مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۵، مرداد ۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۲)

بیان ژن کاسپاز-۹ در بافت بیضه موش صحرایی نژاد SD تحت تأثیر قارچ کش پروپیکونازول و اثرات حفاظتی سلنیوم

سمیرا رشیدی پویا[۱] ، هما محسنی کوچصفهانی[۱*]، سید عبدالحمید انگجی[۲]

[۱]گروه علوم جانوری ، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران ، [۲]گروه علوم سلولی مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: کونازول‌ها شامل تری‌آزول‌ها یا ایمیدیازول‌ها عوامل ضد قارچی هستند که برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها و برای درمان عفونت‌های قارچی استفاده می‌شوند. پروپیکونازول نیز که در دسته کونازول‌ها قراردارد یک قارچ کش سیستمیک است که به طور گسترده‌ای در ایران و سایر کشورها جهت سم‌زدایی دانه‌های غلات به خصوص برنج استفاده می‌شود. این قارچ‌کش از طریق مهار یک سیتوکروم خاص P450، CYP 51 (Lanosterol – 14α- demethylase) عمل می‌کند که یک مرحله اصلی در بیوسنتز آرگوسترول، یک استروئید مورد نیاز برای شکل گیری دیواره سلولی قارچ‌ها است، لذا در تحقیق تجربی حاضر اثر قارچ کش پروپیکونازول بر بیان ژن کاسپاز ۹ به عنوان آغازگر فرآیند آپوپتوز و اثرحفاظتی احتمالی سلنیوم مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۰ رت نژاد اسپراگ داولی به ۱۰ گروه ۴ تایی تقسیم شدند. این گروه‌ها عبارتند از؛ کنترل، شم۱ (حلال پروپیکونازول: آب مقطر)، شم۲ (حلال سلنیوم: نرمال سالین)،۱ گروه دریافت کننده ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلنیوم ، ۳ گروه دریافت کننده پروپیکونازول در سه دوز ۱۰ ، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ گروه دریافت کننده پروپیکونازول در سه دوز ۱۰ ، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروپیکونازول همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلنیوم(جهت بررسی تأثیر حفاظتی سلنیوم). تزریق به مدت ۲ هفته، یک روز در میان به صورت درون صفاقی انجام شد. سپس با استفاده از روشRT-PCR و برنامه Total Lab بیان ژن کاسپاز ۹ در بیضه تمام گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیان ژن کاسپاز ۹ در تمام گروه های تجربی (گروه های پروپیکونازول و پروپیکونازول با سلنیوم) در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم افزایش معنی‌داری را نشان داد. این یافته‌ها می‌توانند بیانگر این باشند که ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم سلنیوم، دوز مصرفی مناسبی برای ایجاد حفاظت در این تحقیق نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: افزایش معنی‌دار در بیان ژن کاسپاز ۹ در تمام گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل بیانگر فعال شدن آپوپتوز و عدم تأثیر سلنیوم برای حفاظت بیضه در برابر آسیب‌های القا شده است .

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز ، پروپیکونازول، رت نژاد SD ، سلنیوم ، کاسپاز ۹

*نویسنده مسئول: **هما محسنی کوچصفهانی**، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری
Email:kouchesfehani@yahoo.com

مقدمه

کونازول‌ها شامل تری آزول‌ها یا ایمیدیازول‌ها عوامل ضد قارچی هستند که برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها و به عنوان دارو برای درمان عفونت‌های قارچی استفاده می‌شوند. پروپیکونازول نیز که در دسته کونازول‌ها قرار دارد، یک قارچ کش سیستمیک است که به طور گسترده‌ای در ایران و سایر کشورها جهت سم‌زدایی دانه‌های غلات به خصوص برنج استفاده می‌شود. این قارچ‌کش از طریق مهار یک سیتوکروم خاص P450، CYP 51 (Lanosterol – 14α- demethylase) عمل می‌کند که یک مرحله اصلی در بیوسنتز آرگوسترول، یک استروئید مورد نیاز برای شکل‌گیری دیواره سلولی قارچ‌ها است(۱). در سیستم‌های پستانداران علاوه بر پروپیکونازول بسیاری از کونازول‌ها از جمله تریادیمفون و مایکلوبوتالین چندین ایزوفرم سیتوکروم P450 را در موش و رت القا می‌کنند(۲).

مطالعه‌های انجام شده با استفاده از آنالیزهای بیان mRNA ، وسترن بلات و روش‌های سنجش عملکردی بیان دو سیتوکروم CYP 2B1/2 و CYP3A1(23)/2 را در رت تحت القای قارچ کش‌های تریادیمفون و مایکلوبوتالین نشان داده‌اند(۳). برخی از کونازول‌ها هم‌چنین ایزوفرم‌هایی از P450 را در کبد موش القاء می‌کنند که متداول‌ترین آن‌ها CYP2b10/20 ، CYP3a11 و CYP3a13 می‌باشند(۳) و باعث سرطان در سلول‌های کبدی می‌شود، در حالی که در رت سرطان‌زا نیست.

