

Investigating the E α and Cyclin D1 Gene Expression Levels, Changes in SOD, NO, and MDA Levels, and Histopathology of Mice Testicular Tissue Treated with AFG1

Toraj Zamir-nasta¹,
Seyran Kakebaraei²,
Mona Pazhouhi³,
Cyrus Jalili⁴

¹ PhD Student in Pathology, Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

² PhD Student in Anatomical Sciences, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³ PhD in Biochemistry, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Professor, Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received January 9, 2021 ; Accepted May 3, 2021)

Abstract

Background and purpose: Previous studies have shown the adverse effects of aflatoxin G1 on testicular tissue and the process of spermatogenesis. The aim of this study was to investigate changes in the expression of Cyclin D1, the estrogen receptor ER α and the levels of nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) in testicular tissue following exposure to AFG1.

Materials and methods: Twenty four mice were divided into four groups (n=6 per group); a control group (saline) and three treatment groups to receive AFG1 for 7, 15, and 28 days intraperitoneally. Histopathological changes caused by this toxin along with the expression of Cyclin D1 and ER α , as well as Nitric oxid (NO), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels in testicular tissue were measured.

Results: The expression of Cyclin D1 in testicular tissue in AFG1 receiving groups increased in a time-dependent manner and the expression of ER α decreased in testicular tissue in AFG1 receiving groups (P<0.05). Also, AFG1 decreased the level of SOD in testicular tissue in a time-dependent manner and increased the levels of MDA and NO. Atrophy of the seminiferous tubules and extensive intercellular edema were seen in treatment groups compared to the control group.

Conclusion: AFG1 disrupts the process of cell division by atrophy of spermatozoa tubules in testicular tissue. It also reduced the expression of ER α receptors and increased the expression of Cyclin D1 along with decreasing the level of SOD in testicular tissue and increased MDA and NO levels. These factors can cause disorders in the process of spermatogenesis.

Keywords: aflatoxin G1, spermatogenesis, ER α , Cyclin D1, oxidative stress, mice

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (198): 1-12 (Persian).

* **Corresponding Author:** Cyrus Jalili - Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran (E-mail: cjalili@yahoo.com)

بررسی بیان ژن های *Era*، *Cyclin D1*، تغییرات SOD، NO، MDA و ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت بیضه موش سوری در مواجهه با AFG1

تورج ضمیرنستا¹

سیران کاکه برایی²

مونا پژوهی³

سیروس جلیلی⁴

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات پیشین اثرات سوء آفاتوکسین (AFB1) B1 را بر روی بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز نشان داده‌اند. این مطالعه، با هدف بررسی تغییرات مربوط به بیان *Cyclin D1*، گیرنده استروژنی *Era* و سطح نیتریک اکساید (NO) به همراه سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و مالون دی آلدید (MDA) در بافت بیضه متعاقب مواجهه با AFG1، انجام پذیرفت. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، 24 سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی در چهار گروه کنترل و آزمایش (6 سر در هر گروه) تقسیم‌بندی شدند. گروه کنترل سالین، گروه‌های آزمایشی AFG1 را به مدت 7، 15 و 28 روز داخل صفاقی دریافت کردند. تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از این سم به همراه میزان بیان *Cyclin D1* و *Era*، همچنین سطح NO، SOD و MDA در بافت بیضه اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: AFG1 بیان *Cyclin D1* را در بافت بیضه به شکل وابسته به زمان افزایش، و بیان *Era* در بافت بیضه را کاهش ($P < 0/05$) داد. AFG1 به شکل وابسته به زمان سطح SOD را در بافت بیضه کاهش، سطح MDA و NO را افزایش و همچنین آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز و ادم بین سلولی وسیع در بافت بیضه گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل می‌شود. **استنتاج:** AFG1 با آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز در بافت بیضه، همچنین با کاهش بیان گیرنده‌های *Era* و افزایش بیان *Cyclin D1* به همراه کاهش سطح سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت بیضه و افزایش سطح مالون دی آلدید (MDA) و نیتریک اکساید (NO) تشدید آسیب‌ها را منجر شده که این عوامل می‌تواند سبب اختلال در روند اسپرماتوژنز گردد.

واژه‌های کلیدی: آفاتوکسین G1، اسپرماتوژنز، *Era*، *Cyclin D1*، استرس اکسیداتیو، موش

مقدمه

آفاتوکسین‌ها (AFs) ترکیبات هتروسایکلیک، شده هستند که به وسیله قارچ آسپرژیلوس فلاووس و دیفورانو کومارین (Difuranocoumarin) اکسیژن دار پارازیتیکوس تولید می‌شوند (1). تاکنون 17 نوع ترکیب

E-mail: cjalili@yahoo.com

مؤلف مسئول: سیروس جلیلی - کرمانشاه: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، پژوهشکده سلامت

1. دانشجوی دکتری پاتولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

2. دانشجوی دکتری علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

3. دکترای یوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

4. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: 1399/10/20 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/11/6 تاریخ تصویب: 1400/2/13

