Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

اثرات مانکوزب بر یکپارچگی سد خونی– بیضوی و بیان ژن‌های مرتبط

محدثه محمدی ساردو .Ph.D. Student[۱]، سید نورالدین نعمت الهی ماهانی .Ph.D[۲]، محمد نبیونی .Ph.D[۳*]، علی ماندگاری .Ph.D[۴و۵]، طوبی اسلامی نژاد .Ph.D[۶]، باقر امیرحیدری .Ph.D[۷]

۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران
۲- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، کرمان، ایران
۳- دانشگاه خوارزمی،دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی– مولکولی، تهران،ایران
۴- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی–فارماکولوژی، کرمان، ایران
۵- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، پژوهشکده علوم فیزیولوژی پایه و بالینی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، کرمان،ایران
۶- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، انستیتو نوروفارماکولوژی، کرمان، ایران
۷- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Devbiokharazmi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۶

چکیده

هدف: مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات مخرب مانکوزب بر سد خونی- بیضوی در مدل برون تنی طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: موش‌های نر با غلظت‌های ۲۵۰ و۵۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم (وزنی/وزنی) مانکوزب برای ۴۰ روز متوالی به‌صورت خوراکی تیمار شدند. نفوذپذیری سد خونی- بیضوی با استفاده از رنگ ایوانس بلو ارزیابی شد. بیان نسبی mRNA برخی از ژن‌های سد خونی- بیضوی از جمله N- کادهرین، کلائودین- ۱۱ و زونولا آکلودنس با روش Real time-PCR در گروه‌های مختلف تعیین شد.

نتایج: غلظت رنگ ایوانس بلو در لومن لوله‌های منی‌ساز حیواناتی که مانکوزب دریافت کرده بودند افزایش یافته بود. همچنین میزان بیان mRNA ژن‌های N- کادهرین، کلائودین- ۱۱ و زونولا آکلودنس بویژه در گروه با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم مانکوزب در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که مانکوزب با تغییر در بیان ژن‌های درگیر در تمامیت سد خونی- بیضوی، نفوذ پذیری آن را افزایش داده و باعث اختلال در عملکرد بیضه می‌شود.

واژگان کلیدی: سد خونی- بیضوی، مانکوزب، اختلالات تولید مثلی، بیضه

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انسان‌ها در معرض عوامل محیطی مختلفی قرار دارند که می توانند اثرات مخربی بر سلامتی در اکثر موجودات زنده اعمال می‌کنند. اکثر نگرانی‌ها به‌سمت افزایش اختلالات مربوط به سلامت تولید مثلی انسان معطوف شده‌اند. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که عملکرد سیستم تولید مثلی جنس نر نسبت به بسیاری از عوامل فیزیکی و شیمیایی از حساسیت بالایی برخوردار است (۱). آلاینده‌های محیطی طیف وسیعی از عناصر و ترکیبات مختلف از قبیل فلزات سنگین، قارچ کش‌ها، فنول‌ها و غیره را که اغلب در طی فرایندهای صنعتی در محیط آزاد می شوند را شامل می‌شوند (۲). مواردی مانند افزایش میزان سرطان سلول‌های زایای بیضه در طی ۵۰ سال گذشته، افزایش تعداد مردان جوان مبتلا به اولیگو اسپرمی (تعداد اسپرم کمتر از بیست میلیون در یک میلی‌لیتر)، کاهش کیفیت مایع منی و شیوع ناباروری، ممکن است به آلودگی‌های محیطی و سبک زندگی مرتبط باشد (۳, ۴).

استفاده از آفت کش‌های شیمیایی در طی ۵۰ سال گذشته به‌دلیل رونق صنعت کشاورزی به‌سرعت افزایش یافته است. پایداری آن‌ها در محیط پیرامون ما و همچنین شناسایی باقی مانده‌های آفت کش‌ها در بافت‌های انسانی، نگرانی‌هایی را در مورد اثرات بالقوه مضر این ترکیبات بر سیستم تولید مثل ایجاد کرده است. آن‌ها از مضرترین ترکیبات شیمیایی بالقوه‌ای هستند که به شیوه برنامه ریزی نشده در محیط رها شده‌اند.

به‌منظور تعیین اثرات مواجهه با آفت کش‌ها بر سلامت سیستم تولید مثل، کارگران بخش کشاورزی در کشورهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته اند. نتایج حاصل از این مطالعات نشان داده است که زنان و مردان دارای سابقه کار در بخش کشاورزی بیشتر در معرض خطر ناباروری هستند (۵).