مکانیسم عمل سرطان‌زایی پروپیکونازول به این صورت است که فعالیت گیرنده‌های خاصی را که منجر به القاء یکسری از سیتوکروم های (SCYP) P450 می‌شود تحریک می‌کند. افزایش سطوح SCYP باعث افزایش گونه‌هایی از اکسیژن فعال(ROS) شده که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود. پروپیکونازول موتاسیون‌هایی را در کبد ترانس ژنیک به موش القاء می‌کند و شواهد اولیه نشان می‌دهد که این موتاسیون‌ها نتایج افزایش آسیب اکسیداتیو به DNA هستند. افزایش سطوح این SCYP باعث افزایش سوخت و ساز ترانس رتینوئیک اسیدها می‌شود که در نهایت باعث کاهش سطح ترانس رتینوئیک اسید کبدی شده که خود با افزایش تکثیر سلولی همراه است(۷ـ۴).

کاسپازها انواعی از آنزیم‌های سیستئین- آسپارتات مربوط به مسیر آپوپتوز می‌باشند که نقش مهمی در تنظیم و اجرای آپوپتوز ایفا می‌کنند. کاسپازها بر اساس عملکردشان به دو نوع آغازگر شامل؛ کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۰ و اجرایی شامل؛ کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ دسته‌بندی می‌شوند. مسیر بیرونی شامل؛ کاسپازهای ۸ و ۱۰ و مسیر داخلی شامل کاسپاز ـ ۹ می‌باشند که هر دو مسیر همگرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می‌نمایند که به طور آبشاری فعال شده و منجر به انهدام سلول‌ها می‌شود؛ بنابر این می‌توان آن را به عنوان یک ژن کاندید مناسب برای مطالعه انتخاب کرد(۸).

سلنیوم یک عنصر کمیاب در بدن است که در سلامتی بسیار اهمیت دارد، چندین سلنوپروتئین وجود دارند که همگی در رشد و تکوین مهم هستند(۹)، از بین اندام های تولید مثلی بیضه بیشترین مقدار سلنیوم را داراست و حتی از کبد نیز پیشی گرفته است. سلنیوم از اجزای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله گلوتاتیون پراکسیداز به شمار می‌رود که در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و رفع استرس اکسیداتیو به ایفاء نقش می‌پردازد(۱۰). نقش محافظتی این عنصر در تحقیق‌های مختلف بیان شده است که از آن جمله می‌توان به تأثیر آن بر نقش مهاری کادمیوم روی بیضه اشاره کرد(۱۱).

نقش حفاظتی سلنیوم به شدت وابسته به دوز می‌باشد، به طوری که در دوزها و مدت زمان‌های مختلف می‌تواند اثرات متفاوت و گاه منفی ایجاد کند(۱۲). از آنجا که تاکنون تحقیق‌های مشخصی بر نقش حفاظتی سلنیوم در برابر تغییرات بیان ژنی ناشی از پروپیکونازول گزارش نشده است، لذا هدف از تحقیق تجربی حاضر بررسی اثر دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلنیوم بر تغییرات بیان ژنی ایجاد شده به وسیله قارچ کش پروپیکونازول بر بافت بیضه بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داولی از موسسه سرم‌سازی رازی کرج خریداری شد و به مدت ۱۰ روز قبل از شروع تزریق دوز، تحت شرایط آزمایشگاهی نگه داشته شدند تا با شرایط خود را وفق دهند. این رت‌ها در قفس‌های پلی کربنات تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، تحت دمای کنترل شده ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آسان به آب وغذا نگهداری شدند و سپس به ۱۰ گروه ۴ تایی به شرح ذیل بودند؛ کنترل، شم۱ (حلال پروپیکونازول، آب مقطر) ، شم۲ (حلال سلنیوم، نرمال سالین) و ۷ گروه تجربی به نام گروه سلنیوم(۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، گروه‌های پروپیکونازول(سه دوز ۱۰ ، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه‌های پروپیکونازول با سلنیوم(سه دوز ۱۰ ، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پروپیکونازول همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سلنیوم). به کلیه گروه‌ها (به غیر از گروه کنترل) به مدت ۱۴ روز یک روز در میان در وقت صبح تزریق به صورت درون صفاقی صورت گرفت.

