Investigation of the effect of diazinon on CatSper 1 gene expression, sperm motility and germinal epithelium thickness in adult male mice

Hamid Reza Faragnezhad[1], Shabnam Mohammadi[2], Seyed Morteza Seifati[3], Atena Mansouri[4], Reyhaneh Sadat Mahmoodia[5]

1.Msc.Student of Biology, Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0789-8047

2. Assistant Professor of Anatomy, Neurogenic Inflammation Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (Corresponding Author). Tel: 05138002459, Email: mohammadish@mums.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-2352-286X

3. Assistant Professor of Biology, Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8505-5267

4. PhD. Student of Nanotechnology, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0456-675X

5. PhD. Student of Immunology, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0003-9015

ABSTRACT

Background and Aim: Genetic changes and mutations in the genes involved in spermatogenesis can occur by environmental and congenital factors. Considering, the extensive use of diazinon in the farms and because we found no study on the effects of diazinon on the expression of CatSper1 gene, a key element of male fertility, we decided to perform this study in order to determine the effects of different doses of diazinon on CatSper1 gene expression, sperm motility and thickness of seminiferous tubules in adult male mice.

Materials and Methods: Twenty-four adult male Balb/c mice were randomly divided into four groups. The control group did not receive any injection. The sham group received diazinon solvent. Diazinon1 group received 7.5 mg/kg and, diazinon group 2 received 30 mg/kg of diazinon intraperitoneally, once a day for 2 weeks. After 35 days, we studied the sperms from the molecular and histological aspects and sperm motility was evaluated.

Results: Sperm motility was significantly decreased in diazinon 1 (P-value = 0.001) and diazinon 2 (P-value = 0.001) groups compared to that in the control group. Gene expression in diazinon group 1 and diazinone group 2 (P-value = 0.002) was significantly lower than that in the control group. Histological examination also showed that diazinon treatment reduced germinal epithelium thickness and led to vacuole formation and degeneration. Epithelial thickness was significantly decreased in diazinon group 1 (P-value = 0.003) and diazinon group 2 (P-value = 0.006) in comparison to that in the control group.

Conclusion: Diazinon affects male fertility by reduction in sperm motility and degenerative changes in germinal epithelium. It also, decreases expression of CatSper1 gene, a key gene in fertility.

Keywords: CatSper, Sperm, Diazinon, Mouse

Received: Feb 3,2019 **Accepted: Nov 9,2019**

How to cite the article: Hamid Reza Faragnezhad, Shabnam Mohammadi, Seyed Morteza Seifati, Atena Mansouri, Reyhaneh Sadat Mahmoodian. Investigation of the effect of diazinon on CatSper 1 gene expression, sperm motility and germinal epithelium thickness in adult male mice. SJKU 2020; 24 (6): 68-78

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

بررسی اثر دیازینون بر بیان ژن CatSper 1، تحرک اسپرم و ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در موش نر بالغ

حمیدرضا فرج نژاد[۱]، شبنم محمدی[۲]، سید مرتضی سیفتی[۳]، آتنا منصوری[۴]، ریحانه سادات محمودیان[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۳-۰۰۰۰-۰۷۸۹-۸۰۴۷

۲. استادیار آناتومی، مرکز تحقیقات التهاب نوروژنیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران، تلفن ثابت:۰۵۱-۳۸۰۰۲۴۵۹، پست الکترونیک: mohammadish@mums.ac.ir . کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۳۵۲-۲۸۶x

۳.استادیار زیست شناسی، مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۵۰۵-۵۲۶۷

۴. دانشجوی دکتری تخصصی نانوتکنولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۴۵۶-۶۷۵x

۵. دانشجوی دکتری تخصصی ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۰۰۳-۹۰۱۵

چکیده

زمینه و هدف: تغییرات ژنتیکی و موتاسیون ژن‌های مؤثر در اسپرماتوژنز از جمله عواملی هستند که می‌تواند ناشی از عوامل محیطی، مادرزادی و غیره باشد. با توجه به استفاده وسیع دیازینون در مزارع و با توجه به جستجویی که ما انجام دادیم تاکنون اثرات دیازینون بر بیان ژن CatSper1 که از ژن‌های کلیدی در باروری مرد است بررسی نشده است. لذا هدف از تحقیق حاضر تعیین اثرات دوزهای مختلف دیازینون بر بیان ژن CatSper1، تحرک اسپرم و ضخامت توبول های اسپرم ساز در موش نر بالغ بود.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر نژاد Balb/c بالغ به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه کنترل تزریقی دریافت نکرد. گروه شم حلال دیازینون را دریافت کرد. گروه دیازینون ۱ دوز ۷/۵mg/kg دیازینون و گروه دیازینون ۲ دوز ۳۰ mg/kg دیازینون را به صورت داخل صفاقی به مدت ۲ هفته و روزانه یک بار دریافت کردند. پس از ۳۵ روز، بررسی مولکولی، هیستولوژیکی و تحرک اسپرم انجام شد.

