



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 1 (Winter 2019), 1-204**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

## بررسی ارتباط بین سنتز پروتئین‌های P21 و cyclin D1 و اندازه‌گیری پارامترهای هیستومورفومتريک بافت بیضه موش در مواجهه با آفلاتوکسین G1

سیروس جلیلی<sup>۱</sup> (Ph.D)، تورج ضمیرنستا<sup>۲</sup> (Ph.D)، لعلیا قهاری<sup>۳\*</sup> (Ph.D)، سیران کاکه برایی<sup>۳</sup> (M.Sc)

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲- گروه آناتومی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

۳- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۴- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۲۷

L-ghahari@razi.tums.ac.ir

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱ - ۴۳۸۲۲۳۵۷

### چکیده

هدف: در میان انواع آفلاتوکسین‌ها، بعد از آفلاتوکسین B1، آفلاتوکسین G1 مهم‌ترین نوع بوده و به میزان بسیار زیادی در غلات و حبوبات یافت شده است. آفلاتوکسین تولید و کیفیت اسپرم را پایین می‌آورد. این مطالعه جهت بررسی تأثیر آفلاتوکسین G1 بر روند اسپرماتوژنز، اسپرمیوژنز و اثر آن بر سنتز پروتئین‌های P21 و cyclin D1 در بافت بیضه طراحی گردید. مواد و روش‌ها: ۲۴ سرموش سوری نر به طور تصادفی به ۴ گروه (کنترل و ۳ گروه آزمایشی) تقسیم شدند. گروه کنترل که فقط ۰/۲ml روغن ذرت به شکل داخل صفاقی دریافت نمودند. گروه‌های آزمایشی که AFG1 را به میزان (۲۰µg) در روزهای ۷، ۱۵ و ۳۵ دریافت کردند. متعاقب ۷، ۱۵، ۳۵ روز نمونه‌های بافت بیضه برداشته و پس از تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین، پارامترهای هیستومورفومتريک و ایمنوهیستوشیمی پروتئین‌های P21 و cyclin D1 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال در گروه‌های آزمایشی به طور معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) کاهش یافته که وابسته به زمان بوده است. درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضرایب تمایزی، جایگزینی لوله‌ای و هم‌چنین اسپرمیوژنز منفی در موش‌هایی که AFG1 را دریافت کردند، افزایش یافته بود. تزریق AFG1 در موش‌های گروه‌های آزمایشی منجر به افزایش سنتز پروتئین‌های P21 و cyclin D1 گردید.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که AFG1 با افزایش میزان سنتز پروتئین Cyclin D1 و پروتئین p21 روند تقسیم سلولی را دچار اختلال کرده است که به نوبه‌ی خود در روند اسپرماتوژنز نیز اختلال ایجاد نمود و با کاهش ضرایب جایگزینی، تمایز و اسپرمیوژنز در بافت بیضه، در نهایت تولید و کیفیت اسپرم را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین G1، اسپرماتوژنز، اسپرمیوژنز، Cyclin D1، P21، موش

### مقدمه

آفلاتوکسین که به وسیله گونه‌های اسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس تولید می‌شود نوعی سم دفاعی قارچی معرفی شده است. این نوع از قارچ‌ها در دانه‌های مغذی از جمله غلات و حبوبات به سرعت رشد کرده که آفلاتوکسین را به عنوان یک ترکیب سمی دفاعی از خود ترشح می‌کنند [۱، ۲]. تا به امروز ۱۸ نوع آفلاتوکسین کشف گردیده است که مهم‌ترین و سمی‌ترین آن‌ها به ترتیب عبارتند از: AFB1، AFG، AFB2 و AFG2 [۳-۵]. در میان انواع آفلاتوکسین‌ها، بعد از آفلاتوکسین B1، نوع G1 مهم‌ترین نوع بوده است [۶] تحقیقات

نشان داده شده است که ۴۰ درصد سرطان‌های کبد در آفریقا بر اثر آفلاتوکسین می‌باشد [۷] و نسبت سرطان گلوپال کبدی بر اساس آفلاتوکسین در چین، آسیای شمالی و آفریقا بیش‌تر می‌باشد [۷] و هم‌چنین در شمال چین که بیش‌ترین موارد بروز سرطان ریه و مری می‌باشد، AFG1 یکی از فراوان‌ترین منابع آلودگی درغلات و مواد غذایی این منطقه است [۸]. بررسی‌های قبلی بیان‌گر نقش آفلاتوکسین در تخریب بافت بیضه، محدود کردن روند اسپرماتوژنز، کاهش میزان سنتز  $\beta$ HSD3 و  $\beta$ HSD17 در بافت بیضه می‌باشد [۹-۱۱]. از طرفی چندین مطالعه تظاهرات ایجاد شده در بافت بیضه متعاقب مسمومیت با AFB1 که همه ناشی از آفلاتوکسین‌ها هستند را به صورت

اثوزین انجام شد و به منظور بررسی بیشتر، از هر نمونه بافتی بیضه ۶ لام نیمه سریال تهیه شد و شاخص‌هایی چون ضرایب جایگزینی، تمایز لوله‌ای، اسپرمیوتز، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ضرایب جایگزینی: لوله‌هایی که در آن‌ها نسبت اسپرماتوگونی B به اسپرماتوگونی A بیش‌تر بود تحت عنوان لوله اسپرم‌ساز با ضریب جایگزینی مثبت در نظر گرفته شدند. در این آزمون نسبت اسپرماتوگونی‌های A (نوع غیرفعال) به اسپرماتوگونی‌های B (نوع فعال) در ۲۰ مقطع عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز برای هر بافت بیضه مورد سنجش قرار گرفتند.