در این مطالعه پس از تعیین دوز کشنده (LD_{50}) که در این تحقیق بالاتر از دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد، سه دوز تجربی ۱۰ ، ۵۰، ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم جهت بررسی وآزمایش انتخاب شدند. بدین صورت که با تزریق دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ، حیوانات بعد از گذشت ۲۴ ساعت دچار سستی عضلانی و عدم توانایی در حرکت شدند و بعد از تزریق دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم ، ۲ سر موش از گروه ۴ تایی که برای تعیین دوز کشنده در نظر گرفت شد بود، بعد از گذشت ۲۴ ساعت تلف

شدند، لذا دوز های مورد آزمایش پایین تر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انتخاب شدند.

در این تحقیق قارچ کش پروپیکونازول از شرکت آریا شیمی(ایران) وسلنیوم مصرفی به صورت سلنیت سدیم(Na2Seo3) از شرکت سیگما(آلمان) خریداری شد و از نرمال سالین به عنوان حلال سلنیوم و آب مقطر به عنوان حلال پروپیکونازول استفاده شد.

پس از گذشت ۲۸ روز(این مدت برای طی نیم دوره از روند اسپرماتوژنز و دو چرخه از اپیتلیوم اسپرم‌ساز و دو چرخه عبور سلول‌های جنسی از طریق اپیدیدیم است)(۱۳). از شروع تزریقات حیوانات وزن شده و با استفاده از ماده بیهوشی کلروفرم کشته شدند، سپس در شرایط استریل با ایجاد شکافی در ناحیه تحتانی شکم، بیضه آنها خارج شد و جهت بررسی تغییرات بیان ژنی با استفاده از روش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور ابتدا total RNA با استفاده از کیت استخراج RNA خریداری شده از شرکت آریاطوس (ایران)، از بافت بیضه استخراج و سریع در دمای ۷۰ــ درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد کیفیت RNA بررسی شد. پس از مشاهده دو باند ۱۸ s و ۲۸ s مرحله بعد که سنتز cDNA است با استفاده از کیت سنتز رشته cDNA شرکت آریاطوس(ایران) انجام شد. ترکیب‌های کیت رشته اول cDNA(جدول۱) به ترتیب به یک میکروتیوب RNase free اضافه شد.

سپس نمونه مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا ساختار RNA از هم باز شود. بعد بلافاصله در یخ قرار داده شد و بعد ۱۰ میکرولیتر از محلول (2x) RT Premix به آن اضافه شد، حال حجم نهایی مخلوط که به ۲۰ میکرولیتر رسیده پیپتاژ شده سپس دو بار پشت سرهم، یک بار به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و یک بار هم به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

در آخرین مرحله مجدداً نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا آنزیم ترنسکیپتاز معکوس غیر فعال شود و پس از اتمام زمان تعیین شده نمونه‌ها در دمای ۲۰ــ درجه سانتی‌گراد برای استفاده در PCR قرار گرفتند.

واکنش PCR به منظور ساختار رشته دوم و تکثیر cDNA بر اساس پرایمرهای بلاست شده، در تولید DNA ی دو رشته‌ای، جهت تشخیص بیان ژن‌های خاص صورت می‌گیرد. بدین منظور از کیت آریاطوس استفاده شد(جدول ۲). به طور کلی بیان ژن به دو صورت؛ کمی و کیفی تقسم می‌شود که بیان کمی‌خود به دو نوع؛ مطلق و نسبی (نیمه کمی) تقسیم می‌شود. در مطالعه حاضر ژن کاسپاز ۹ نسبت به ژن β- actin بررسی شده، لذا روش بررسی حاضر نسبی یا نیمه کمی می‌باشد که برای این کار از برنامه Total Lab که بیان نیمه کمی را اندازه گیری می‌کند، استفاده شد. پس از به دست آوردن تراکم مربوط به باند مورد نظر در تیمارهای مختلف با استفاده از

برنامه مذکور برای هر دو ژن کاسپاز ۹ و β- actin، با استفاده از رابطه زیر میزان بیان محاسبه شد.

میزان تراکم باند کاسپاز ۹ ÷ β- actin میزان تراکم باند × 100= میزان بیان ژن کاسپاز ۹

سپس مقادیر به دست آمده را در جدول شماره ۳ وارد شد. طبق مقادیر به دست آمده برای تیمارهای مختلف، تیمارهایی که بیان بیشتر از ۱۰۰ داشته‌اند، افزایش بیان و تیمارهایی که بیان کمتر از ۱۰۰ داشته‌اند عدم بیان ژن کاسپاز ۹ را نشان می‌دهند زیرا ما در واقع میزان بیان ژن β- actin را طبق رابطه زیر برابر ۱۰۰ در نظر گرفته‌ایم.