پ از آفلاتوکسین جداسازی شده است که چهار نوع، AFG2، AFG1، AFB2، AFB1 اصلی ترین آن‌ها می‌باشند (3,2). در میان انواع آفلاتوکسین‌ها نوع G1 بعد از (آفلاتوکسین B1) مهم ترین نوع بوده و به میزان بسیار زیادی در غلات و حبوبات رویت می‌گردد (5,4). گزارش شده است در شمال چین که بالاترین میزان بروز سرطان ریه و مری را دارا می‌باشد، AFG1 یکی از فراوان‌ترین منبع آلودگی در غلات و مواد غذایی این منطقه می‌باشد (6). در گزارش دیگر نشان داده شد که AFG1 با نقص در ارائه آنتی‌ژن و عدم شناسایی توسط لنفوسیت‌های T باعث پیدایش تومور می‌شود (7). بررسی‌های قبلی نشان دادند که آفلاتوکسین‌ها سبب کاهش تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها، کاهش تعداد سلول‌های لیدیک، ادم واضح در بافت بینابینی بیضه، کاهش تعداد اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها، کاهش میزان سرمی هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و در نهایت استرادیول می‌شود (9,8). همچنین AFB1 با افزایش آسیب وارده به DNA سبب اختلال در روند اسپرماتوزن و در پی آن کاهش تولید و کیفیت اسپرم می‌شود (10). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که باعث محافظت در برابر آسیب سلولی ناشی از مولکول‌هایی به نام رادیکال‌های آزاد می‌شوند. این مواد در دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی دسته‌بندی می‌گردند گروه آنزیمی شامل، (SOD)، یکی از انواع مهم سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان است و تقریباً در تمامی سلول‌هایی که در معرض اکسیژن قرار دارند، وجود دارد که با مقاومت نسبت به اختلالات رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در محافظت از غشا سلولی ایفا می‌کند (11). رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها و یا مولکول‌هایی با الکترون‌های منفرد و قدرت واکنشگری بسیار بالا بوده که با گردش مداوم در بدن، موجب آسیب به ماکرومولکول‌های مختلف بدن جانداران و تغییرات ساختاری شدید و تغییرات عملکردی اندامک‌های سلولی می‌شود و زمینه ساز بیماری‌های مختلفی می‌شود (13,12). نیتریک اکسید (NO) یک رادیکال آزاد بوده و عملکردهای بیولوژیک

متعددی در پروسه‌های فیزیولوژیکی، پاتولوژیکی و در پاتوفیزیولوژی عروق بازی می‌نماید (14). استرس اکسیداتیو در محیط سلولی منجر به تشکیل لیپید پراکسیدهای ناپایدار و واکنشگر می‌شود. تجزیه پراکسیدهای ناپایدار و مشتق شده از اسیدهای چرب غیر اشباع منجر به تشکیل مالون دی‌آلدئید می‌شود (15).

گیرنده‌های $ER\alpha$ جزو زیر خانواده گیرنده‌های استروئیدی هستند که بر روی هسته قرار دارند و استروژن β 17- به عنوان مناسب ترین لیگاند این گیرنده‌ها به حساب می‌رود (16). این گیرنده‌ها در غیاب ترکیبات استروژنیک به فرم غیر فعال دیده می‌شود و در صورت اتصال لیگاند به این گیرنده‌ها فرایند همودیمریزه شدن در آن‌ها ایجاد می‌شود که در نهایت از چاپرون‌های خود جدا شده و بر روی DNA ژنوم سلول هدف بیان ژن مشخصی را القاء می‌نمایند. گیرنده‌های استروژن به طور اولیه در سلول‌های رحم، واژن، پستان و مغز وجود دارند و به دو نوع آلفا و بتا تقسیم می‌شوند که نوع آلفا در تمام بافت‌های پاسخ دهنده به استروژن وجود دارد، اما گیرنده بتا در بافت‌های محدودتری یافت می‌شوند (17). قابل ذکر است که بافت بیضه نیز واجد گیرنده‌های $ER\alpha$ می‌باشد و ترکیبات استروژنی در سطح وسیعی می‌توانند عملکرد، سنتز و یا حتی ساختار این گیرنده‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (18). در مطالعات، ارتباط بین سرطان و جهش در این گیرنده‌ها نشان داده شده است (19، 20). به طور کلی تنظیم چرخه سلولی در تقسیم سلولی عمدتاً بر عهده پروتئین‌های Cyclin می‌باشد که در این میان بیان ژن‌های مربوط به $Cyclin D1$ و $Cyclin E1$ از جمله مهم ترین عوامل می‌باشد و که با استروژن و ترکیبات شبه استروژن می‌توانند وارد واکنش شوند (21). عمدتاً Cyclin‌ها به کمک کینازهای (CDK) مرتبط با خود، فعالیت‌های خود را به انجام می‌رسانند. افزایش میزان بیان پروتئین $Cyclin D1$ باعث کوتاه شدن فاز G1 می‌شود و اختلال تنظیم بیان این مولکول در مراحل اولیه

سیکل سلولی اتفاقی است که در حین تومور زدایی رخ می دهد (22). این نکته به خوبی مشخص گردیده است که پروتئین های *Cyclin D1* به عنوان مهم ترین پروتئین های هدف برای کمپلکس استروژن گیرنده *ERα* به حساب می روند (23، 24). در حقیقت مطالعات پیشین نشان داده اند که آفلاتوکسین B1 با تاثیر بر روی محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی باعث اختلال در دستگاه آندوکرینی بافت بیضه می شود (25، 26). از آن جا که *AFG1* بعد از نوع B1 جز سمی ترین آفلاتوکسین ها محسوب می شود و اثر سمیت آن بر بافت بیضه به طور کلی و همراه با دیگر نوع های آن گزارش گردیده است، اینک این نکته در هاله ای از ابهام باقی می ماند که آیا تغییر در بیان تنظیم کننده های چرخه سلولی می تواند در روند تقسیم سلولی سلول های ژرمینال تاثیر بگذارد؟ بنابراین ارزیابی گیرنده های استروژنی به عنوان راه اندازه های بیان *Cyclin* ها در بافت بیضه، تغییرات مربوط به بیان *cyclin D1* در بافت بیضه و برقراری ارتباط بین این ژن با گیرنده های استروژنی و همچنین ارزیابی سطح نیتریک اکساید (NO)، مالون دی آلدید (MDA) و سوپراکسید دیس موتاز (SOD) در بافت بیضه و همچنین تغییرات هیستوپاتولوژی ناشی از *AFG1* امری است که در این میان می تواند مورد توجه قرار گیرد. ارزیابی میزان بیان ژن *cyclin D1* به روش Reverse transcription (RT-PCR) انجام گرفت.