بررسی تمایز لوله‌ای: درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب تمایز لوله‌ای منفی، در ۲۰ مقطع عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز برای هر مقطع عرضی از بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفتند که لوله‌های اسپرم‌ساز با بیش از ۳-۴ ردیف سلول‌های ژرمینال، به عنوان لوله‌هایی با ضریب تمایز مثبت در نظر گرفته شدند.

بررسی اسپرمیوتز: لوله‌های اسپرم‌ساز که در آن‌ها روند اسپرمیوتز رخ داده بود به عنوان لوله‌هایی با ضریب اسپرمیوتز مثبت در نظر گرفته شدند و در ۲۰ مقطع عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز برای هر مقطع عرضی از بافت بیضه ارزیابی گردیدند.

بررسی قطر توبول‌ها: از روش Soudamani و همکاران استفاده شد [۱۸] که در آن ۲۰ توبول در هر مقطع عرضی بیضه به طور تصادفی انتخاب و میانگین قطر لوله‌ها و اپیتلیوم آن‌ها با استفاده از عدسی چشمی مدرج (با بزرگ‌نمایی ۴۰) محاسبه گردید جهت محاسبه‌ی اندازه‌نهایی برحسب میکرومتر، عدد حاصل در ضریب مخصوص که برای هر عدسی شیئی متفاوت است (بزرگ‌نمایی ۲۰۵۰۸ × ۴۰) ضرب شد.

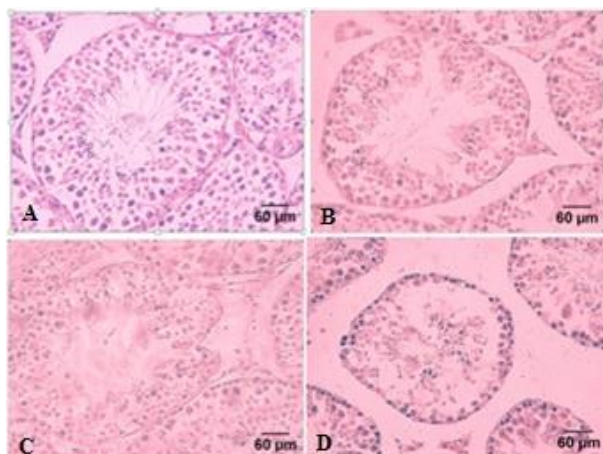
روش انجام ایمنو‌هیستوشیمی: برای بررسی میزان بیان پروتئین‌های p21 و Cyclin D1 و ارزیابی رفتار متقابل آن‌ها نسبت به هم از رنگ‌آمیزی ایمنو‌هیستوشیمی استفاده گردید که آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار Auxiovision L4-28 coliformia/USA مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا برش‌های بافتی در آون در دمای ۶۰ درجه به مدت ۲۵ دقیقه قرار داده شد. سپس جهت پارافین زدایی، برش‌ها ۲ بار به مدت ۱۰ دقیقه در گزیرلول قرار گرفت و به منظور آب‌دهی از الکل‌های نزولی استفاده شد. در ادامه به منظور حرکت صعودی تمام پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌ها، نمونه‌ها در محلول رتریوال در ماکروبو با ۸۰ درصد توان به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتند و سپس به منظور دناتوره شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ماکروبو با ۲۰ درصد