میزان تراکم باند β- actin ÷ β- actin میزان تراکم باند ۱۰۰ × = میزان بیان ژن β- actin

پس از اضافه نمودن ترکیبات کیت به ترتیب به داخل میکروتیوب‌ها و قرار گرفتن آنها در دستگاه PCR، تحت برنامه PCR(جدول۳) ژن‌های مربوطه تکثیر یافتند. پس از اتمام مراحل PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز جهت الکتروفورز بارگیری شدند.

برای بررسی تغییرات بیان ژن های مورد نظر، از هر کدام از نمونه‌های محصول PCR مقدار ۴ میکرولیتر برداشته و با ۲ میکرولیتر از Loading dye مخلوط شده و به درون چاهک‌ها تزریق شدند و مقدار ۶ میکرولیتر از DNA Ladder درون یکی از چاهک‌ها جهت تخمین وزن مولکولی باندهای مشاهده شده تزریق شد. تانک الکتروفورز به دستگاه مولد برق متصل شده و ولتاژ ۷ ۹۰ استفاده شد . پس از رسیدن رنگ به انتهای ژل آگارز ۱ درصد، جریان برق قطع گردید . سپس ژل در دستگاه Uvitec GELDOC ساخت کشور ژاپن قرار داده شد. باند به دست آمده از ژن هدف با کنترل داخلی (ژن β-actin) نرمالیزه شد و با گروه کنترل خود مقایسه شد.

جدول۱: ترکیبات کیت رشته اول cDNA

Component	حجم
RNA مکمل	5 µg total RNA or 0.5µg poly (A) + mRNA
پرایمر	1µl upstream primer(F) & 1 µl downstream primer(R)
DEPC – treated water	UP to 10 µl

جدول۲: پرایمرهای مربوط ژن کاسپاز ۹ و ژن بتا اکتین به عنوان کنترل در مطالعه حاضر

Gene	Primer forward (5'–3')	Primer reverse (5'–3')
Casp -9	AGCCAGATGCTGTCCCATAC	CAGGAGACAAAACCTGGGAA
β-actin(ژن کنترل)	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC

جدول ۳: برنامه PCR برای تکثیر ژن‌های کاسپاز ۹ و بتا اکستین

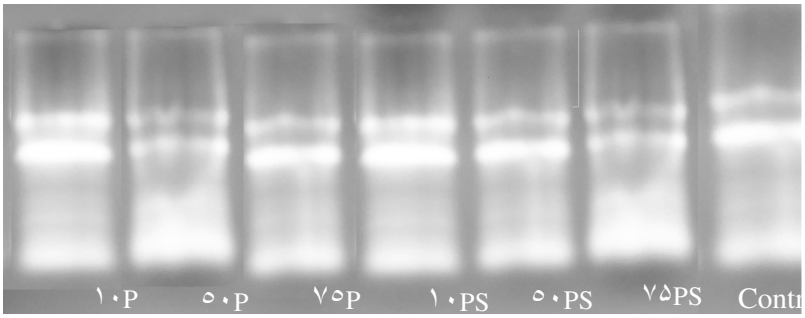
Initial Denaturation	PCR cycles (35 cycles)			Terminal Extension
	Denaturation	Annealing	Extension	
۹۵ °C	۹۵ °C	۳۶ °C	۷۲ °C	۷۲ °C
۱۰ min.	۳۰ Sec.	۲ min.	۱ min.	۵ min.

یافته‌ها

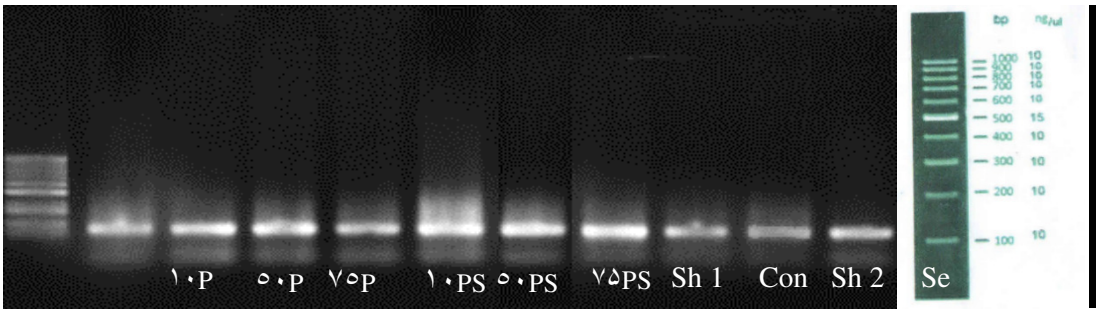
بعد از استخراج RNA جهت تأیید آن روش‌های متعددی وجود دارد که یکی از این روش‌ها الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز می‌باشد. به دلیل این که RNA استخراج شده حاوی rRNA، mRNA و tRNA می‌باشد و نظر به این که rRNA در سلول بسیار زیاد است و حدود ۸۵ درصد کل RNA را تشکیل می‌دهد و میزان mRNA بسیار پایین است، بنابراین وجود باندهای ۱۸s rRNA و ۲۸s را می‌توان دلیل بر صحت استخراج RNA دانست(شکل۱).