مواد و روش ها

حیوانات و تیمار

در این مطالعه تجربی، 24 قطعه موش سوری نر بالغ (با میانگین وزنی 20 ± 2 گرم) انتخاب شدند. شرایط استاندارد (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 50 ± 10 درصد) جهت نگهداری تمام موش ها رعایت گردید. در ادامه گروه بندی تصادفی آن ها در 4 گروه 6 تایی

انجام پذیرفت. گروه کنترل، 0/2 میلی گرم روغن ذرت و گروه های آزمایشی *AFG1* را (به میزان 20 میکروگرم بر کیلوگرم) به ترتیب 15، 7 و 28 روز به شکل داخل صفاقی دریافت کردند (24). بدین ترتیب که قبل از تزریق سم، *AFG1* (NO: 1162-39-5 Sigma, USA, Cas) در روغن ذرت و اتانول (95:5 v/v) حل شد. متعاقباً در روزهای 15، 7 و 28، نمونه برداری از بافت بیضه جهت مطالعات هیستوپاتولوژی و اندازه گیری سطح نیتریک اکساید (NO)، مالون دی آلدید (MDA) و سوپراکسید دیس موتاز (SOD) با استفاده از الایزا صورت گرفت.

بررسی های آسیب شناسی

نمونه های بافت بیضه برداشته و بررسی های هیستوپاتولوژیک صورت گرفت. جهت این کار پاساژ بافتی در الکل های مختلف صعودی (80، 70 و 90 درصد) و دو تعویض در الکل های مطلق انجام، و نمونه ها جهت قالب گیری به پارافین مذاب آغشته و در ادامه قالب گیری شدند. با استفاده از میکروتوم دوار (مدل MICROM. Germany, Serial: 21074) قالب های پارافینی با ضخامت 5 میکرومتر فراهم گردید و به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین تغییرات هیستوپاتولوژیک بررسی گردید.

سنجش NO

از روش میکروپلیت که بر پایه سنجش Griess است، جهت ارزیابی NO استفاده گردید. در این راستا نمونه بافتی لیز شده و مایع رویی (400 میکرولیتر) توسط 6 میلی گرم سولفات روی تحت شرایط سانتریفیوژ پروتئین زدایی گردید. محلول حاصل با 100 میکرولیتر کلرید وانادیوم، 50 میکرولیتر (N-1)-نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید و 50 میکرولیتر سولفونامید مخلوط گردید. از نیتريت سدیم 0/1 مولار برای منحنی استاندارد استفاده شد که بدین منظور غلظت های افزایشی از سدیم نیتريت (5، 10، 25، 50، 75 و 100 میکرومولار)

تهیه گردید. به همه میکروپلیت‌های حاوی نیتريت سدیم و مایع رویی، محلول Greiss افزوده شد. نتایج از طریق روش الایزا (Stat Fax 100 میامی، فلوریدا، ایالات متحده آمریکا) در طول موج 540 نانومتر انجام پذیرفت.

سنجش MDA

سطح MDA که به عنوان نشانگر پراکسیداسیون لیپید مطرح است مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین جهت با استفاده از بافر همگن حاوی 5/55 درصد محلول KCl، استانداردسازی نمونه‌ها انجام شد و در ادامه نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه با دور 1500 سانتریفیوژ شدند. سپس نمونه‌های همگن شده به مخلوط واکنشی حاوی سدیم دودسیل سولفات، استیک اسید (pH 4.5) و اسید تیوباربتوریک اضافه شدند. جوشاندن مخلوط به مدت 30 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی‌گراد انجام و میزان جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 450 نانومتر سنجیده شد.

سنجش SOD

به منظور ارزیابی استرس اکسیداز، مطابق با پروتکل کیت سنجش SOD (مهندسی زیستی، نانچینگ (Jiancheng)، بیضه با استفاده از بافر لیز (حاوی 1mM Na₂EDTA، 10mM PMSF، 150mM NaCl، 10 میلی‌متر Tris، 1 میلی‌گرم آپروتین) همگن شد. سنجش میزان فعالیت SOD مایع رویی با تعیین کاهش نیتروبلو ترازولیوم (NBT) به‌دنبال تولید O₂- از سیستم گزانتین-گزانتینوکسیاز میسر گردید. یک واحد SOD تحت عنوان مقدار پروتئینی که کاهش NBT را به میزان 50 درصد مهار می‌کند، تعریف شد. نتایج به‌صورت U/mg پروتئین نشان داده شد.