یافته‌ها: تحرک اسپرم در گروه دیازینون۱ (P =۰/۰۰۱) و دیازینون۲ (P =۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. میزان بیان ژن در گروه دیازینون ۱ و گروه دیازینون۲ (P =۰/۰۰۲) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. بررسی هیستولوژیکی نیز نشان داد که تیمار با دیازینون باعث کاهش در ضخامت اپی تلیوم ژرمینال، ایجاد واکوئل ها و دژنراسیون می‌شوند. ضخامت اپی تلیوم در گروه دیازینون۱ (P =۰/۰۰۳) و گروه دیازینون۲ (P =۰/۰۰۶) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت.

نتیجه گیری: دیازینون با کاهش تحرک اسپرم و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال بر باروری اثر می‌گذارد. به علاوه بیان ژن CatSper1 ژنی کلیدی در باروری مرد را کاهش می‌دهد.

کلمات کلیدی: CatSper، اسپرم، دیازینون، موش

وصول مقاله:۹۷/۱۱/۱۴ اصلاحیه نهایی:۹۸/۸/۳ پذیرش:۹۸/۸/۱۸

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

مقدمه

بر اساس تحقیقات انجام شده، حدود نیمی از مشکلات در زوج‌های نابارور مربوط به مردان است(۱). مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات ژنتیکی و موتاسیون ژن‌های مؤثر در اسپرماتوژنز از جمله این عوامل هستند که می‌تواند ناشی از عوامل محیطی، مادرزادی و ... باشد(۳ و ۲). دیازینون یکی از پرمصرف‌ترین سموم ارگانوفسفره است که به‌طور وسیعی برای کنترل آفات در مزارع کشاورزی و باغات و نیز برای کنترل حشرات خانگی به کار می‌رود(۳ و ۲). سموم ارگانو فسفره در حین سمپاشی از طریق پوست، مخاط، چشم و به صورت خوراکی و استنشاقی وارد بدن می‌شود. علاوه بر آلودگی شغلی افراد از طریق غذا یا محیط می‌توانند در معرض دیازینون قرار گیرند. میزان تأثیر آن به میزان دوز و مدت تماس با آن بستگی دارد. دیازینون ممکن است حداکثر تا یک ماه در محیط باقی بماند(۶-۳). تماس با دیازینون باعث کاهش تعداد و تحرک اسپرم(۷) و افزایش اسپرم با مرفولوژی غیر طبیعی می‌شود(۹ و ۸). به‌علاوه، دیازینون باعث آتروفی و نامنظم شدن لوله‌های اسپرم ساز، کاهش سلول های اسپرماتوگونی و لایدیگ و نیز کاهش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود(۱۱ و ۱۰). دیازینون با تأثیر بر محور هیپوتالاموس، هیپوفیز باعث کاهش سطح هورمون های مردانه تستوسترون، LH و FSH می گردد(۳) و خطر ابتلا به سندرم های ژنتیکی را افزایش می‌دهد(۱۲ و ۸).

از طرفی تنظیم غلظت کلسیم درون‌سلولی برای اسپرماتوژنز، بلوغ اسپرم، واکنش آکروزومی(۱۴ و ۱۳)، ظرفیت‌پذیری(۱۵ و ۱۳) و تحرک اسپرم اهمیت زیادی دارد(۱۶). یکی از این مکانیسم‌ها، برای ورود کلسیم از فضای خارج سلولی به داخل اسپرم، کانال‌های کلسیمی هستند. از جمله کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ خانواده ژنی CatSper است که نقش کلیدی در تحرک اسپرم و قدرت باروری اسپرم دارند و شامل خانواده ژنی CatSper1 تا CatSper4 و CatSper β و CatSper ɣ است. ژن‌های CatSper به‌طور اختصاصی در بیضه بیان می‌شوند(۱۷-۲۲). ایمونو فلورسنت غیرمستقیم نشان داد که پروتئین‌های CatSper 1, 2 در ناحیه دم اسپرم و پروتئین‌های CatSper 3, 4 عمدتاً در ناحیه آکروزومی سر اسپرم قراردارند(۲۱و ۱۹ و ۱۸). CatSper β دارای دو تکرار بین غشایی و CatSper ɣ دارای یک تکرار بین غشایی است و در ناحیه اصلی دم اسپرم قرار دارند(۲۲ و ۲۱).