تکثیر cDNAهای به دست آمده از نمونه‌های کنترل و تجربی اجازه بیان متمایز توالی‌های مختلف را نشان می‌دهد. در جستجوی ژن هدف، تلاش بر این بود که بیان متمایز در نمونه ها بررسی شود. برای اطمینان از کمیت و کیفیت cDNAهای سنتز شده از نمونه‌های کنترل و تجربی، بیان ژن β-actin از خانواده (housekeeping) ژن‌ها مورد آزمایش قرار گرفت(شکل۲) . در واقع Houskeeping ژن‌هایی هستند که همیشه و در همه سلول‌ها بیان می‌شوند، زیرا پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که برای سلول ضروری می‌باشند و بیان این ژن‌ها تحت تأثیر وضعیت‌های سلول نمی‌باشند که به عنوان کنترل مثبت شناخته شده‌اند، همان‌طور که در تصویر ۲ مشخص است از نظر بیان ژن β- actin در گروه‌های تجربی مختلف نسبت به گروه شم و کنترل تفاوت محسوسی مشاهده نشد. در کار حاضر از کنترل منفی نیز در مرحله تکثیر استفاده شد که شامل تمام مواد به جز نمونه RNA است و نشان دهنده این است که در مرحله تکثیر cDNAها ، هر تکثیری که رخ می‌دهد مربوط به cDNAهای سنتز شده است و DNA ژنومی و یا آلودگی دیگری نبوده است.

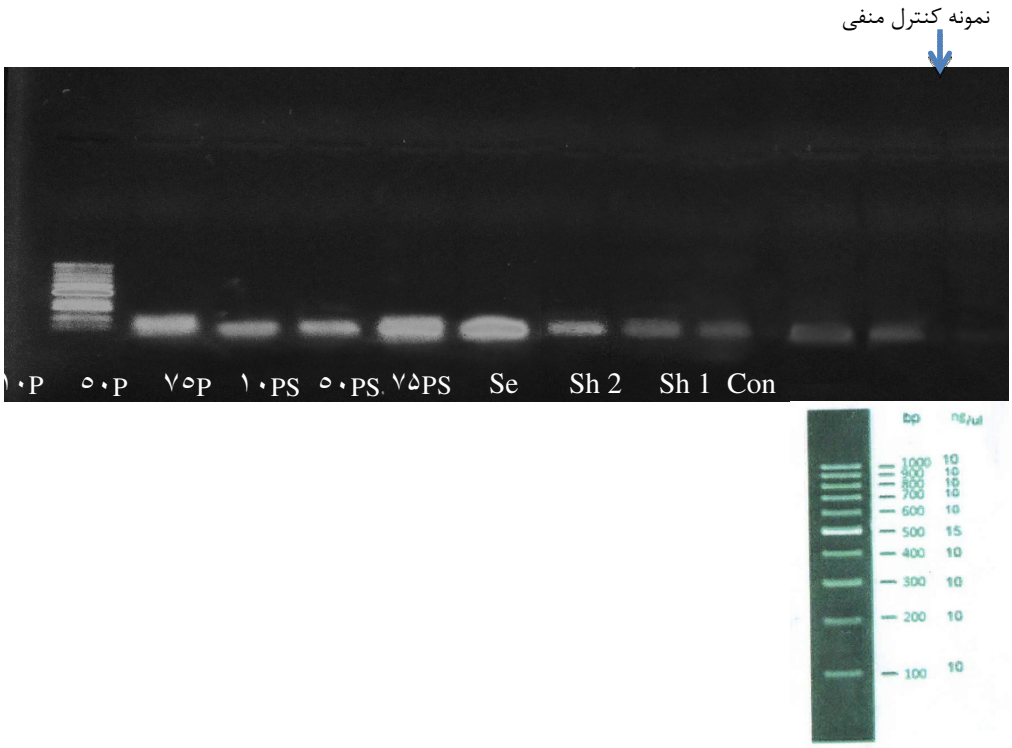
نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ژن کاسپاز ۹ که از ژن‌های آغازگر مسیر آپوپتوز است در گروه‌های تجربی ۲ الی ۷ بیان شده‌اند و نسبت به گروه کنترل افزایش بیان داشته‌اند، از آنجایی که بیان ژن هدف در تمامی گروه‌های تجربی تیمار با پروپیکونازول و گروه‌های تجربی تیمار با پروپیکونازول + سلنیوم مشاهده شد و تفاوتی در بیان آنها مشاهده نشد(شکل۳)(جدول ۴)، لذا می‌توان نتیجه گرفته می‌شود که ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلنیوم نتوانست نقش محافظتی در برابر آسیب ناشی از پروپیکونازول ایفاء نماید که با نتایج حاصل از مشاهده‌های بافتی بیضه و آنالیزهای شمارش سلول های اسپرماتوژنیک منطبق می‌باشد(۱۹).