دیتیوکاربامات ها (Dithiocarbamate) به‌عنوان یکی از پرکاربردترین قارچ کش‌ها بیش از ۵۰ سال است که درکشاورزی به‌عنوان آفت کش استفاده می‌شوند. اتیلن بیس دیتیوکاربامات ها (Ethylene- bis- dithiocarbamate) از انواع تیوکاربامات‌ها هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به مانب (Maneb)، زینب (Zineb) و مانکوزب (Mancozeb) اشاره کرد (۶). مانکوزب در کشاورزی و صنعت به فراوانی استفاده می‌شود، از جمله به‌عنوان یکی از پر کاربردترین قارچ کش‌ها علیه تقریبا ۴۰۰ پاتوژن گیاهی کاربرد دارد. این قارچ کش در حال حاضر توسط آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده آمریکا به‌عنوان یک آفت کش عمومی ثبت شده و بیشترین میزان رشد تولید را در بازار جهانی قارچ کش‌ها در سال ۲۰۱۴ داشته است. به‌دلیل ارزان بودن، افزایش تقاضای جهانی و اثر بخشی غیر انتخابی، پیش بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۰ تولیدی سریع تر از گذشته داشته باشد (۷).

علی‌رغم سمیت حاد ضعیف، تماس مزمن با این قارچ کش سمیت کبدی و کلیوی، اختلالات عصبی، اختلال عملکرد پانکراس، غدد فوق کلیه و غدد تیروئید در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد می‌کند (۸). همچنین مطالعات متعددی اثرات مخرب این آفت کش را بر سیستم تولید مثل از جمله سیستم تولید مثل جنس نر نشان داده اند که منجر به تغییرات هیستوپاتولوژیکی و تغییر در سنتز هورمون تستوسترون شده است (۸- ۱۰).

سد خونی- بیضوی یک ساختار ویژه بین سلول‌های سرتولی مجاور در لوله‌های منی ساز است که توسط انواع اتصالات اختصاصی از قبیل اتصالات شکاف‌دار، چسبنده و محکم تشکیل می‌شود. پروتئین‌های متعدد ویژه‌ای از قبیل اکلودین، کلائودین- ۱۱ وN- کادهرین در حفظ یکپارچگی سد خونی- بیضوی نقش دارند. لوله‌های منی‌ساز توسط اتصالات محکم و چسبنده سد که مسئول نفوذپذیری انتخابی برای مواد مغذی، فاکتورهای رشد،

www.SID.ir

Archive of SID

یون‌ها و دیگر مولکول‌های کوچک می‌باشند، به دو بخش قاعده‌ای و جنب مجرایی تقسیم می‌شوند. این سد حرکت سلول‌های زایا از عرض اپی‌تلیوم زاینده را به‌سمت بخش میانی لوله نیز کنترل می‌کند (۱۱). این سد سلول‌های زایای پیشرفته را از سیستم ایمنی که آن‌ها را به‌عنوان یک عامل خارجی می‌شناسد، حفاظت می‌کند (۱۲). بنابراین برهم خوردن یکپارچگی سد خونی- بیضوی با اثر بر فرایند اسپرماتوژنز، به ناباروری می‌انجامد.

مطالعات نشان دادند که برخی از آلاینده‌های محیطی از جمله بیس فنول A، آفت کش‌ها و فتالات‌ها که به‌عنوان محصولات صنعتی در محیط پیرامون ما یافت می‌شوند، بخشی اثرات خود را بر سیستم تولید مثلی از طریق اثر بر سلول‌های سرتولی و اتصالات سد خونی- بیضوی اعمال می‌کنند که موجب برهم زدن یکپارچگی سد خونی- بیضوی و اختلال تولید مثلی در انسان و حیوانات می‌شود (۹ و ۱۳). در این راستا، با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعات قبلی مبنی بر سمیت تولید مثلی مانکوزب، تاکنون گزارشی از اثرات این قارچ کش بر نفوذپذیری سد خونی- بیضوی و پروتئین‌های آن ارائه نشده است. لذا تحقیق حاضر یافته‌های چنین مطالعه‌ای را گزارش می‌کند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که به‌صورت درون تنی(in vivo) انجام شد، تعداد ۳۰ سر موش سوری نژاد NMRI شش تا هشت هفته‌ای با وزن ۳۰-۲۵ گرم از دانشکده پزشکی افضلی پور دانشگاه علوم پزشکی (کرمان ، ایران) خریداری و استفاده شدند. حیوانات در داخل قفس‌های پلاستیکی به‌مدت یک هفته در شرایط استاندارد با دسترسی آزاد به آب و غذا جهت سازگاری با محیط نگه‌داری شدند. محل نگه‌داری حیوانات دارای چرخه تاریکی- روشنایی ۱۲ ساعته، دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵ تا ۶۵ درصد بود. در این پژوهش از اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان پیروی شده است (EsC/KNRC/90).