مطالعاتی که روی اثر آلاینده‌ها و فاکتورهای محیطی بر بیان ژن و پروتئین CatSper صورت گرفته است، نشان می‌دهد که در معرض قرارگیری با فلزاتی مانند سرب(۲۳)، نیکل(۲۴)،کادمیوم(۲۵) و یا دیوکسین(۲۶) باعث کاهش کیفیت اسپرم، کاهش شدید در بیان ژن و پروتئین CatSper می‌شوند. با توجه به استفاده وسیع دیازینون به عنوان حشره‌کش و با توجه به جستجویی که ما انجام دادیم تاکنون اثرات دیازینون به عنوان یکی از فاکتورهای محیطی بر بیان پروتئین CatSper که از ژن‌های کلیدی در باروری مرد است صورت نگرفته است. لذا هدف از تحقیق حاضر تعیین اثرات دوزهای مختلف دیازینون بر بیان ژن CatSper1، تحرک اسپرم و ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در موش نر بالغ بود.

روش بررسی

نوع مطالعه تجربی بود که برای انجام آن، از ۲۴ سر موش بالغ ۳-۲ ماهه با نژاد Balb/c که از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد خریداری شد، استفاده کردیم. حجم نمونه بر اساس فرمول زیر، با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و توان ۸۰ درصد، ۴ موش برای هر گروه تعیین شد که بر اساس فرمول تعدیل برای ۴ گروه به ۶ موش در هر گروه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

افزایش یافت(۲۷). لذا حجم نمونه کل ۲۴ موش تعیین گردید.

$$n = 1 + 2C\left(\frac{S}{d}\right)^2$$
$$= 1 + 2 * 7.85\left(\frac{0.212}{0.556}\right)^2$$
$$\approx 4$$
$$n' = n\sqrt{g-1} = 4\sqrt{4-1} \approx 6$$

موش‌ها تحت شرایط استاندارد از نظر غذایی و محیطی نگهداری شدند. موش‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. موش‌ها به چهار گروه ۶ تایی بطور تصادفی ساده تقسیم شدند. شش سر موش گروه کنترل تزریقی دریافت نکرد. حلال دیازینون (نرمال سالین) به گروه شم تزریق شد. ۶ سر موش گروه دیازینون ۱ دوز ۷/۵ mg/kg دیازینون و شش سر موش گروه دیازینون ۲ دوز ۳۰ mg/kg دیازینون به صورت داخل صفاقی و به صورت روزانه یک بار به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. موش‌ها به روش در رفتگی مهره‌های گردن کشته و بیضه و اپیدیدیم آن‌ها خارج شد. همچنین RNA از بیضه چپ استخراج شد و بیان ژن پروتئین CatSper پس از انجام تکنیک Real-Time – PCR بررسی شد. جهت بررسی تحرک اسپرم ناحیه انتهایی اپیدیدیم جدا گردید. در ضمن رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین بافت بیضه راست جهت بررسی ضخامت اپی تلیوم ژرمینال انجام شد.

بررسی تحرک اسپرم: در هنگام نمونه‌گیری دم اپیدیدیم جدا شده و در محلول بافر فسفات قرار گرفت. سپس اپیدیدیم به وسیله یک قیچی استریل قطعه قطعه شده و به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2) قرار گرفت تا اسپرم‌ها از داخل قطعات خرد شده، خارج گردند. بعد از خارج‌سازی از انکوباتور، آنالیز اسپرم طبق دستور العمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) و به کمک لام نئوبار انجام شد(۲۷). به این صورت که در چهار مربع گوشه و یک مربع مرکز سلول‌های متحرک شمارش شد. اسپرم‌های بی تحرک و اسپرم‌هایی که حرکت در جا دارند و به سمت جلو پیش نمی‌روند، به عنوان اسپرم غیرمتحرک در نظر گرفته شد. اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده (Progressive) دارند، به عنوان اسپرم متحرک در نظر گرفته شد. در نهایت از فرمول زیر استفاده گردید(۲۷).