شکل۱: الکتروفورز ژل آگارز RNA استخراج شده(اعداد ۱۰P ، ۵۰P و ۷۵P به ترتیب بیانگر دوز های مختلف قارچ کش پروپیکونازول و اعداد ۱۰PS ، ۵۰ PS و ۷۵PS به ترتیب بیانگر دوز های مختلف قارچ کش پروپیکونازول + سلنیوم می‌باشد) و ستون آخر نمونه کنترل می‌باشد.



شکل ۲: بیان ژن β- actin : ستون اول از سمت چپ DNA Ladder ستون دوم دوز ۱۰، ستون سوم دوز ۵۰، ستون ۴ دوز ۷۵ قارچ کش پروپیکونازول، ستون پنجم دوز ۱۰+ سلنیوم، ستون ۶ دوز ۵۰+سلنیوم، ستون۷ دوز ۷۵+سلنیوم ، ستون ۸ شم ۱ ، ستون۹ کنترل ، ستون ۱۰ شم ۲ ، ستون ۱۱ سلنیوم



شکل۳ : الکتروفورز محصولات ژن کاسپاز۹ بعد تز تیمار با قارچ‌کش پروپیکونازول در گروه‌های مورد مطالعه در موش‌های اسپراک واولی، ژن کاسپاز ۹ به ترتیب از چپ به راست ستون اول DNA Ladder و سپس دوزهای ۱۰ و ۵۰ و ۷۵ قارچ کش پروپیکونازول و دوزهای ۱۰ و۵۰ و ۷۵ پروپیکونازول + سلنیوم و ستون هشتم نمونه سلنیوم ، ستون نهم نمونه شم ۲ ، ستون دهم نمونه شم ۱، ستون یازدهم نمونه کنترل و ستون دوازدهم نمونه کنترل منفی

جدول ۴: داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن کاسپاز۹ نسبت به β- actin

Con	Se	Sh2	Sh1	۷۵ PS	۵۰PS	۱۰PS	۷۵P	۵۰P	۱۰P
۷۲/٦٤	۹۳/۹۰	۹۹/٦۰	۵۰	۱۱۹/۲۷	۱۱۱/۱۵	۵۰۷/۷٦	۱۹۵/۱۷	۱۸۸/۰۲	۲٤٤/۳۷

بحث

در این تحقیق تأثیر قارچ کش پروپیکونازول، که استفاده گسترده‌ای جهت سم زدایی محصولات کشاورزی به خصوص برنج در ایران و سایر کشورها دارد ، بر روی بیان ژن آغازگر مسیر آپوپتوز کاسپاز۹ در بافت بیضه در سه دوز ۱۰، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و اثر حفاظتی احتمالی سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی به مدت دو هفته یک روز در میان در موش‌های نر نژاد اسپراوگ داولی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه باندهای حاصل از محصولات PCR در گروه‌های تجربی تیمار با پروپیکونازول و تیمار با پروپیکونازول + سلنیوم با گروه کنترل، بیان معنی‌دار ژن مذکور را در بافت بیضه نسبت به گروه کنترل نشان داد.

بیان ژن هدف در تمامی گروه‌های تجربی تیمار با پروپیکونازول و پروپیکونازول با سلنیوم بیانگر آن است که ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلنیوم که به عنوان ماده محافظتی مورد استفاده قرار گرفته بود نتوانست تأثیر حفاظتی موثری در برابر آسیب های القایی با پروپیکونازول ایجاد نماید. نتایج به دست آمده دلیل قاطعی بر نقش پروپیکونازول در ایجاد آپوپتوز در بافت بیضه است که با نتایج ازومکو و همکاران و نیز اشنایدر و همکاران در رابطه با تأثیر وینکلوزولین که نوعی قارچکش گیاهی سیستمیک است، در افزایش القاء آپوپتوز مطابقت دارد(۱۵ و ۱۴)، همچنین نتایج مشابهی نیز به وسیله محققین دیگری از جمله اینواکا و همکاران مبنی بر القاء آپوپتوز به وسیله وینکلوزولین و نیز وارد و همکاران و همچنین هستر و همکاران مبنی بر اثر آپوپتوتیک تریادیمفان و مایکلوبوتالین که همگی متعلق به خانواده تریازول‌ها هستند به دست آمده است که با نتایج به دست آمده در این پروژه مطابقت دارند(۱۸ـ ۱۶) .