گروه های آزمایش

حیوانات به صورت تصادفی به گروه‌های چهار و شش تایی تقسیم شدند.

۱-گروه شاهد که به‌مدت ۴۰ روز، هر روز روغن زیتون (حلال مانکوزب) به‌مقدار ۱۰ میلی لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی دریافت کردند.

۲-گروه تیمار I که مانکوزب را به‌مدت ۴۰ روز با دوز۲۵۰ میلی‌گرم به‌ازای هرکیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی دریافت کردند.

۳-گروه تیمار II که مانکوزب را به‌مدت ۴۰ روز با دوز۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی دریافت کرده‌اند.

جراحی حیوانات و استخراج RNA از بافت بیضه: در پایان دوره تیمار، حیوانات به‌روش جا به‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و بیضه‌ها جدا و با بافر فسفات سرد شسته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان استخراج RNA در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استخراج RNA بر طبق دستورالعمل کیت با استفاده از محلول Trizol (TaKaRa, Japan) انجام گردید. غلظت و خلوص RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Optizen, South Korea) اندازه گیری شد. (A260/280>1.8 and A260/230>1.6)

بررسی بیان ژن با استفاده از روش RT- PCR: به‌منظور بررسی بیان ژن های مرتبط با سد خونی- بیضوی، ابتدا cDNA (complementary DNA) طبق دستورالعمل کیت (HyperScript™ first strand cDNA synthesis kit, TaKaRa, Japan) ساخته شد. برای این منظور ترکیبی از آغازگرهای تصادفی (هگزامر)، آغازگرهای عمومی Oligo deoxythymine (dT)، dNTPs، بافر واکنش،RNA استخراج شده، آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID

ترانس کریپتاز معکوس و آب تهیه شد. مخلوط حاصله به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد جهت تبدیل آنزیماتیک RNA به cDNA نگه‌داری شد. بررسی بیان کمی ژن‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه LightCycler instrument (lightcycler® 96 Roche, Germany)صورت گرفت. هر واکنش شامل محلولTaKaRa, Japan) (SYBER Green، آغازگرهای اختصاصی (Macrogen, South Korea) cDNA، و آب بود. شرایط دمایی واکنش به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه برای واسرشتگی و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه جهت اتصال پرایمر و طویل شدن در نظر گرفته شد. در پایان، threshold cycle (Ct) های مربوطه از نرم افزار دستگاه استخراج شد و مقادیر نسبی mRNA در هر واکنش با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$آنالیز شدند.

ژن GAPDH که یک ژن خانه دار با بیان نسبتا مستمر و پایدار می باشد به‌عنوان شاهد داخلی استفاده شد. توالی پرایمرهای به‌کار برده شده در این تحقیق از مطالعات قبلی بدست آمد که صحت و اختصاصی بودن آن‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST بررسی شد (جدول ۱).

جدول ۱: خصوصیات آغازگرهای استفاده شده برای ژن های N- کادهرین، کلائودین- ۱۱ و زونولا آکلودنس

نام آغازگر	توالی ´3-´5	تعداد نوکلئوتید	GC%	اندازه محصول
N-cadherin	forward-5'-ACGAAGGACAGCCCCTTCTCAA-3' reverse-5'- AATCTGCTGGCTCGCTGCTTTC-3'	۲۲ ۲۲	۵۴/۵ ۵۴/۵	۸۷
Claudin-11	forward-5'-ACATTGCTGACTTGGGTGTG-3' reverse-5'-AGCCGAAAGGGAGAAGAGAG-3'	۲۰ ۲۰	۵۰ ۵۵	۱۰۸
Zonula occludens-1	forward-5'-ATGGAAAGCTGGGCTCTTGGCT-3' reverse-5'-ACCACCCGCTGTCTTTGGAAGT-3'	۲۲ ۲۲	۵۴/۵ ۵۴/۵	۱۳۷

تعیین تخریب سد خونی –بیضوی: تخریب و افزایش نفوذپذیری سد خونی- بیضوی با استفاده از رنگ ایوانس بلو تعیین شد. مقدار ۳ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، رنگ ایوانس بلو ۲ درصد در نرمال سالین با روش تزریق داخل ورید دمی به موش‌های گروه‌های مختلف تزریق شد. ۴ ساعت بعداز تزریق ، موش‌ها بی‌هوش شده و پرفیوژن قلبی با نرمال سالین ۹ درصد به‌طور کامل انجام شد. بافت‌های بیضه پس از شستشو در بافر فسفات، وزن و متعاقبا با فورماماید هموژن گردید و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد جهت خروج رنگ آنکوبه شدند. با پایان دوره انکوباسیون، نمونه‌ها در $10000 \times g$ به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و دانسیته نوری محلول رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر

www.SID.ir

Archive of SID

(Optizen, South Korea) اندازه‌گیری شد. غلظت رنگ با استفاده از نمودار استاندارد محاسبه شد.