کاهش راندمان تولید مثلی، تاخیر در بلوغ، تغییرات پیش‌رونده مورفولوژی در بیضه‌ها، کاهش درصد بقای اسپرم و افزایش اختلالات در اسپرم‌ها نشان داده‌اند [۱۲-۱۴]. به طور کلی تنظیم چرخه سلولی در تقسیم سلولی عمدتاً بر عهده پروتئین‌های Cyclin است که در این میان بیان ژن‌های مربوط به Cyclin E1 و Cyclin D1 از جمله مهم‌ترین عوامل بوده و اولین ژنی که با تحریک استرادیول بیان می‌شود پروتوانکوژن Cyclin D1 است که بیان پروتئین‌های وابسته به Cyclin D1 را افزایش می‌دهد [۱۵]. 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 درحین تومور زدایی رخ می‌دهد [۱۶]. بیان p21 در بسیاری از ضایعات مورد بررسی قرار گرفته و ارتباط آن با تومورها گزارش شده است [۱۷]. در برخی مطالعات بین بیان P21 و Cyclin D1 ارتباط معنی‌داری دیده شده است [۱۵]. با توجه به مطالعات انجام شده، اثرات سوء آفلاتوکسین B1 بر روی دستگاه تناسلی نر و به دنبال آن بر توان باروری آشکار شده است [۱۹، ۱۸، ۱۹] از آن‌جا که AFG1 بعد از نوع B1 جز سمی‌ترین آفلاتوکسین‌ها محسوب می‌شود و در تحقیقات جدید اثرات آن بر روی یک سری از تومورها و سرطان‌ها مورد بررسی قرار گرفته است [۲۰-۲۲] و از طرفی دوز قابل تحمل آن ۲۰ میکروگرم می‌باشد [۴] و تنها اثر سمی آن بر پارانسیسم بیضه خروس گزارش گردیده است [۲۳]، در این مطالعه بر آن شدیم تا به ارتباط بین سنتز پروتئین P21 و Cyclin D1 در اثر مواجهه با دوز ۲۰ میکروگرم AFG1 بپردازیم.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۲۴ سر موش سوری نر بالغ (با میانگین وزنی  $20 \pm 2$  گرم) انتخاب شدند. شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی جهت  $10 \pm 5$  درصد) جهت نگهداری تمام موش‌ها رعایت گردید. در ادامه موش‌ها به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. گروه کنترل؛ ۰/۲ میلی‌گرم روغن ذرت و گروه‌های آزمایشی AFG1 را (به میزان ۲۰ میکروگرم) به ترتیب در تناوب‌های زمانی کوتاه مدت (۷ روز)، میان مدت (۱۵ روز)، و طولانی مدت (۳۵ روز) به شکل داخل صفاقی دریافت کردند. بدین ترتیب که قبل از تزریق، AFG1 (Sigma, USA, Cas NO: 1162-39-5) در روغن ذرت و اتانول (۹۵:۵ v/v) حل شد [۲۴]. متعاقباً در روزهای ۷، ۱۵، ۳۵ نمونه‌های بافت بیضه برداشت شد. پس از تهیه برش بافتی به ضخامت ۵ میکرون، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و

در گروه‌های ۷ و ۱۵ افزایش یافته بود ( $P < 0.05$ ). این در حالی است که درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب اسپرمیوزن (SPI) و جایگزینی (RI) منفی نیز با گذشت زمان به شکل قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی‌های هیستومورفومتریک در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۱. برش عرضی از بافت بیضه، (A) گروه کنترل، (B) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب ۷ روز، (C) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب ۱۵ روز و (D) گروه دریافت کننده AFG1 متعاقب ۳۵ روز. با گذشت زمان موجب کاهش تعداد لایه‌های سلول‌های زایا و همچنین ایجاد واکوئل‌هایی در اپی‌تلیوم (تصویر C) کاهش چشم‌گیر اندازه لوله‌های اسپرم‌زا ناشی از آتروفی شدید به همراه ایست اسپرماتوزنی (تصویر D) گردیده است. رنگ آمیزی H&E، ۴۰x

### بررسی ایمونوهیستوشیمی پروتئین Cyclin D1:

به منظور بررسی میزان سنتز پروتئین Cyclin D1 در رده سلول‌های زایا از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی Cyclin D1 استفاده گردید. مشاهدات نشان دادند که میزان سنتز این پروتئین بالاخص در رده سلول‌های اسپرماتوسیتوزن و اسپرماتوزن در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور غیر قابل توجهی در گروه ۷ و ۳۵ و در سطح قابل ملاحظه‌ای در گروه ۱۵ روزه ( $P < 0.05$ ) افزایش یافته بود (شکل ۲).

### بررسی ایمونوهیستوشیمی پروتئین p21:

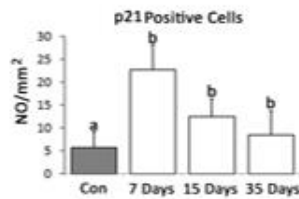
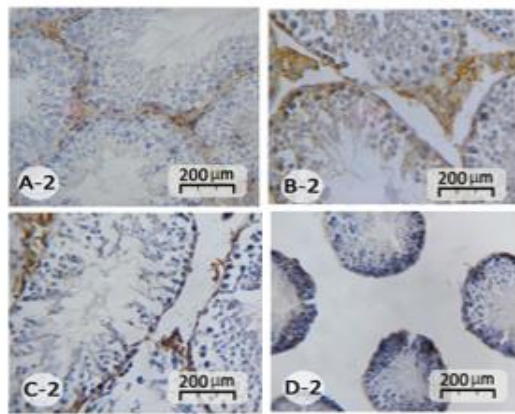
مطالعات ایمونوهیستوشیمی پروتئین p21 نشان داد که آفلاتوکسین با گذشت زمان میزان سنتز این پروتئین را در رده سلول‌های زایا در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است ( $P < 0.05$ ). پروتئین p21 در تمامی رده‌های سلولی متعاقب ۳۵ روز مشاهده شده است. مقایسه آماری بین گروه‌های دریافت‌کننده AFG1 هیچ تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایشی نشان نداد ولیکن تمامی گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار داشتند (شکل ۳).