Apaf-1 در حالت عادی در سلول به صورت بی‌اثر و غیرفعال حضور داشته و در پروسه آپوپتوز به سبب رهایی c سیتوکروم از میتوکندری فعال می‌شود. وزن مولکولی این پروتئین ۱۳۰ کیلو دالتون بوده و در ناحیه انتهای آمینی دارای دمین CARD و در انتها کربوکسیلی دارای چندین بخش تکراری از موتیف WD-40 می‌باشد. برای فعال شدن پروتئین Apaf-1 ایجاد میان کنش بین این پروتئین و سیتوکروم c ضروری است. با مکانیسمی‌که به درستی مشخص نیست ، سیتوکروم c و dATP/ATP باعث الیگومر شدن Apaf-1 می‌گردند. توالی CARD پروکاسپاز۹ با نسبت یک به یک به ناحیه CARD در Apaf-1 متصل گشته و سبب فعال شدن کاسپاز ۹ می‌شود و کاسپاز ۹ فعال باعث فعال شدن کاسپاز های اجرایی از قبیل

کاسپاز -۳ و ۷ می‌شود. مجموعه پروتئین Apaf-1 ، سیتوکروم c و پروکاسپاز-۹ را آپوپتوزوم می‌نامند. در مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی کاسپاز آغازگر کاسپاز ۹ می‌باشد.کاسپاز ۹ فعال سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی(کاسپاز۳ ، ۶ و ۷) می‌گردد و در نتیجه کاسپازهای اجرایی روی سوبستراهای خود عمل می‌کند و فرآیند آپوپتوز صورت می‌گیرد(۱۹). در تجربه حاضر بیان ژن آغازگر آپوپتوز کاسپاز ۹ در گروه‌های تجربی با نتایج به دست آمده از بررسی بافت بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز مطابقت کامل دارد(۲۰). در این تحقیق نشان داده شد که قارچ کش پروپیکونازول بدون تأثیر معنی‌داری بر سطوح هورمون‌های گنادوتروپین FSH (فاکتور محرک فولیکول) و LH (فاکتور لوتئینی کننده) و نیز تستوسترون، کاهش معنی‌دار سلول‌های اسپرماتوژنیک و اسپرم‌ها را موجب شده است. بی‌نظمی در ساختار لوله‌های منی‌ساز، افزایش فضای لومن در درون لوله‌های منی ساز و کاهش ضخامت اپی‌تلیوم منی‌ساز که نتیجه کاهش سلول‌های اسپرماتوژنیک است همگی حکایت از این دارند که پروپیکونازول تأثیر خود را با اثر مستقیم بر بافت بیضه و با افزایش معنی‌دار آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی اعمال می‌کند و تیمار هم زمان با سلنیوم در دوز و مدت زمان استفاده شده نتوانسته است نقش حفاظتی در جلوگیری از آسیب‌های ایجاد شده و یا تعدیل آنها ایفا کند.