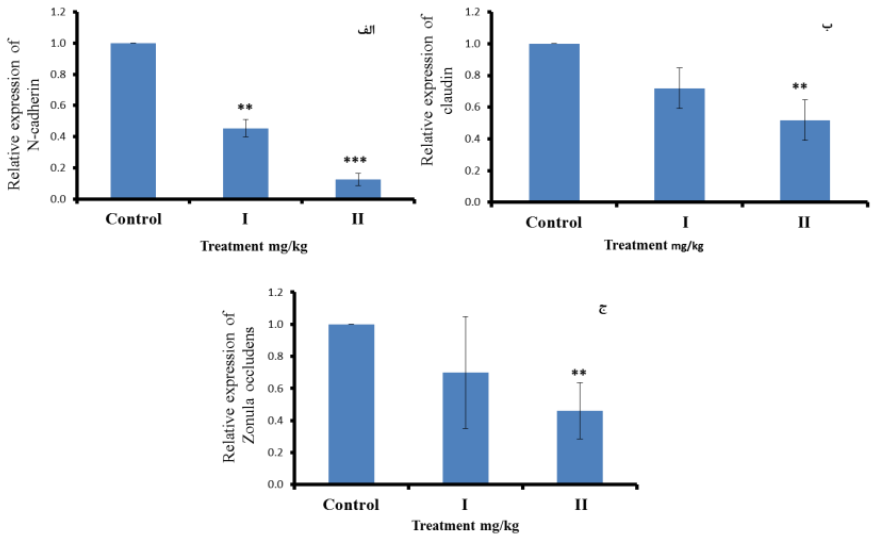
آنالیز آماری

بعد از جمع آوری اطلاعات، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel و version 18 SPSS (آزمون One way ANOVA و Tukey) صورت گرفت. نتایج به‌صورت mean±SD و سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ بیان شد.

نتایج

اثرات مانکوزب بر میزان بیان ژن های N- کادهرین، کلائودین-۱۱ و زونولا آکلودنس

نتایج حاصل از اثر غلظت های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم مانکوزب بر میزان بیان ژن های سد– خونی- بیضوی در شکل ۱ نشان داده شده اند. همان طور که از نمودار الف مشخص می باشد، میزان بیان ژن N- کادهرین در گروه I و II نسبت به گروه شاهد کاهش یافته و به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$ را نشان می‌دهند (شکل ۱- الف). تغییرات در میزان بیان ژن کلائودین- ۱۱ در شکل ۱- ب قابل مشاهده است. در گروه I کاهش در میزان بیان ژن مربوطه مشاهده شد اما این کاهش در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. در موش های گروه II که با ۵۰۰ میلی‌گرم مانکوزب به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شده بودند، به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیان ژن کلائودین-۱۱ در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($p<0.01$) (شکل ۱- ب). همچنین بیان ژن زونولا اکلودنس در گروه II در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۱$) اما در گروه I تیمار شده با ۲۵۰ میلی‌گرم مانکوزب اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد مشاهده نشد (شکل ۱- ج).



شکل ۱: آنالیز میزان بیان نسبی ژن های N- کادهرین، کلائودین- ۱۱و زونولا اکلودنس در بافت بیضه تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم مانکوزب (n=4). داده‌ها به‌صورت mean± SD ارائه شده است. $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA, Tukey test

I: گروه تیمار شده با ۲۵۰ میلی‌گرم مانکوزب، II : گروه تیمار شده با ۲۵۰ میلی گرم مانکوزب

الف: بیان نسبی ژن N- کادهرین، ب: بیان نسبی ژن کلائودین ۱۱، ج: بیان نسبی ژن زونولا اکلودنس