$$\text{درصد اسپرم‌های متحرک} = \frac{\text{تعداد اسپرم متحرک}}{\text{تعداد کل اسپرم}} \times 100$$

بررسی بیان ژن CatSper با تکنیک Real- Time PCR: استخراج RNA، با توجه به پروتکل شرکت سیناژن انجام شد. سپس cDNA با کیت فرمنتاس تهیه شد. پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعهٔ موردنظر واکنش PCR روی محصول RT انجام و ژل‌ها عکس‌برداری شدند. در این مطالعه بیان نسبی ژن‌های CatSper1 به صورت نیمه‌کمی با به کارگیری سایبرگرین و ژن β–Actin مورد اندازه گیری قرار گرفت. واکنش Real-Time PCR توسط دستگاه Applied Biosystems انجام و برنامه زیر راه‌اندازی شد: تعداد مناسب سیکل PCR به صورت:

Initation step	۹۵ درجه سانتی گراد
۱۰ دقیقه	۱ سیکل
Denaturation step	۹۵ درجه سانتی گراد
۲۵ ثانیه	۴۰ سیکل
Annealing step	۶۰ درجه سانتی گراد
۳۰ ثانیه	۴۰ سیکل
Extention step	۷۲ درجه سانتی گراد
۳۰ ثانیه	۱ سیکل

برای آنالیز داده‌ها از روش pfaffi و همکاران مطابق فرمول زیر استفاده شد(۲۸).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(control-sample)}}$$

مطالعه هیستولوژیکی ضخامت اپیتلیوم ژرمینال: آماده‌سازی بافت‌ها شامل مراحل تثبیت، آبگیری با الکل، شفاف‌سازی با گزیلل، آغشتگی با پارافین، قالب‌گیری و سپس برش‌گیری انجام شد. برش‌های به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) صورت گرفت. پس از عکس‌برداری از مقاطع بیضه گروه‌های مختلف با لنز 10×، میانگین ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال بیضه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(۲۹و۲۷).

$$H = \frac{V_V}{S_V}$$

V_v

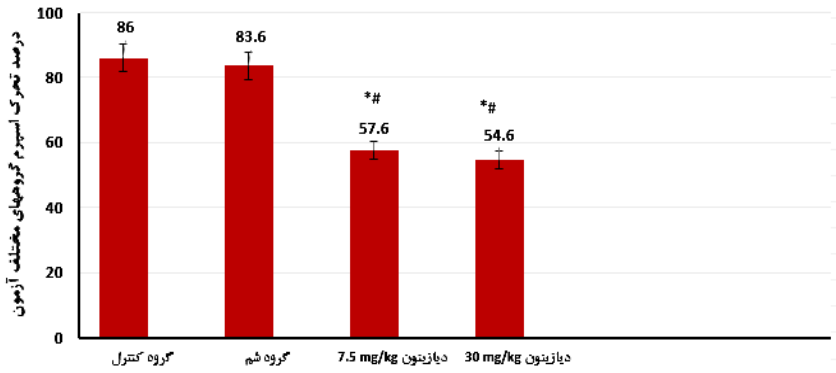
$S_v =$

ΣI مجموع نقاط برخوردهای خطوط پروب با سطح لومینال اپیتلیوم ژرمینال، Σp مجموع نقاط برخورد کرده با بافت بیضه و l/p طول خط پروب در مقیاس واقعی بافت.

آنالیز آماری: بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ای کمی، با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل لازم انجام شد. نرم‌افزار مورد استفاده؛SPSS نسخه ۲۰ بود، سطح معناداری ۵ درصد برای مقایسه گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی درصد تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف آزمون: در مقایسه کلی تفاوت معنی‌داری بین میزان تحرک اسپرم گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (P =۰/۰۰۱). نتایج آنالیز آماری نشان داد که تحرک اسپرم در گروه‌های دیازینون۱ (P =۰/۰۰۱)، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. به علاوه، تحرک اسپرم در گروه دیازینون۲ (P =۰/۰۰۱)، نسبت به گروه کنترل نیز کاهش چشمگیری داشت. همچنین بین گروه دیازینون (P=۰/۰۰۱) با گروه شم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به علاوه، آزمون آماری اختلاف معنی‌داری بین میزان تحرک اسپرم در گروه دیازینون۲ و شم نشان داد (P=۰/۰۰۱).