روش Reverse transcription PCR (RT-PCR)

برای ارزیابی میزان تغییرات در بیان گیرنده‌های استروژن و Cyclin D1، mRNA به روش استاندارد TRIZOL جداسازی شد (27). برای جلوگیری از آلودگی

ژنوم مراقبت بیش‌تری بعد از استخراج کلروفرم در فاز آب‌دار کم‌رنگ انجام گرفت. میزان RNA توسط اسپکتروفتومتر (260nm, A_{260/280}=1.8-2.0) تعیین گشت و نمونه در 70- درجه سانتی‌گراد برای RT-PCR ذخیره گردید. cDNA در 20 μl ترکیب آزمایشی و طبق پروتکل شرکت تولیدکننده مخلوط شدند (Fermentas, GmbH, Germany). پروتکل دمایی برای 20 μl ترکیب آزمایشی 50 دقیقه در 65 °C و به دنبال آن 60 دقیقه در 42 °C و 5 دقیقه در 70 °C بود. واکنش RT-PCR در حجمی از 25 μl مستر میکس (FWD، RVE، 12.5 μl) پرایمر ویژه (هر 75 μl درصد) و cDNA (1 μl) و آب بدون نوکلئاز (10 μl) انجام گرفت. به مدت 3 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به عنوان یک سیکل و 40 سیکل هر کدام به مدت 20 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، برای annealing به مدت 45 ثانیه بود (دمای 65 و 58 درجه برای GAPDH و دمای 55 و 57 درجه به‌ترتیب برای ژن‌های Cyclin D1 و ERα). عمل افزایش طول برای 1 دقیقه در دمای 72 °C و 5 دقیقه در دمای 72 °C انجام گرفت. ژل آگاروز 1/5 درصد محتوی اتیدیوم بروماید قالب‌گیری شد و متعاقباً محصولات RT-PCR در چاهک‌های مربوطه تزریق شد و با استفاده از سیستم ژل (bio-RAD) 2000 مشاهده گردید و پرایمرهای اختصاصی توسط (Tehran, Iran) CinnaGen Co تولید گردید. جفت پرایمر برای RT-PCR در جدول شماره 1 نمایش داده شده است. برای ژن Cyclin D1 از (1) GAPDH و برای ژن ERα از (2) GAPDH به عنوان کنترل استفاده گردید. آنالیزها با نرم‌افزار Image pro- insight software انجام شد. داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 مورد ارزیابی آماری قرار گرفت و نتایج حاصل به صورت Mean±SD بیان گردید. برای مقایسه‌ی بین گروه‌ها آنالیز واریانس ANOVA یک طرفه، تست Bonferroni به منظور مقایسه آماری داده‌های کمی بین گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل استفاده گردید.

مقدار ($P < 0/05$) برای تعیین سطح معنی داری بین گروهی در نظر گرفته شد.

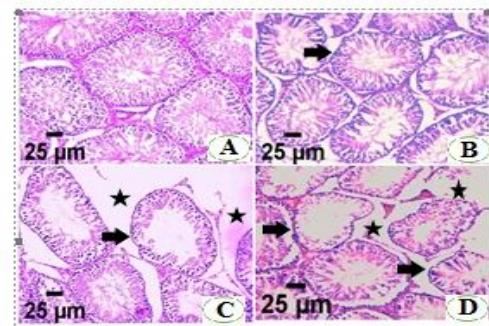
جدول شماره 1: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Anti-Sense 5'-3'	Sense 5'-3'	Primer
GGGGCCAGGTTCCACTTGAGC	CTGACACCAATCTCCTCAACGAC	Cyclin D1 409bp
CACACGGCACAGTAGCGAG	CCTCCCGCTTCTACAGGT	ERα 128bp
GTCAGATCCACGACGGACACA	AGAACATCATCCCTGTCATCCAC	GAPDH 127 bp(1)
TCCGGTTGATGACAAAGCTTCC	GAGAGTGTTTCTCGTCCCG	236 bp(2)

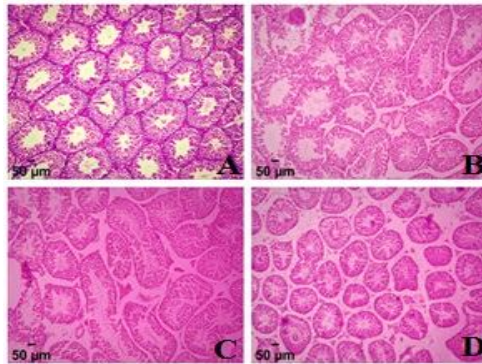
یافته ها

بررسی بافت شناسی بافت بیضه

بررسی های بافت شناسی نشان دادند که AFG1 به صورت وابسته به زمان، موجب کاهش تعداد لایه های سلول های زایا، ریزش سلولی به همراه ایست اسپرماتوژنزی، آتروفی لوله های اسپرم ساز به همراه ادم بین سلولی گردید که میزان آتروفی لوله ها به شکل قابل ملاحظه ای در گروه 28 روزه دیده شد. بدین ترتیب که موش های گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 28 روز، در مقایسه با سایر گروه ها، درصد بیش تری از لوله های اسپرم ساز آتروفیک را نشان می دادند (تصاویر شماره 1 و 2).