www.SID.ir

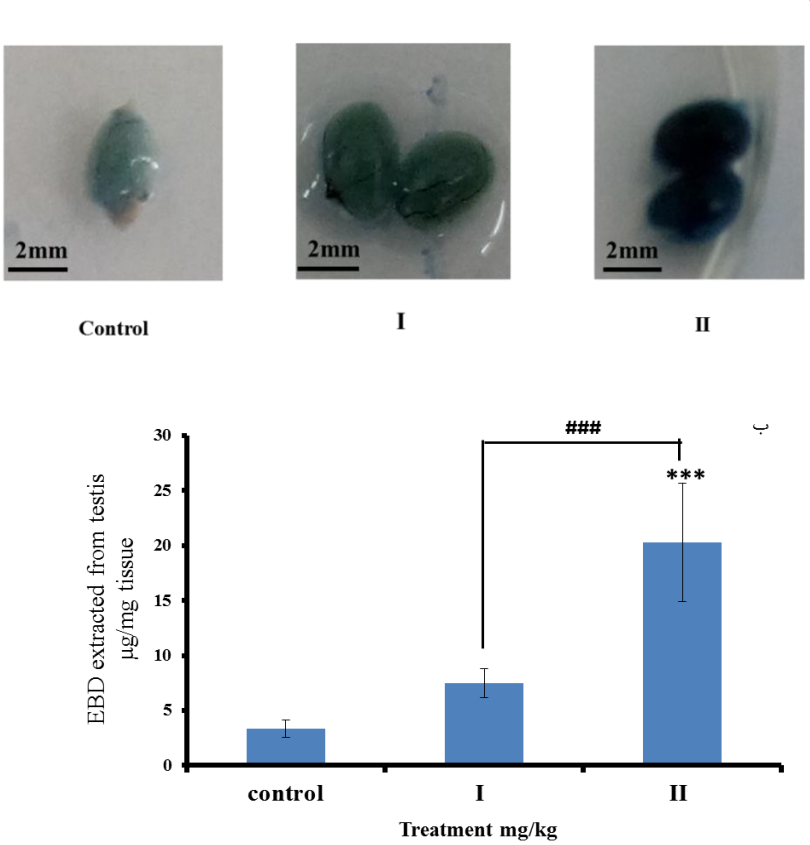
Archive of SID

**: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۱$ نسبت به گروه شاهد می‌باشد.

***: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه شاهد می‌باشد.

اثرات مانکوزب بر یکپارچگی و میزان نفوذپذیری سد خونی- بیضوی

مورفولوژی ظاهری بیضه‌ها پس تیمار و انجام پرفیوژن در شکل ۲- الف قابل مشاهده است. همان‌طور که تصاویر نشان می دهند بیشترین میزان تجمع رنگ در داخل لوله‌های منی ساز گروه تیمار شده با ۵۰۰ میلی‌گرم مانکوزب مشاهده می‌شود که می‌تواند دلالت بر تخریب سد و نفوذ ماده رنگی به‌داخل لوله‌ها داشته باشد. نتایج به‌دست آمده از تست رنگ سنجی نشان می‌دهند که تیمار حیوانات با ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مانکوزب در گروه II برای ۴۰ روز متوالی، به‌طور قابل ملاحظه‌ای نشت رنگ ایوانس بلو را به‌داخل لومن لوله‌های منی ساز افزایش داده است و اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) با گروه شاهد و گروه تیمار شده با ۲۵۰ میلی‌گرم مانکوزب در گروه I نشان می‌دهد. به‌علاوه در گروه I اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد (شکل۲-ب).



شکل ۲: اثرات غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم مانکوزب بر میزان نفوذپذیری سد خونی- بیضوی و نشت ایوانس بلو (n=6). داده‌ها به‌صورت mean±SD ارائه شده است. $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد، one way ANOVA, Tukey test

I: گروه تیمار شده با ۲۵۰ میلی‌گرم مانکوزب، II : گروه تیمار شده با ۲۵۰ میلی گرم مانکوزب

الف: مورفولوژی ظاهری و میزان نشت ایوانس بلو به بافت بیضه پس از تزریق نرمال سالین

ب: مقایسه غلظت رنگ ایوانس بلو در بافت بیضه در گروه‌های تیمار شده با مانکوزب و شاهد.

www.SID.ir

Archive of SID

*** : نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه شاهد می‌باشد.

###: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۰۱$ بین دو گروه ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم مانکوزب می‌باشد.

بحث

یکپارچگی سد خونی- بیضوی و بازسازی چرخه‌ای آن برای فعالیت طبیعی اپی‌تلیوم لوله منی‌ساز و فرایند تولید اسپرم از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که قارچ کش مانکوزب می‌تواند بیان ژن های سد خونی- بیضوی از قبیل N- کادهرین، کلائودین- ۱۱ و زونولا اکلودنس را مختل کند و موجب از دست رفتن یکپارچگی این ساختار شود. پروتئین‌های اتصالات محکم به‌عنوان یکی از اجزا ساختاری مهم، برای تنظیم پویایی سد خونی- بیضوی ضروری می‌باشند. کلائودین- ۱۱ به‌عنوان یک مارکر سلول سرتولی به‌میزان زیادی در بیضه‌های بالغ بیان می‌شود. گزارش شده است که خاموشی ژن کلائودین در موش ها موجب می شود تا فنوتیپ اپی‌تلیالی سلول‌های سرتولی از دست رود که نتیجه آن اختلال در یکپارچگی اتصالات محکم سد و سرانجام مرگ سلول‌های زایا می‌باشد (۳). N- کادهرین یک پروتئین ساختاری مهم (از اجزاء تشکیل دهنده اتصال اکتوپلاسمیک قاعده ای سد خونی- بیضوی) هم در بخش قاعده‌ای و هم در بخش جنب مجرایی در ساختار لوله های منی ساز می باشد و نقش مهمی را در تنظیم ساختار و عملکرد بافت‌های تولید مثلی ایفا می‌کند (۱۱). کاهش بیان ژن‌های کلائودین- ۱۱، زونولا اکلودنس و N- کادهرین بیانگراین است که قارچ کش مانکوزب ممکن است موجب درهم شکستن اتصالات سد شده که با نتایج به‌دست آمده از مطالعات قبلی که تغییرات هیستوپاتولوژیکی و تغییر در پارامترهای اسپرم را گزارش کردند (۸-۱۰) مطابقت دارد.