توان (۳ دقیقه با ولتاژ ۷۵۰ و ۱۰ دقیقه با ولتاژ ۱۵۰) مستقر گردید. به لام‌ها آب اکسیژنه ۳ درصد اضافه و ۵ دقیقه در دستگاه انکوباتور قرار داده شد، سپس شستشو با محلول بافر انجام و متعاقباً با آنتی‌بادی‌های اولیه (P21, CyclinD1) هر کدام جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه و به مدت ۱۸ ساعت لام‌ها در یخچال (۴- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. برش‌ها مجدداً توسط بافر شستشو و در حمام بافر قرار داده شد. در ادامه لام‌ها توسط PBS شسته شد و آنتی‌بادی Antibody valent بر روی بافت‌ها تزریق و ۱۰ دقیقه دردمای محیط نگهداری گردید. اضافه کردن HRP به نمونه‌ها انجام و شستشو به مدت ۱۵ دقیقه صورت پذیرفت. اسلایدها ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و سپس برش‌های بافتی با بافر شستشو پاک شده و در حمام بافر قرار گرفتند. کروموزن DAB به برش‌های بافتی اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه انکوبه و ۲۰ ثانیه شسته شدن در آب مقطر، با همتوکسیلین رنگ گرفتند. برش‌ها با کاور پوشانده شد و بررسی اسلایدها با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰×۱۰ و ۱۰×۴۰ صورت گرفت. به دنبال آن عکس‌برداری از نمونه‌ها نیز انجام شد. نواحی مثبت به صورت لکه‌های قهوه‌ای در اثر رسوب DAB ایجاد گردید و در بافت دیده شد.

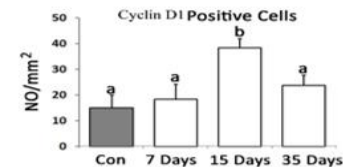
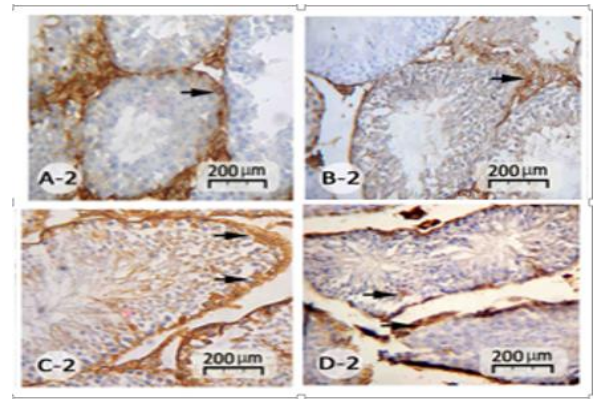
بررسی داده‌ها: تمامی داده‌ها براساس Mean±SD بیان گردید و داده‌های مطالعات بافت شناختی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های واریانس یک طرفه، هم‌چنین تست Bonferroni برای مقایسه آماری داده‌های کمی در بین گروه‌های آزمایشی با هم‌دیگر و با گروه کنترل تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری،  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

بررسی بافت‌شناسی بافت بیضه: بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که AFG1 با گذشت زمان موجب کاهش تعداد لایه‌های سلول‌های زایا و ریزش سلولی به همراه ایست اسپرماتوزنی گردیده است (شکل ۱). هم‌چنین میزان آتروفی لوله‌ها به شکل قابل ملاحظه‌ای در گروه ۳۵ روزه دیده شد، که کاهش قطر لوله‌های اسپرم و ارتفاع اپی‌تلیوم ژرمینال در گروه‌هایی که AFG1 را دریافت کرده بودند به‌خصوص در گروه ۳۵ روز آن را تایید کرد. بدین ترتیب که در موش‌های گروه دریافت‌کننده AFG1 متعاقب ۳۵ روز، در مقایسه با سایر گروه‌ها درصد بیش‌تری از لوله‌های اسپرم‌ساز آتروفیک مشاهده شد. بررسی‌های مربوط به تمایز لوله‌ای (TDI) نشان دادند که با گذشت زمان درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب تمایز لوله‌ای منفی در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی‌داری



شکل ۳: برش عرضی از بافت بیضه، (A2) گروه کنترل، (B2) گروه AFG1 متعاقب ۷ روز، (C2) گروه AFG1 متعاقب ۱۵ روز و (D2) گروه AFG1 متعاقب ۳۵ روز. سنتز پروتئین کنترل میزان سنتز پروتئین Cyclin D1 در رده سلول‌های اسپرماتوگونی (به میزان بالا) و در رده های اسپرماتوسیتی (به میزان کمتر) رویت می‌شود (دانه های قهوه‌ای). این در حالی است که با گذشت زمان بیان این پروتئین افزایش یافته است (تصاویر B2، C2 و D2). در تصویر متعلق به برش عرضی گروه ۱۵ روز AFG1 میزان سنتز پروتئین در سطح قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. حرف b نشان‌گر معنی دار بودن میزان سنتز این پروتئین در مقایسه با گروه کنترل است که با حرف a مشخص شده است. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی x۴۰. p21