نتیجه‌گیری

بیان ژن آپوپتوتیک کاپساز ۹ در تمام گروه‌های تجربی ذکر شده بیانگر القاء بروز آپوپتوز تحت تأثیر قارچ کش پروپیکونازول و توأم با آن عدم تأثیر حفاظتی سلنیوم در کاهش معنی‌دار آپوپتوز می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری دانشگاه خوارزمی‌است که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Nesnow S, Padgett WT, Moore T. Propiconazole induces alterations in the hepatic metabolome of mice: relevance to propiconazole-induced hepatocarcinogenesis. Toxicological Sceinces 2011; 120(2): 297–309.
2.Ortiz PA, Bruno ME, Moore T, Nesnow S, Winnik W, Ge Y. Proteomic analysis of propiconazole responses in mouse liver: comparison of genomic and proteomic profiles. Journal of Proteome Research 2010; 9(3): 1268–78.
3.Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-dificient rats. Journal of the Society for Reproduction and Fertility 2004; 127: 335-42.
4.Douglas BT, Wenjun B, Amber KG, Chad RB, Hongzu R, Judith ES, et al. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. Toxicology and Applied Pharmacology 2006; 215(3): 260-73.
5.Ksheerasagar RL, Kaliwal BB. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. Environmental Toxicology and Pharmacology 2003; 15(1): 9–17.
6.Turner TT, Lysiack JJ. Oxidase stress: a commen factor in testicular dysfunction. Journal of Andrology 2008; 29(5): 488-98.
7.Khlkutes S. Effects of hibiscus rosa sinesis on spermatogenesis and accessory reproduction organ in rat. Journal of Medicinal Plants Research 1977; 31(2):127-35.
8.Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 1999; 15: 269-90.
9.Ren X, Wang G, Xu D, Luo K, Liu Y, Zhong Y, Cai Y. The protection of selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. Food and Chemical Toxicology 2012; 50: 3521–9.
10.Santiemma V, Rosati P, Guerzoin C, Mariani S. Human sertoli cells in vitro: Morphological features and androgen binding protein secretion. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 1992; 43(5): 423-9.
11.Farghali H, Williams DS, Simpplaceanu E. An evaluation of the integrity of the blood-testis-barrier by magnetic resonance imagin. Magnetic Resonance in Medicine 1991; 22: 81-7.
12.Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, Ahmad M, Salim S, Islam F. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. Journal of Neurochemistry 2003; 84: 438–46.
13.Junquira LC, Carneiro J. Basic Histology, Norwalk, Connecticut, Appleton and Lange, 1992; 468.
14.Uzumcu M, Suzuki H, Skinner MK. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function. Reproductive Toxicology 2008; 18: 765-74.
15.Schneider S, Kaufmann W, Buesen R, Ravenzwaay BV. Vinclozolin— the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. Reproductive Toxicology 2008; 25: 352-60.
16.Sun G, Thai SF, Tully DB, Lambert GR, Goetz AK. Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. Toxicology Letters 2005; 155: 277-87.
17.Ward WO, Delker DA, Hester SD, Thai ShF, Wolf DC. Transcriptional profiles in liver from mice treated with hepatotumorigenic and nonhepatotumorigenic triazole conazole fungicides: propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. Toxicologic Pathology 2006; 34: 863-78.
18.Hester SD, Wolf DC, Nesnow S, Thai SF. Transcriptional profiles in liver from rats treated with tumorigenic and non-tumorigenic triazole conazole fungicides: propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. Toxicologic Pathology 2006; 34: 879-94.
19.Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-activated apoptosis. Experimental Cell Research 2000; 256: 27-33
20.Mohseni Kouchesfahani H, Angaji A, Rashidi Pouya S, Abdollahi P, Govahi T. Study of damages induced by fungicide propiconazole on testicular tissue and process of spermatogenesis and protective effects on selenium in male Sprague Dawley rat. Armaghane-danesh 2015; 20(1): 19-30.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Propiconazole and Protective Effects of Selenium Gene Expression Profile of Caspase 9 in the Testicular Tissue of Male Sprague Dawley (SD) Rats

Rashidi pouya S[1], Mohseni kouchesfehani H [1*], Angaji SA[2]

[1]Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, [2]Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Received: 17 Apr 2016 Accepted: 7 Jul 2016

Abstract

Background & aim: Conazoles including imidazoles or triazoles are anti- fungal agents widely used to prevent fungal growth and their infections. Propiconazole placed in this group is a systemic fungicide used widely for detoxification of cereal seeds especially rice in Iran and other countries. This fungicide were designed to inhibit a specific cytochrome P450, CYP51 (lanosterol-14-α-demethylase), a critical step in the biosynthesis of ergosterol, a steroid required for the formation of the fungal cell wall. In the present experimental study, the effect of propiconazole on Caspase 9 gene expression profile as an initiator of apoptotic process and protective effect of selenium were investigated.

Methods: Forty SD rats were divided into 10 groups of 4, including : control , sham1 (solvent of propiconazole, distilled water), sham 2 (solvent of selenium, normal saline) and 1 group received 0.5 mg/kg selenium ,3 groups received propiconazole in doses of 10,50,75 mg/kg and 3 groups received propiconazole in doses of 10,50,75 mg/kg propiconazole with 0.5 mg/kg of selenium. Injections were intrapritoneal for two weeks in alternate days. Then, using RT-PCR and Total Lab program gene expression of caspase-9 testicular of all groups were studied. Data were analyzed using descriptive statistics.

Results: A significant increase of caspase 9 expression were observed among all experimental groups compared to control and sham groups. These findings indicated that 0.5 mg/kg selenium is not a suitable dose to create protection in this experimental study.

Conclusion: The significant increase in Caspase 9 gene expression profile observed in all experimental groups as compared to control suggests activation of apoptosis and inefficacy of selenium to protect the testis against induced damages.

Keywords: Apoptosis, CASP 9, Propiconazole, SD rat , Selenium

[*]**Corresponding Author: Mohseni Kouchesfahani H,** Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Email:kouchesfehani@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Rashidi pouya S, Mohseni kouchesfehani H, Angaji SA. The Effect of Propiconazole and Protective Effects of Selenium Gene Expression Profile of Caspase 9 in the Testicular Tissue of Male Sprague Dawley (SD) Rats. Armaghane-danesh 2016; 21 (5): 435-445.