نمودار ۱. درصد تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف آزمون

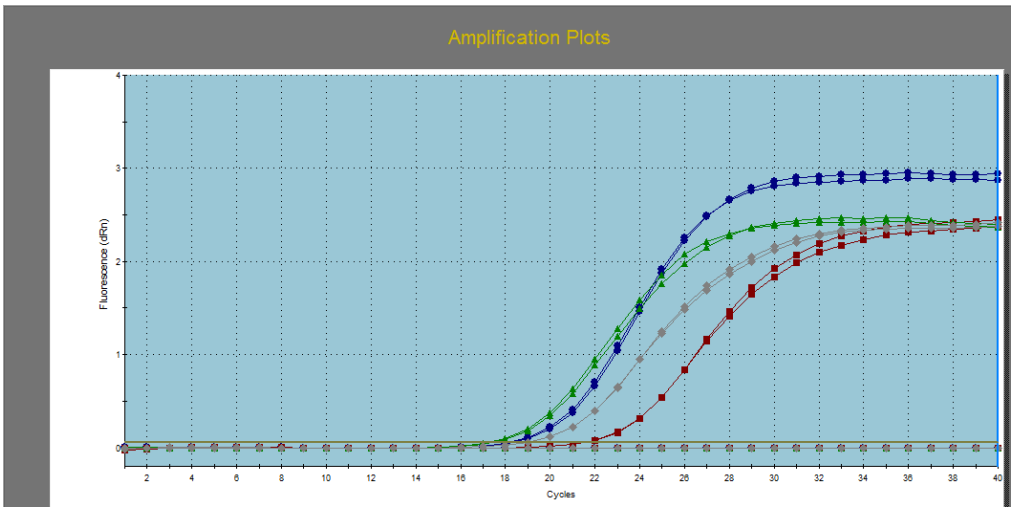
*: تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل (p< ۰/۰۵).

#: تفاوت معنی‌داری با گروه شم (p< ۰/۰۵).

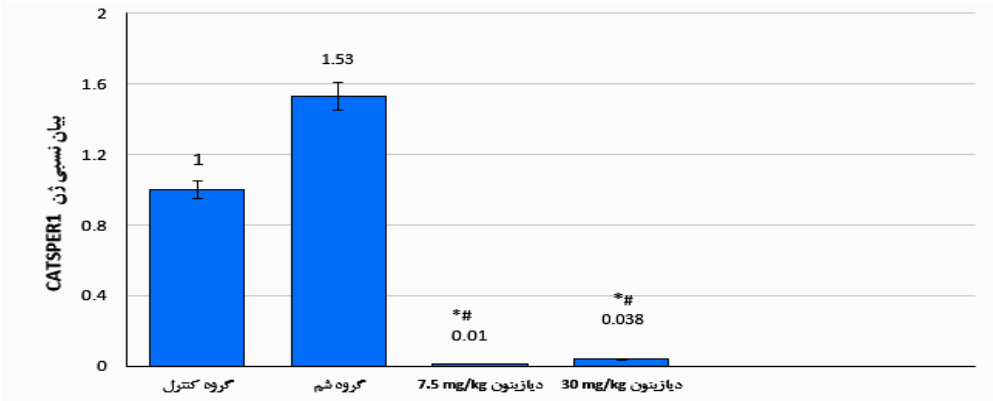
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

بررسی میزان بیان ژن CatSper1 در گروه‌های مختلف آزمون: میزان بیان ژن CatSper1 پس از دریافت دیازینون، در موش‌های بالغ توسط تکنیک Real-Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). در مقایسه کلی؛ تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان ژن گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (P =۰/۰۰۱). نتایج آنالیز آماری نشان داد که بیان ژن در گروه دیازینون۱ (P =۰/۰۰۲)، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. به علاوه، بیان ژن در گروه دیازینون۲ (P =۰/۰۰۳). نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری داشت. همچنین بیان ژن CatSper1 در گروه‌های دیازینون۱ (P =۰/۰۰۱)؛ و دیازینون۲ (P=۰/۰۰۱). نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری داشت.