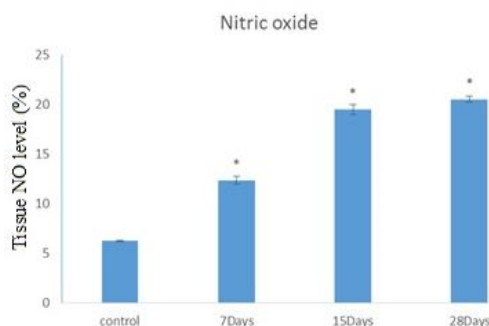
تصویر شماره 1: برش عرضی از بافت بیضه، (A) گروه کنترل، (B) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 7 روز، (C) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 15 روز و (D) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 28 روز. با گذشت زمان موجب کاهش تعداد لایه های سلول های زایا (C) ریزش سلولی به همراه ایست اسپرماتوژنزی (D) گردیده است. در گروه کنترل لوله های سمنی فر روند اسپرماتوژنز نرمال و در گروه 15 و 28 روزه روند اسپرماتوژنز مختل (پیکان مشکی) همراه با ادم بینابینی وسیع (ستاره مشکی) دیده می شود. رنگ آمیزی H&E، 40x



تصویر شماره 2: برش عرضی از بافت بیضه، (A) گروه کنترل، (B) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 7 روز، (C) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 15 روز و (D) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب 28 روز. به صورت وابسته به دز باعث آتروفی لوله های اسپرم ساز گردید که میزان آتروفی لوله ها همراه با ادم بین سلولی به شکل قابل ملاحظه ای در گروه 28 روزه دیده شد (D) گردیده است. رنگ آمیزی H&E، 10x

تغییرات NO

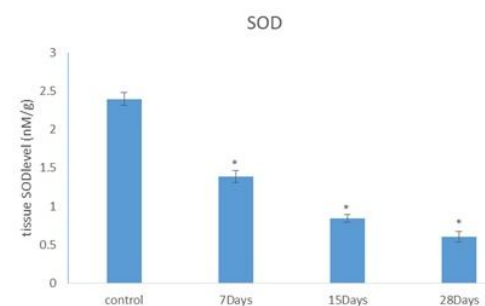
سطح بافتی NO با گذشت زمان در گروه های دریافت کننده AFG1 (7، 15، 28) از نظر آماری افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($P < 0/05$) (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 3: درصد تغییرات نیتریک اکساید (NO) در گروه های مختلف. تمامی داده ها بر اساس $Mean \pm SD$ بیان شده اند. (*) نشانگر معنی دار بودن سطح NO در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل می باشد ($P < 0/05$). گروه کنترل، (7 Days) AFG1 7: روز متعاقب دریافت AFG1، (15 Days) AFG1 15: روز متعاقب دریافت AFG1، (28 Days) AFG1 28: روز متعاقب دریافت AFG1.

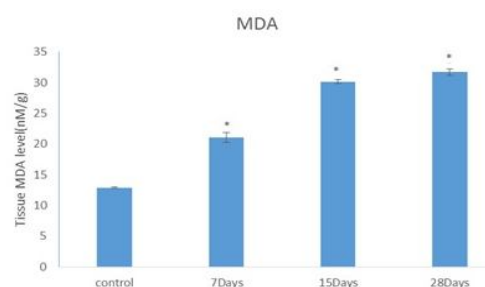
تغییرات SOD و MDA

سطح بافتی SOD با گذشت زمان در گروه های دریافت کننده AFG1 (7، 15، 28) از نظر آماری کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($P<0/05$) (تصویر شماره 4).



تصویر شماره 4: درصد تغییرات سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گروه های مختلف. تمامی داده ها بر اساس $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شده اند. (*) نشانگر معنی دار بودن سطح SOD در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل می باشد ($P<0/05$). گروه کنترل، AFG1 (7 Days) 7 روز متعاقب دریافت AFG1 (15 Days) 15 روز متعاقب دریافت AFG1 (28 Days) 28 روز متعاقب دریافت AFG1.

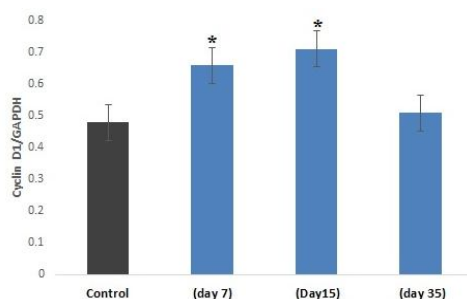
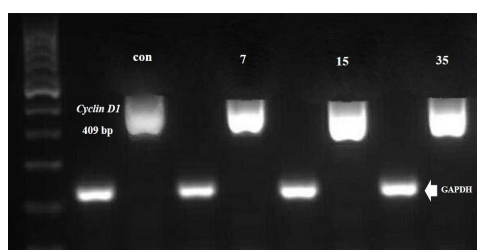
سطح بافتی MDA با گذشت زمان در گروه های دریافت کننده AFG1 (7، 15، 28) از نظر آماری افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($P<0/05$) (تصویر شماره 5).



تصویر شماره 5: درصد تغییرات مالون دیآلدئید (MDA) در گروه های مختلف. تمامی داده ها بر اساس $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شده اند. (*) نشانگر معنی دار بودن سطح MDA در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل می باشد ($P<0/05$). گروه کنترل، AFG1 (7 Days) 7 روز متعاقب دریافت AFG1 (15 Days) 15 روز متعاقب دریافت AFG1 (28 Days) 28 روز متعاقب دریافت AFG1.

AFG1 میزان بیان Cyclin D1 را افزایش داد

مشاهدات نشان دادند که میزان بیان Cyclin D1 بالاخص در رده سلول های اسپرماتوسیتوژنز و اسپرماتوژنز در گروه هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند، در مقایسه با گروه کنترل، افزایش غیرقابل توجهی در گروه 7 و 28 و در سطح قابل ملاحظه ای در گروه 15 روزه ($P<0/05$) افزایش یافته بود. بدین ترتیب که بیش ترین میزان بیان Cyclin D1 در موش هایی که AFG1 را به مدت 15 روز دریافت کرده بودند دیده شد (تصویر شماره 6).