شکل ۴: برش عرضی از بافت بیضه، (A2) گروه کنترل، (B2) گروه AFG1 متعاقب ۷ روز، (C2) گروه AFG1 متعاقب ۱۵ روز و (D2) گروه AFG1 متعاقب ۳۵ روز. در گروه کنترل میزان سنتز پروتئین Cyclin D1 در رده سلول‌های اسپرماتوگونی (به میزان بالا) و در رده های اسپرماتوسیتی (به میزان کمتر) رویت می‌شود (دانه های قهوه‌ای). این در حالی است که با گذشت زمان بیان این پروتئین افزایش یافته است (تصاویر B2، C2 و D2). در تصویر متعلق به برش عرضی گروه ۱۵ روز AFG1 میزان سنتز پروتئین در سطح قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. حرف b نشان‌گر معنی دار بودن میزان سنتز این پروتئین در مقایسه با گروه‌هایی است که با حرف a مشخص شده است. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی x۴۰. Cyclin D1

گروه شاخص M±SD	قطر لوله های اسپرم ساز (μm)	ضخامت اپی تلیوم ژرمینال (μm)	ضربت جایگزینی	ضربت تمایز لوله‌ای	ضربت اسپرمیوژن
گروه کنترل	۱۸۵/۱±۲/۹	۶۰/۱±۱/۹۶	۵/۳±۲/۰	۱۰/۵±۱/۲	۲/۱±۱/۶
۲۰ μg/kg روزه	۱۷۵/۱±۱/۸*	۴۹/۶±۱/۹*	۱۹±۴/۹*	۲۹/۱±۳/۷*	۲۴/۱±۳/۷*
۲۰ μg/kg ۱۵ روزه	۱۶۵/۵±۴/۱*	۴۸/۷±۲/۳*	۴۱/۶±۹/۸*	۴۴/۱±۳/۷*	۴۱/۶±۶/۰*
۲۰ μg/kg ۳۵ روزه	۱۴۶/۲±۴/۰*	۳۶/۳±۴/۷*	۵۰/۶±۴/۷*	۳۰/۰±۵/۴*	۴۱/۶±۴/۰*

جدول ۱. مقایسه میانگین قطر لوله اسپرم ساز، ضخامت اپیتلیوم ژرمینال، درصد لوله‌های اسپرم ساز با ضرایب تمایزی، جایگزینی لوله‌ای و اسپرمیوژن منفی در گروه‌های متاثر از AFG1 با گروه کنترل. \* مقادیر از نظر آماری معنی دار می‌باشند (P<0/05). داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است.

افزایش داد. این در حالی است که، موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند، در مقایسه با گروه کنترل، میزان بسیار بالاتری از پروتئین و p21 mRNA را نشان می‌دادند. بدین ترتیب که متعاقب ۳۵ روز از دریافت AFG1 میزان بیان و سنتز p21 در بافت بیضه موش‌های دریافت‌کننده AFG1 نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود.

مطالعات پیشین نشان دادند که AFB1 در سطح وسیعی توانست برای بافت بیضه آسیب‌رسان باشد. به طوری که، متعاقب مواجهه‌ی موش‌ها با دزهای مختلف AFB1، در سطح قابل ملاحظه‌ای ارتفاع سلول‌های زایا کاهش یافته و میزان آسیب در سطح اسپرم‌ها را افزایش داده است [۱۳].

Agnes و همکاران نشان دادند که تجویز ۵۰ μg AFB1 متعاقب ۷، ۱۵، ۳۵ و ۴۵ روز در سطح قابل ملاحظه‌ای میزان تحرک، بلوغ هسته‌ای، تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد [۲۴]. مطالعه دیگر نشان داد که، تجویز ۱۰ μg و ۲۰ μg

## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر مشخص گردید که تجویز AFG1 در موش‌های گروه آزمایشی، به شکل وابسته به زمان، منجر به آسیب بافتی در بافت بیضه و به ویژه در رده سلول‌های زایا می‌شود. بدین ترتیب که طبق مطالعات میکروسکوپ نوری با گذشت زمان درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب تمایز (TDI) و جایگزینی (RI) لوله‌ای و همچنین ضریب اسپرمیوژن (SPI) منفی در موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند، افزایش یافت. در کنار این موضوع برای شناخت دقیق‌تر مکانیسم اثر AFG1 در بافت بیضه، بررسی تغییرات مربوط به تکثیر، ترازد و تمایز سلول‌های رده اسپرماتوژن و آپوپتوز سلولی ناشی از سم اهمیت پیدا می‌کند. بنابراین به منظور ارزیابی این امر، میزان سنتز پروتئین‌های Cyclin D1 و p21 در بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات ایمونوهیستوشیمی نشان داد که AFG1 به شکل وابسته به زمان میزان بیان Cyclin D1 را