اگرچه سد خونی- بیضوی محکم ترین سد خونی- بافتی می‌باشد اما در مقایسه با سایر سدهای خونی- بافتی مانند سد اندوتلیالی متشکل ازاتصالات محکم، از حساسیت بیشتری نسب به سموم محیطی برخوردار است. مطالعات در سال‌های اخیر کاهش کیفیت و تعداد اسپرم را در جمعیت‌های انسانی گزارش کرده اند که به‌نظر می‌رسد با افزایش استفاده از سموم و تاثیر این سموم بر دستگاه تولید مثل مرتبط باشد و درهم ریختن یکپارچگی سد خونی- بیضوی می‌تواند به این نقیصه نیز منجر شود (۱۴). مطالعات متعددی نشان داده اند که اتصالات سلولی تشکیل دهنده سد خونی- بیضوی از اهداف اولیه برخی آلاینده‌های محیطی می‌باشند که سرانجام منجر به برهم خوردن هومئوستاز لوله‌های منی‌ساز و متعاقبا از دست رفتن سلول‌های زایا و ناباروری خواهد شد.

برای مثال یکی از بافت‌های هدف فلز کادمیوم، بافت بیضه به‌ویژه سلول‌های سرتولی می‌باشند که به اثرات زیان آور آن حساسیت بالایی دارند. مطالعات نشان داده‌اند که کادمیوم کلراید با تحت تاثیر قرار دادن پروتئین‌هایی از قبیل اکلودین، کلائودین- ۱۱، زونولا اکلودنس و N- کادهرین موجب در هم شکستگی سد خونی- بیضوی می‌شود (۱۵). تیمار با پرفلوئوروواکتانوئیک اسید میزان بیان پروتئین‌های مرتبط با اتصالات مختلف سد خونی- بیضوی از جمله N- کادهرین، کلائودین- ۱۱ و کانکسین ۴۳ را کاهش داد (۱۴و ۱۶). ترکیبات فتالاتی از قبیل دی-n-پنتیل فتالات، مونو بوتیل فتالات و مونو ۲- اتیل هگزیل فتالات با کاهش بیان پروتئین‌های اتصالات محکم از جمله کلائودین- ۱۱، یکپارچگی و تمامیت سد خونی- بیضوی را مختل می‌کنند (۱۷و ۱۸)

انفجار جمعیت صنعت کشاورزی را برای افزایش بهره‌وری تحت فشار قرار داده و در نتیجه بسیاری به مصرف کودها و آفت کش‌ها روی آورده اند. وابستگی به این ترکیبات علاوه بر ایجاد هزینه‌های تولید آسیب‌های جبران ناپذیری برای سلامت انسان و دیگر اشکال زندگی ایجاد کرده است (۱۹). سموم محیطی از جمله آفت کش‌ها که اختلالات عملکردی بر اسپرماتوژنز القا می‌کنند، اثرات خود را از طریق تغییر عملکرد سلول‌های سرتولی، سلول‌های لایدیگ، مختل کردن سنتز هورمون‌ها، انتقال، رهاسازی

www.SID.ir

Archive of SID

یا اتصال به رسپتورها اعمال می‌کنند (۲۰).