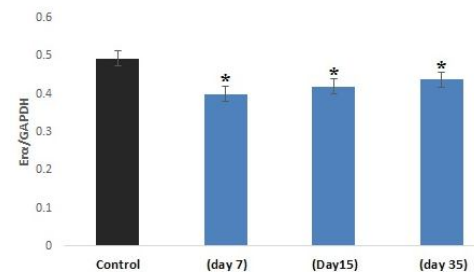


تصویر شماره 6: الکتروفورز و نمودار ارزیابی نیمه کمی میزان بیان Cyclin D1 بر اساس GAPDH در گروه های مختلف. تمامی داده ها بر اساس $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شده اند. (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند ($P<0/05$). Con: گروه کنترل، AFG1 (7 Days) 7 روز متعاقب دریافت AFG1 (15 Days) 15 روز متعاقب دریافت AFG1 (28 Days) 28 روز متعاقب دریافت AFG1.

AFG1 میزان بیان Era را کاهش داد

مشاهدات نشان دادند که میزان بیان Era، با گذشت زمان در گروه های دریافت کننده AFG1 نسبت به گروه کنترل در سطح معنی داری ($P<0/05$) کاهش یافته است. میزان بیان Era در موش های گروه 28 روزه که AFG1 را دریافت نموده بودند در مقایسه با گروه

کنترل در سطح معنی داری ($P < 0/05$) کاهش نشان نداد. همچنین مقایسه آماری بین گروه‌های دریافت کننده AFG1 هیچ تفاوت معنی داری را بین گروه‌ها نشان نداد (تصویر شماره 7).



تصویر شماره 7: Error! No text of specified style in document. الکتروفورز و نمودار ارزیابی نیمه کمی میزان بیان *ERα* در گروه های مختلف براساس GAPDH، تمامی داده ها بر اساس $Mean \pm SD$ بیان شده اند. (*)، نشان دهنده اختلاف معنی دار هستند ($P < 0/05$)، con: گروه کنترل، AFG1 (7 Days) 7: روز متعاقب دریافت AFG1، AFG1 (15 Days) 15: روز متعاقب دریافت AFG1 (28 Days) 28: روز متعاقب دریافت AFG1

بحث

در مطالعه حاضر مشخص گردید که تجویز AFG1 در موش‌های گروه آزمایشی، به شکل وابسته به زمان باعث آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز و ادم بین سلولی وسیع در موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند نسبت به گروه کنترل می‌شود. در حقیقت مطالعات اخیر نشان دادند که AFB1 در سطح وسیعی می‌تواند برای بافت بیضه آسیب رسان باشد (28). در مطالعه‌ای نشان داده شد، تجویز AFB1 در سطح قابل ملاحظه‌ای با آسیب در DNA

اسپرم میزان تحرک، بلوغ هسته‌ای، تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد (29). در مطالعات قبلی نشان داده شد که AFB1 و AFG1 به شکل وابسته به زمان منجر به آسیب بافتی، به ویژه در رده سلول‌های زایا می‌گردد، به طوری که درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضرایب تمایزی، جایگزینی لوله‌ای و اسپرمیوزن منفی در موش‌های دریافت کننده AFB1 افزایش و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال به طور معنی داری کاهش یافته است (24، 30). در مطالعه حاضر مشخص گردید که تجویز AFG1 در موش‌های گروه آزمایشی به شکل وابسته به زمان، سطح بافتی NO و MDA را در روزهای (7، 15، 28) نسبت به گروه کنترل افزایش و میزان سطح SOD را در گروه‌های آزمایشی (7، 15، 28) نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد که این امر در تشدید آسیب‌ها و اختلال در روند طبیعی اسپرم‌زایی در موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند موثر است، زیرا در مطالعه‌ای نشان داده شد که مواد توکسیک بر عملکرد بیضه موش‌های صحرایی نر بالغ تأثیر می‌گذارد و این اثرات ممکن است از طریق تولید بیش از حد NO، MDA و از استرس اکسیداتیو ناشی از این مواد باشد (31). به علاوه در مطالعات قبلی نشان داده شد که مواد توکسیک باعث افزایش سطح نیتریک اکسید و MDA و کاهش سطح SOD می‌شوند (32). همچنین در مطالعه دیگر بیان گردید، AFB1 باعث افزایش سطح اکسید نیتریک و مالون دی‌آلدئید و کاهش سطح سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (33). در مطالعه حاضر میزان بیان *Era* در بافت بیضه موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند در سطح قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است، بنابراین این گونه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سطح عملکردی مربوط به گیرنده *ERα* در سلول‌ها متعاقب مواجهه با AFG1 کاهش پیدا کرده است. از آن‌جا که تنظیم مکانیسم استروئیدوژن در سلول‌های لیدینگ بیضه توسط ترکیبات استروژنی و *ERα* می‌باشد، ترکیبات استروژنی در سطح وسیعی می‌توانند عملکرد، سنتز و یا