[۲۹]. هم‌چنین در مطالعه‌ای که به بررسی پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی در آملوبلاستوما پرداخته بودند، یافته‌ها نشان‌دهنده افزایش هر دو مولکول P21 و Cyclin D1 به خصوص در سلول‌های حاشیه‌ای آملوبلاستوما بود. نتیجه کلی این تحقیق نشان‌دهنده افزایش بیان و سنتز cyclin D1 در آملوبلاستوما و کاهش پروتئین p21 است. و نتایج کلی در مورد دو مولکول P21 و Cyclin D1 نشان داد که P21 در تمایز نهایی سلول‌های تومورال در آملوبلاستوما و Cyclin D1 در تزیاد اولیه سلول‌های توموری و تحریک تمایز نهایی آن‌ها نقش دارند [۳۰، ۳۱]. هم‌چنین مطالعه قبلی نشان داد آفلاتوکسین با افزایش آسیب وارده به DNA آپوتوز سلولی را در بافت بیضه افزایش می‌دهد [۱۲، ۳۲].

در مطالعه حاضر میزان سنتز p21 در بافت بیضه موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهدات نشان دادند که AFG1 به شکل وابسته به زمان میزان بیان و سنتز p21 را افزایش داده بود. این در حالی است که افزایش میزان سنتز Cyclin D1 در بافت بیضه موش‌هایی که AFG1 را دریافت نموده بودند به شکل وابسته به زمان قابل مشاهده بود. می‌توان این گونه نتیجه گرفت که افزایش بیان سایکلین پیامد افزایش p21 را به دنبال دارد، چرا که در مطالعه‌ای نشان داده شده در اثر افزایش بیان Cyclin D1، بیان p21 نیز به منظور مهار سایکلین افزایش می‌یابد [۲۹]. افزایش سنتز پروتئین p21 در رده‌های سلولی اپیتلیوم ژرمینال در سطح قابل توجهی تشکیل کمپلکس Cyclin D1-CDK را مهار نکرده است. این امر به نوبه خود قادر است تا روند تقسیم سلولی را دچار اختلال نماید. قابل ذکر است که افزایش در میزان سنتز پروتئین Cyclin D1 نیز به نوبه‌ی خود در کنار افزایش سنتز پروتئین p21 موجب تشدید میزان آسیب‌ها شده است.

از این یافته می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که، AFG1 سلول‌های رده‌های مختلف اپیتلیوم زایا را به صورت دسته‌جمعی یا به عبارت دیگر گروهی متاثر می‌نماید. این امر به نوبه‌ی خود می‌تواند تأثیرات چشم‌گیری را در سطح تولید اسپرماتوزوآ در لوله‌های درگیر به دنبال داشته باشد. کاهش قابل ملاحظه در درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب اسپرمیوزن مثبت (در گروه‌هایی که آفلاتوکسین را دریافت نموده بودند)، این نکته را به خوبی نشان داد.

مطالعات ما نشان داد که AFG1 میزان سنتز Cyclin D1 را افزایش می‌دهد، که به نوبه‌ی خود قادر است سبب اختلال در روند اسپرماتوزن گردد. بدین ترتیب که گذر سلولی از فازهای S، G1 و G2 دچار اختلال می‌شود. این مسئله می‌تواند

۵۰ μg از AFB1 در موش‌های صحرایی منجر به کاهش تعداد سلول‌های لیدیک، ادم واضح در بافت بینابینی بیضه، کاهش تعداد اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها گردیده است [۹]. در مطالعه دیگر این نکته به خوبی آشکار شده است که تجویز ۰/۸ppm، ۱/۶ppm و ۳/۲ppm از AFB1 در سطح معنی‌داری میزان اسپرماتوگونی و اسپرماتوزوا را کاهش داده است [۱۰].

بنابراین با در نظر گرفتن نتایج حاصل از مطالعات قبلی، به خوبی مشخص گردیده است که AFB1 اثرات آسیب‌زا بر روی بافت بیضه و توان باروری در جنس نر دارد، اما تنها مطالعه انجام شده بر روی بیضه از اثرات آسیب‌زای انواع آفلاتوکسین‌ها به صورت کلی و پاتولوژیک بوده است [۲۳].

در بافت‌های مختلف فاکتورهای رشد متفاوت با تحریک بیان و سنتز Cyclin D1 روند تکثیر سلولی را کنترل می‌نمایند [۲۵]. این در حالی است که پروتئین Cyclin D1 به همراه کینازهای وابسته به Cyclin ها (CDK) کمپلکسی را ایجاد می‌نماید که در نهایت چرخه سلولی را در فازهای S، G1 و G2 تحت کنترل در می‌آورد [۲۶]. در حقیقت پروتئین Cyclin D1 تحت قالب کمپلکس Cyclin D1-CDK-4، ورود به فاز S و سنتز DNA را تسهیل می‌نماید. این فرایند به نوبه خود می‌تواند روند گذر از فاز S و در ادامه از فاز G1 و G2 را در سلول‌های در حال تقسیم کنترل نماید [۲۷]. سلول‌های زایا در این مرحله نیاز به سنتز Cyclin D1 دارند، تا بتوانند تقسیم سلولی را انجام دهند [۲۸].