همان‌طور که در بالا ذکر شد یکی از مسیرهای آسیب آفت کش‌ها بر سیستم تولید مثل جنس نر، برهم زدن ساختار و فعالیت سلول‌های سرتولی و سد خونی- بیضوی می‌باشد. برای مثال حشره کش لیندان (Lindane) به‌دلیل داشتن خاصیت چربی دوستی به‌راحتی در بافت‌های گوناگون از جمله سیستم تولید مثل تجمع می‌یابد و عملکرد آن را مختل می‌کند. این اختلال با تحت تاثیر قرار دادن سلول‌های سرتولی و تخریب اتصالات شکافدار بین آنها و زونولا اکلودنس صورت می‌گیرد که موجب اختلال در فرایند اسپرماتوژنز می‌شود (۲۱و ۲۲). در مطالعه دیگری ذکر شده است که دی کلروفنوکسی تری کلرواتان، آفت کش ارگانوکلره می‌باشد که هنوز در برخی مناطق جهان بر علیه مالاریا استفاده می‌شود و متابولیت آن تغییرات شدیدی را در مجرای تولید مثلی جنس نر ایجاد می‌کنند که از جمله آن‌ها می‌توان به تغییر فعالیت سلول‌های سرتولی اشاره کرد (۲۳). به‌علاوه Durand و همکاران (۲۴) نشان دادند که دو قارچ کش کاربندازیم (Carbendazim) و ایپرودیون (Iprodione) در ترکیب با هم به‌طور چشمگیری میزان پروتئین‌های کانکسین ۴۳ و کلائودین- ۱۱ مربوط سد خونی- بیضوی را در موش‌های بالغ کاهش می‌دهند. تیمار با ترکیب تری بوتیلین کلراید (TBT) که در سنتز ترکیبات شیمیایی کشاورزی از جمله آفت کش‌ها به‌کار می‌رود، موجب افزایش نشت رنگ ایوانس بلو به‌داخل لوله‌های منی ساز شد. این داده‌ها به‌وضوح نشان می‌دهند که TBT با تخریب سد خونی- بیضوی در بافت بیضه تجمع یافته و اثرات مخرب گوناگون خود از قبیل واکوئله کردن سلول‌های سرتولی (تشکیل دهنده اتصالات سد خونی- بیضوی) را اعمال می‌کند (۲۵).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حال حاضر نشان داد که پروتئین‌های اتصالی بین سلولی تشکیل دهنده سد خونی- بیضوی می‌توانند اهداف اولیه و حساسی برای آفت کش مانکوزب باشند که در نتیجه از دست رفتن یکپارچگی سد، تغییر عملکرد سلول‌های سرتولی،مهار تکثیر و تکوین سلول‌های زاینده، آپوپتوزیس و ناباروری را در پی خواهد داشت. . گسترش دانش درباره آفت کش‌ها از جمله قارچ کش مانکوزب و ترکیبات مشابه آن که می‌تواند اثرات مضری بر باروری جنس نر داشته باشد، اهمیت زیادی در حفظ سلامتی افراد جامعه به ویژه کارگران کارخانه های تولیدی و بخش کشاورزی، خانواده و سلامتی نسل آن‌ها دارد. لذا نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند برای مدیریت ناباروری در مردان و آسیب‌های بیضوی ناشی از سموم محیطی از جمله آفت کش‌ها استفاده شود.

منابع

1. Oliva A, Spira A and Mltigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. Hum Reprod. 2001; 16(8): 1768-1776.

2. Wong EWP, Cheng CY. Impacts of environmental toxicantson male reproductive dysfunction. Trends Pharmacol Sci. Trends in Pharmacological Sciences. 2011; 32(5): 290-299.

3. Zhang J, Li Z, Qie M, Zheng R, et al. Sodium fluoride and sulfur dioxide affected male reproduction by disturbing blood-testis barrier in mice. Food Chem Toxicol. 2016; 94: 103-11.

4. Sharpe R.M. Environmental Causes of Testicular Dysfunction. S.J. Winters and I.T. Huhtaniemi. Male Hypogonadism,. Contemporary Endocrinology. New york, Humana Press. 2017: 281-304.

5. Foster WG, Neal MS, Han M-S, Dominguez MM. Environmental contaminants and human infertility: hypothesis or cause for concern? J Toxicol Environ Health, part B. 2008; 11(3-4): 162-76.

www.SID.ir

Archive of SID

colon cells. Environ Toxicol Pharmacol. 2016; 41: 78-88.

7. Runkle J, Flocks J, Economos J, Dunlop AL. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. Environ Int. 2017; 99: 29-42.

8. Girish BP, Reddy PS. Forskolin ameliorates mancozeb-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats by reducing oxidative toxicity and by stimulating steroidogenesis. J Biochem Mol Toxicol. 2017; 32 (2).

9. Joshi SC, Gulati N, Gajraj A. Evaluation of toxic impacts of mancozeb on testis in rats. Asian Journal of Experimental Sciences. 2005; 19(1): 73-83.

10. Ksheerasagar RL, Kaliwal BB, Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. Environ Toxicol Pharmacol. 2003; 15(1):9-17.

11. Minutoli L, Micali A, Pisani A, Puzzolo D, et al. Erratum: Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood-Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice. Toxicol Sci. 2016; 149(1): 270.

12. Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. Semin Cell Dev Biol. 2016; 59: 166-173.

13. Xiao X, Mruk DD, Tang EI, Wong CK, et al. Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. Hum Reprod. 2014; 29(6): 1279-1291.

14. Gao Y, Chen H, Xiao X, Lui W- Y,et al. Perfluorooctanesulfonate (PFOS)-induced Sertoli cell injury through a disruption of F-actin and microtubule organization is mediated by Akt1/2. Sci Rep. 2017; 7(1):1110.

15. Squadrito F, Micali A, Rinaldi M, Irrara N, et al. Polydeoxyribonucleotide, an Adenosine-A2A Receptor Agonist, Preserves Blood Testis Barrier from Cadmium-Induced Injury.Front Pharmacol. 2016; 7: 537.

6. Hoffman L, Trombetta L, Hardej D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human

16. Lu Y, Luo B, Li J, Dai J. Perfluorooctanoic acid disrupts the blood-testis barrier and activates the TNFalpha/p38 MAPK signaling pathway in vivo and in vitro. Arch Toxicol. 2016; 90(4): 971-83.

17. Chiba K, KONDO Y, YAMAGUCHI K, MIYAKE H, et al. Inhibition of claudin-11 and occludin expression in rat Sertoli cells by mono-(2-ethylhexyl) phthalate through p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway. J Androl. 2012; 33(3): 368-74.

18. Creasy DM, Beech LM, GRAY T-BJ, BUTLER WH. The ultrastructural effects of di-n-pentyl phthalate on the testis of the mature rat. Exp Mol Pathol. 1987; 46(3): 357-71.

19. Reis M, Moreira AC, Sousa M, Mathur PP, et al. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. J Applied Toxicol. 2015; 35(8): 870-883.

20. Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, Stember DS. Lifestyle, environmental, and male reproductive health. Urol Clin N Am. 2014. 2014; 41(1):55-66.

21. Šimić B, Kmetič I, Murati T, Kniewald J. Effects of lindane on reproductive parameters in male rats. Vet Arhiv. 2012; 82(2): 211-220.

22. Defamie N, Mograbi B, Roger C, Cronier L, et al. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. Carcinogenesis. 2001; 22(9): 1537-1542.

23. Reis M, Moreiraa AC, Sousaa M, Mathurb PP, et al. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: advantages and disadvantages. J. Appl Toxicol. 2015; 35(8): 870-883.

24. Durand P, Martin G, Blondet A, Gilleron J, et al. Effects of low doses of carbendazim or iprodione either separately or in mixture on the pubertal rat seminiferous epithelium: An ex

www.SID.ir

vivo study. Toxicol In Vitro. 2017; 45(3): 366-373.

25. Mitra S, Srivastava A, Khandelwal S. Tributyltin chloride induced testicular toxicity by JNK and p38 activation, redox imbalance and cell death in sertoli germ cell co-culture. Toxicology. 2013; 314(1): 39-50.

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2018; 9(1)

The effects of mancozeb on the integrity of blood- testis barrier and expression of associated genes

Mohammadi-Sardoo M Ph.D. Student.[1], Nematollahi-Mahani SN, Ph.D.[2], Nabiuni M, Ph.D3*, Mandegary A, Ph.D.[4,5], Eslaminejad T, Ph.D [6] , Amirheidari B, Ph.D [7]

1. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2. Department of Anatomy, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
3. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
4. Department of Toxicology& Pharmacology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
5. Physiology Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
6. Pharmaceutics Research Centre, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
7. Department of Biotechnology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

* Email corresponding author: Devbiokharazmi@gmail.com

Received: 28 Feb. 2018 Accepted: 27 May. 2018

Abstract

Aim: The current study was designed to understand the destructive effects of mancozeb on BTB in an in vitro model.

Material and Methods: Male mice were gavage- administered MZB (250, 500 mg/kg w. w) for 40 consecutive days. Integrity of BTB was evaluated using Evans blue dye. The relative mRNA expression of BTB- associated genes; including N- cadherin, claudin-11 and zonula occludens-1 was investigated by quantitative real-time reverse transcription–polymerase chain reaction in different groups (qRT-PCR).

Results: Concentration of Evans Blue dye in the lumen of seminiferous tubules was increased in mancozeb-treated animals. The mRNA expression levels of N-cadherin, claudin-11 and zonula occludens-1 genes were decreased significantly in the MZB 500 mg/kg group compared with the control group.

Conclusion: According to the obtained data, it could be concluded that mancozeb increase BTB permeability leading to testicular dysfunction by the alteration of BTB-associated genes.

Keywords: Blood- testis barrier, Mancozeb, Reproductive dysfunctions, Testis

www.SID.ir