که کاهش میزان بیان *Cyclin D1* می تواند روند گذر سلول ها در حال تقسیم از مراحل مختلف چرخه سلولی را دچار نقصان نماید و نیز بیان بیش از اندازه *Cyclin D1* قادر است راه اندازهای آپوپتوزی را نیز فعال سازد. آتروفی لوله های اسپرم ساز در گروه های آزمایشی نسبت به گروه کنترل این نکته را به خوبی به اثبات می رساند. در مطالعه حاضر AFG1 به شکل وابسته به زمان با کاهش ستر گیرنده های *ERα* و افزایش بیان *Cyclin D1* روند تقسیم سلولی را دچار اختلال نموده که این امر به نوبه خود می تواند سبب اختلال در روند اسپرماتوژنز گردد. همچنین تغییرات سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، نیتریک اکساید (NO)، مالون دی آلدئید (MDA) ناشی از AFG1 می تواند در بروز آسیب ها در بافت بیضه کمک کند. آتروفی لوله های اسپرم ساز و ادم بین سلولی در بافت بیضه این نکته را به خوبی به اثبات می رساند.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه در راستای طرح 96068 و بخش های آزمایشگاهی سازمان مربوطه کمال تشکر را دارم.

حتی ساختار این گیرنده ها را تحت تاثیر قرار دهند (35,34). در مطالعات مختلف هم نشان داده شد که کاهش در میزان بیان استروژن می تواند میزان بیان گیرنده های استروژنی را دچار اختلال نموده و در نتیجه با کاهش کیفیت اسپرم و اختلال در سیستم آندوکروینی بافت بیضه باعث کاهش راندمان تولید مثلی شود (36,18). در مطالعه حاضر میزان بیان *Cyclin D1* در بافت بیضه موش های در معرض AFG1 با گذشت زمان نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. این خود می تواند نمایانگر نقش دوگانه آن در تکثیر و آپوپتوز باشد و نقش این ژن را در تنظیم تقسیم سلولی پر اهمیت نشان دهد، زیرا مطالعات پیشین ابراز داشتند که میزان بیان *Cyclin D1* در سطح بسیار گسترده ای به میزان استروژن و حضور گیرنده های استروژنی ارتباط دارد. بدین ترتیب که تجویز هر نوع از آنتاگونیست های استروژنی در سطح قابل توجهی می تواند بیان *Cyclin D1* را کاهش دهد (38,37). از سویی به موازات افزایش میزان بیان *Cyclin D1*، آسیب ناشی در سطح DNA و در نتیجه اختلال در مکانیسم طبیعی بافت بیضه دیده شد، این بیان متناقض *Cyclin D1* نشانگر نقش دوگانه آن در تکثیر و آپوپتوز است (40,39). برای درک بهتر این موضوع می بایستی به این نکته توجه کرد

References

1. Faridha A, Faisal K, Akbarsha MA. Aflatoxin treatment brings about generation of multinucleate giant spermatids (symplasts) through opening of cytoplasmic bridges: light and transmission electron microscopic study in Swiss mouse. *Reprod Toxicol* 2007; 24(3-4): 403-408.
2. Moeinian K, Yaghmaeian K, Ghorbani R. Aflatoxin M1 concentration in raw milk produced in the cities of Semnan province- Iran. *Koomesh* 2014(2): 176-181.
3. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(5): 1106-1122.
4. Khan MR, Alothman ZA, Ghfar AA, Wabaidur SM. Analysis of aflatoxins in nonalcoholic beer using liquid-liquid extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *J Sep Sci* 2013; 36(3): 572-577.
5. Tan L, He R, Chen K, Peng R, Huang C, Yang R, et al. Ultra-high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry for determination of aflatoxins

- using dummy molecularly imprinted polymers deposited on silica-coated magnetic nanoparticles. *Microchim Acta* 2016; 183(4): 1469-1477.
6. Xue KS, Tang L, Sun G, Wang S, Hu X, Wang J-S. Mycotoxin exposure is associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma in Huaian area, China. *BMC Cancer* 2019; 19(1): 1-10.
7. Li Z, Cui J, Zhang X, Kang W. Aflatoxin G1 reduces the molecular expression of HLA-I, TAP-1 and LMP-2 of adult esophageal epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett* 2010; 195(2-3): 169-173.
8. Murad AF, Ahmed S, Abead S. Toxicity effect of aflatoxin B1 on reproductive system of albino male rats. *Pak J Biol Sci* 2015; 18(3): 107-114.
9. Supriya C, Girish B, Reddy PS. Aflatoxin B1-induced reproductive toxicity in male rats: possible mechanism of action. *Int J Toxicol* 2014; 33(3): 155-161.
10. Zamir Nasta T, Razi M, Hassanzadeh S, Malekinejad H. Effect of Aflatoxin B1 on Histomorphometric Parameters of Testis in Male Mature Albino Mouse. *Qom Univ Medical Sci J* 2017; 11(1): 10-17 (Persian).
11. Yüksel S, Yiğit AA. Malondialdehyde and nitric oxide levels and catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels in maternal blood during different trimesters of pregnancy and in the cord blood of newborns. *Turk J Med Sci* 2015; 45(2): 454-459.
12. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 2015; 30(1): 11-26.
13. García JJ, López Pingarrón L, Almeida Souza P, Tres A, Escudero P, García Gil FA, et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res* 2014; 56(3): 225-237.
14. Costa TJ, Barros PR, Arce C, Santos JD, da Silva-Neto J, Egea G, et al. The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2020; 162: 615-635.
15. Ma L, Liu G, Liu X. Amounts of malondialdehyde do not accurately represent the real oxidative level of all vegetable oils: a kinetic study of malondialdehyde formation. *J Food Sci Technol* 2019; 54(2): 412-423.
16. Giovannelli P, Di Donato M, Galasso G, Di Zazzo E, Bilancio A, Migliaccio A. The androgen receptor in breast cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 492.
17. Silvestri S, Thomsen AB, Gozzini A, Bagger Y, Christiansen C, Brandi M. Estrogen Receptor A And B Polymorphism: Is There Any An Association With Bone Mineral Density, Plasma Lipids, & Response To Postmenopausal Hormone Therapy? *Menopause* 2006; 13(3): 451-461.
18. Adibnia E, Razi M, Malekinejad H. Zearalenone and 17 β -estradiol induced damages in male rats reproduction potential; evidence for ER α and ER β receptors expression and steroidogenesis. *Toxicol* 2016; 120: 133-146.
19. Tang W, Liu R, Yan Y, Pan X, Wang M, Han X, et al. Expression of estrogen receptors and androgen receptor and their clinical significance in gastric cancer. *Oncotarget* 2017; 8(25): 40765-40777.
20. Di Zazzo E, Galasso G, Giovannelli P, Di Donato M, Di Santi A, Cernera G, et al. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors. *Oncotarget* 2016; 7(1): 193-208.