با در نظر گرفتن این حقیقت، در مطالعه حاضر سعی شد که میزان سنتز پروتئین Cyclin D1 در بافت بیضه موش‌هایی که با AFG1 مواجه می‌شوند مورد ارزیابی قرار گیرد. مشاهدات ایمنوهِستوشیمی مطالعه حاضر نشان داد که میزان پروتئین Cyclin D1 در بافت بیضه موش‌ها با گذشت زمان نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، که در گروه ۱۵ روزه این افزایش شکل معنی‌داری داشت. این نکته به خوبی مشخص می‌کند که AFG1 با اثر بر روی میزان بیان Cyclin D1 روند تقسیم سلولی را در رده سلول‌های زایا در بازه زمانی طولانی مدت افزایش می‌دهد. این امر به نوبه‌ی خود توانست باعث اختلال در تقسیم گردد و در ادامه تمایز سلولی را کاهش دهد. افزایش درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب تمایز، جایگزینی لوله‌ای و ضریب اسپرمیوزن این نکته را به خوبی اثبات کرد.

در برخی مطالعات بین بیان P21 و Cyclin D1 ارتباط معنی‌داری دیده شده است که P21 با بدخیمی مرتبط بوده و دیده شده که میزان Cyclin D1 نیز افزایش یافته بوده است

[13]. Mukumu CK, Macharia BN. Effects of aflatoxin b1 on liver, testis, and epididymis of reproductively mature male pigs: Histopathological evaluation. *East African Med J* 2017; 94.

[14] Thnaian Althnaian IAaSME-B. Effect of aflatoxin B1 on histopathology and oxidative stress biomarkers in testis of rats with special references to gene expression of antioxidant enzymes. *Int J Pharmacol* 2016; 12:408-414.

[15] Ioachim E, Michael M, Stavropoulos NE, 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; 73:65-73.

[16] Dong P, Zhang C, Parker BT, You L, Mathey-Prevot B. Cyclin D/CDK4/6 activity controls G1 length in mammalian cells. *PLoS One* 2018; 13:e0185637.

[17] Alves MR, NC EM, Barros-Filho MC, do Amaral NS, Silva FIB, Baiocchi Neto G, et al. Downregulation of AGR2, p21, and cyclin D and alterations in p53 function were associated with tumor progression and chemotherapy resistance in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Med* 2018.

[18] Murad A. Toxicity effect of aflatoxin B1 on reproductive system of albino male rats. *Pakistan J Biol Sci* 2015; 18:107-114.

[19] El-Kordy EAAG, Maha M. Effect of aflatoxin B1 on the seminiferous tubules and the possible protective role of curcumin in adult albino rats (Light and electron microscopic study). *Egy J Histol* 2015; 38: 614-628.

[20] Yi L, Shen H, Zhao M, Shao P, Liu C, Cui J, et al. Inflammation-mediated SOD-2 upregulation contributes to epithelial-mesenchymal transition and migration of tumor cells in aflatoxin G1-induced lung adenocarcinoma. *Sci Rep* 2017; 7:7953.

[21] Shen H, Liu C, Shao P, Yi L, Wang Y, Mills Ko E, et al. Enhanced phenotypic alterations of alveolar type II cells in response to Aflatoxin G1 -induced lung inflammation. *J Cell Physiol* 2015; 230:1199-1211.

[22] Liu C, Shen H, Yi L, Shao P, Soulika AM, Meng X, et al. Oral administration of aflatoxin G(1) induces chronic alveolar inflammation associated with lung tumorigenesis. *Toxicol Lett* 2015; 232:547-556.

[23] Ortatatl M, Ciftci MK, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. *Res Vet Sci* 2002; 72:29-36.

[24] Agnes VF, Akbarsha MA. Spermatotoxic effect of aflatoxin B(1) in the albino mouse. *Food Chem Toxicol* 2003; 41:119-130.

[25] Olashaw N, Pledger WJ. Paradigms of growth control: relation to Cdk activation. *Sci STKE* 2002; 2002:re7.

[26] Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 2004; 430:226-231.

[27] Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 2007; 98:629-635.

[28] Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med* 2016; 94:1313-1326.

[29] Yeganeh M, Gui Y, Kandhi R, Bobbala D, Tobelaim WS, Saucier C. Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21(CIP1/WAF1) in the liver. *Oncogene* 2016; 35:4200-4211.

[30] Zhong M, Wu L, Wang J, Zhang B, Hou L. [Expression of cyclin D1 and its inhibitors and hTERT in ameloblastoma]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2006; 24:495-498.

[31] Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Detection of cell cycle-related factors in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2001; 30:309-315.

[32] Zamir-Nasta T, Razi M. Roles of p21, p53, cyclin D1, CDK-4, estrogen receptor alpha in aflatoxin B1-induced cytotoxicity in testicular tissue of mice. *Environ Toxicol* 2018; 33:385-395.

