and Germ cells of male mice. Biosciences, Biotechnology Research Asia. 2008; 5(1):1-8.

[17]. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. CSHL press. 2001.

[18]. Babazadeh M, Najafi G. Effect of chlorpyrifos on sperm characteristics and testicular tissue changes in adult male rats. Vet Res Forum. 2017;8:319-326

Evaluation of CatSper 2 gene expression and embryonic morphological parameters in mice exposed to ethephon

Ramin jahangirfard[1], Gholamreza Najafi*[2], Ali Shalizar-jalali[3], Abbas Ahmadi[2] , Elham Zadeh-hashem[4]

1. PhD in Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor of Veterinary Anatomical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University, Urmia, Iran
3. Associate Professor of Comparative Histology, Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University, Urmia, Iran
4. Assistant Professor of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Introduction: Ethephon is a hormone used to accelerate the plant growth regulator processing. Mostly, after entering to the tissues, causing disturbance in reproductive system and subsequently decreased sperm fertility potential. The aim of this study was to investigate the effect of ethephon on embryonic morphological parameters and CatSper 2 protein localization in sperm.

Materials and Methods: In this experimental study, 78 males and females (NMRI Strain) mice randomly divided into experimental and control groups. The experimental groups received ethephon at doses of 120, 240 and 480 mg/kg as well as the positive-control group received neostigmine (0.1 mg/kg). After treatment, the animals were sacrificed and euthanized. Sperm samples were collected from cauda epididymis for qRT-PCR and immunohistochemically evaluation and stored at -70 ° C until examination.

Results: The results of morphological parameters showed that hatching percentage, viability, number and length of fetuses in experimental groups were lower than control group. There was also a decrease in the expression of CatSper 2 gene in the experimental groups compared to the control group. Sperm immunohistochemical results indicated that there was no localization for the CatSper 2 protein in the experimental groups versus the ones ($p<0.05$).

Conclusion: Ethephon by producing free radicals causes decreased embryonic morphological features. It also impairs fertility and reproduction by decreasing the expression of CatSper 2 gene and lack of protein localization in sperm.

Received: 2020/02/08
Accepted: 2020/05/25

Keywords: CatSper 2, Polymerase Chain Reaction, Sperm, Mice