21. Ioachim E, Michael M, Stavropoulos N, Kitsiou E, Hastazeris K, Salmas M, et al. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21 (Waf1/Cip1) and p27 (Kip1) in urothelial carcinoma: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Urol Int* 2004; 73(1): 65-73.
22. Pakuła M, Mały E, Uruski P, Witucka A, Bogucka M, Jaroszevska N, et al. Deciphering the Molecular Mechanism of Spontaneous Senescence in Primary Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Cancers* 2020; 12(2): 296.
23. Zheng L, Meng X, Li X, Zhang Y, Li C, Xiang C, et al. miR 125a 3p inhibits ER α transactivation and overrides tamoxifen resistance by targeting CDK3 in estrogen receptor-positive breast cancer. *FASEB J* 2018; 32(2): 588-600.
24. Zamir-Nasta T, Razi M, Shapour H, Malekinejad H. Roles of p21, p53, cyclin D1, CDK-4, estrogen receptor α in aflatoxin B1-induced cytotoxicity in testicular tissue of mice. *Environ Toxicol* 2018; 33(4): 385-395.
25. Hasanzadeh S, Rezazadeh L. Effects of aflatoxin B 1 on the growth processes of spermatogenic cell series in adult male rats. *Comp Clin Pathol* 2013; 22(4): 555-562.
26. Owumi SE, Adedara IA, Akomolafe AP, Farombi EO, Oyeler AK. Gallic acid enhances reproductive function by modulating oxidoinflammatory and apoptosis mediators in rats exposed to aflatoxin-B1. *Exp Biol Med* (Maywood) 2020; 245(12): 1016-1028.
27. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction :twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 581-585.
28. Zhou H, Wang J, Ma L, Chen L, Guo T, Zhang Y, et al. Oxidative DNA damage and multi-organ pathologies in male mice subchronically treated with aflatoxin B1. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019; 186: 109697.
29. Komsky-Elbaz A, Kalo D, Roth Z. Effect of aflatoxin B1 on bovine spermatozoa's proteome and embryo's transcriptome. *Reproduction* 2020; 160(5): 709-723.
30. Jalili C, Zamir-Nasta T, Ghahari L, Baraei S. Relationship between synthesis of P21 and cyclin D1 proteins and histomorphometric parameters of mice testicular tissue in presence of aflatoxin G1. *Koomesh* 2019; 21(1): 195-200.
31. Ahmed MA, Kurkar A. Effects of opioid (tramadol) treatment on testicular functions in adult male rats: The role of nitric oxide and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014; 41(4): 317-323.
32. Mehrzadi S, Fatemi I, Esmaeilzadeh M, Ghaznavi H, Kalantar H, Goudarzi M. Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 97: 233-239.
33. Ajiboye TO, Yakubu MT, Oladiji AT. Lophirone B and C prevent aflatoxin B1-induced oxidative stress and DNA fragmentation in rat hepatocytes. *Pharm Biol* 2016; 54(10): 1962-1970.
34. Lee SY, Park E, Kim SC, Ahn RS, Ko C, Lee K. ER α /E2 signaling suppresses the expression of steroidogenic enzyme genes via cross-talk with orphan nuclear receptor Nur77 in the testes. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 362(1-2): 91-103.
35. Hess R, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod (AR)* 2018; 1(1): 5-30.

36. Fayjaloun S, Nassar M, Sahakian J, Aad PY. Updates on the effect of mycotoxins on male reproductive efficiency in mammals. *Toxins* 2019; 11(9): 515.
37. De Amicis F, Chiodo C, Morelli C, Casaburi I, Marsico S, Bruno R, et al. AIB1 sequestration by androgen receptor inhibits estrogen-dependent cyclin D1 expression in breast cancer cells. *BMC cancer* 2019; 19(1): 1-11.
38. Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, Rivas MA, Cutts RJ, Garcia-Murillas I, Pearson A, Guzman M, Rodriguez O, Grueso J, Bellet M. Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res* 2016; 76(8): 2301-2313.
39. Bohnsack BL, Hirschi KK. Nutrient regulation of cell cycle progression. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 433-453.
40. Amin M, Razi M, Sarrafzadeh Rezaei F, Shalazar Jalali A, Najafi G. Berberine inhibits experimental varicocele induced cell cycle arrest via regulating cyclin D1, cdk4 and p21 proteins expression in rat testicles. *Andrologia* 2018; 50(4): e12984.