ایجاد تقسیم سلول‌های غیرنرمال را موجب گردد. در کنار این موضوع با در نظر گرفتن این نکته که پروتئین‌های ریتینوبلاستی می‌توانند تشکیل کمپلکس Cyclin D1-CDK3,4 را دچار اختلال نمایند، افزایش سنتز پروتئین p21 در کنار موارد بالا توانسته است تا بر روند تقسیم سلولی تاثیر گذارد. بدین ترتیب که متعاقب تجویز AFG1 با گذشت زمان افزایش سنتز پروتئین p21 و اختلال در روند تقسیم سلولی شده است.

## تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه در راستای طرح ۹۹۵۷۰۷ و دانشگاه علوم پزشکی ارتش در راستای طرح ۹۶۰۶۸ بخش‌های آزمایشگاهی سازمان‌های مربوطه کمال تشکر را دارم.

## منابع

- [1] Luo J, Vogel RF, Niessen L. Rapid detection of aflatoxin producing fungi in food by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Microbiol* 2014;44:142-148.
- [2] Moeenian k, Yaghmaeian K, Ghorbani R. Aflatoxin M1 concentration in raw milk produced in the cities of Semnan province – Iran. *Koomesh* 2014; 15:176-181. (Persian).
- [3] Sharlin JS, Howarth B Jr, Thompson FN, Wyatt RD. Decreased reproductive potential and reduced feed consumption in mature white leghorn males fed aflatoxin. *Poultry Sci* 1981; 60:2701-278.
- [4] Luo J. Detection, Identification, and quantification of aflatoxin producing fungi in food raw materials using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) Assays. 2014.
- [5] Sanjarani A. The study of aflatoxin types and methods of detection, purification, identification and their effects on human and animal. *Sci Road J* 2015; 3:229-235.
- [6] 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; 36:572-577.
- [7] Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect* 2010; 118:818-824.
- [8] Zhang X, Wang F, Wang J, Yan X, Huang X, Xie T, et al. [Experimental lung carcinoma induced by fungi and mycotoxins--a review]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003; 35:4-6.
- [9] Supriya C, Girish BP, Reddy PS. Aflatoxin B1-induced reproductive toxicity in male rats: possible mechanism of action. *Int J Toxicol* 2014; 33:155-161.
- [10] Hasanzadeh SR. Effects of aflatoxin B1 on the growth processes of spermatogenic cell series in adult male rats. *Comparat Clin Pathol* 2013; 22: 555-562.
- [11] Cao Z, Shao B, Xu F, Liu Y, Li Y, Zhu Y. Protective effect of selenium on aflatoxin B1-induced testicular toxicity in mice. *Biol Trace Elem Res* 2017; 180:233-238.
- [12] 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 Med Sci J* 2017; 11:10-17. (Persian).

# Relationship between synthesis of P21 and Cyclin D1 proteins and histomorphometric parameters of mice testicular tissue in presence of Aflatoxin G1

Cyrus Jalili (Ph.D)<sup>1</sup>, Toraj Zamir-Nasta (Ph.D)<sup>4,2</sup>, Laya Ghahari (Ph.D)<sup>\*2</sup>, Seyran Kakeh baraei (M.Sc)<sup>3</sup>

1- Medical Biology Research Center, Kermanshah university of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2- Dept. of Anatomical Sciences, Aja university of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Dept. of Anatomical Sciences, Kermanshah university of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

4- Students research committee, Kermanshah university of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

\* Corresponding author. +98 21-43822357

l-ghahari@razi.tums.ac.ir

Received: 3 Dec 2017; Accepted: 18 Jul 2018

**Introduction:** AFG1 after B1 is the most important aflatoxin found in beans and grains. Remarkably, aflatoxin cause a decrease in production and quality of sperm. In the current study, the effect of AFG1 on spermatogenesis, spermiogenicity, synthesis of P21 and cyclin D1 proteins in testicular tissue was investigated.

**Materials and Methods:** 24 male albino mice were divided into 4 groups; control group intraperitoneally received 0.2 ml corn oil and experimental groups received AFG1 (20 µg) for 7, 15, and 35 days, respectively. After 7, 15 and 35 days, the testicular tissue samples were taken, and after preparing tissue sections, hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed. Histomorphometric parameters and the immunohistochemical analysis of proteins of P21 and cyclin D1 were investigated. Data analysis was carried out using one-way ANOVA at the significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The results of this study showed that the diameter of the spermatozoa tubes and the thickness of the germinal epithelium in the experimental groups significantly decreased ( $P < 0.05$ ), which was time dependent. The percentage of semen tubes with differentiation coefficients, tubular replacement as well as negative spermiogenesis increased in mice receiving AFG1. Conspicuously, injection of AFG1 in experimental group mice resulted in increased synthesis of P21 and cyclin D1 proteins.

**Conclusion:** AFG1 interrupted cell division by increasing the amount of protein synthesis of Cyclin D1 and P21 protein, which in turn could be a disorder in the process of spermatogenesis. However, increase differentiation indices, tubular differentiation, and spermiogenesis in testicular tissue, which consequently lead to a decrease in sperm production and quality.

**Keywords:** Aflatoxin G1, Spermatogenesis, Spermiogenesis, Cyclin D1, P21, Mice.