شکل ۱. تصویر منحنی real-time PCR به‌دست آمده از نمونه‌ها، که مقایسه بین گروه‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار ۲. میزان بیان ژن CatSper1 در گروه‌های مختلف آزمون

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

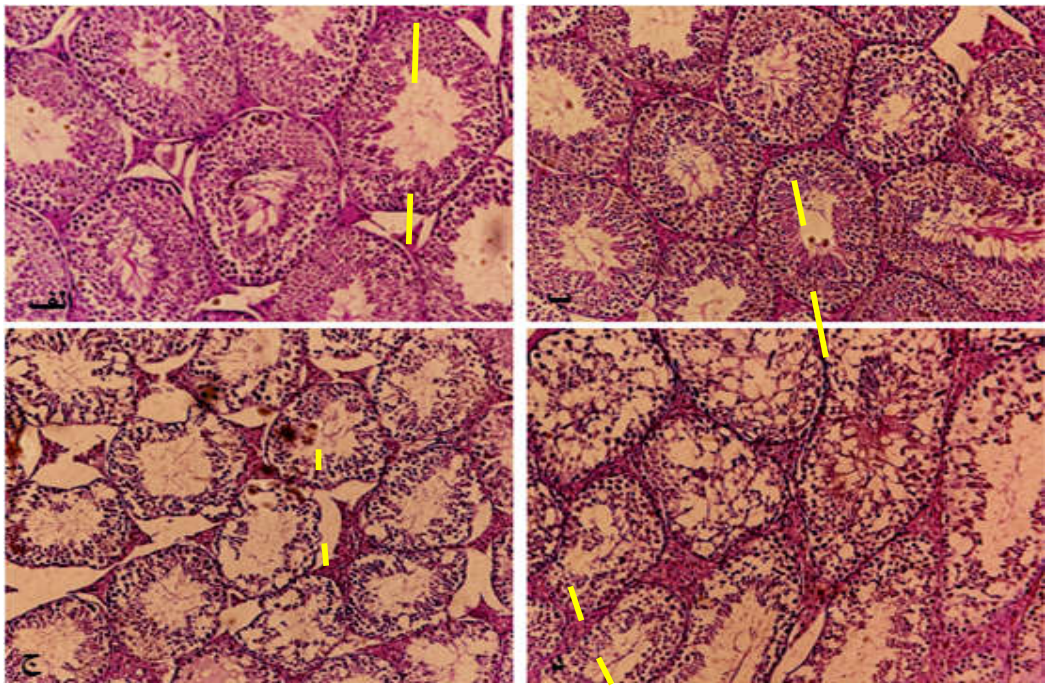
*: تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل (p< ۰/۰۵).

#: تفاوت معنی‌داری با گروه شم (p< ۰/۰۵).

بررسی ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در گروه‌های مختلف آزمون: به منظور بررسی اثر دیازینون بر بافت بیضه، مقاطع بافتی از بیضه موش‌های بالغ تهیه شد. در مشاهدات میکروسکوپی، بیضه موش‌های گروه کنترل و شم ظاهر طبیعی داشته، شامل مجاری منی‌ساز و بافت بینابینی طبیعی بودند. لوله‌های اسپرم‌ساز حاوی اسپرم و اپی تلیوم آن یک دست و حاوی اسپرم بود (شکل ۲ الف و ب). در بیضه موش‌های گروه دریافت‌کننده دیازینون کاهش در اسپرماتید و اسپرم بالغ، واکوئلیزاسیون و نکروز در اپی تلیوم ژرمینال به چشم می‌خورد. به علاوه، فضای بینابینی افزایش یافته بود (شکل ۲ ج- د). در مقایسه کلی؛ تفاوت معنی‌داری بین میزان ضخامت اپی تلیوم ژرمینال گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (P =۰/۰۰۱). همان‌طور که در جدول ۱ ملاحظه می کنید، ضخامت اپی تلیوم در گروه دیازینون۱ (P =۰/۰۰۳)، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. ضخامت اپی تلیوم در گروه دیازینون۲ (P =۰/۰۰۶) نیز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین بین کاهش در ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در گروه‌های دیازینون۱ (P =۰/۰۱) و دیازینون۲ (P =۰/۰۰۵) نسبت به گروه شم مشاهده شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]



شکل ۲. تصویر مقطع عرضی لوله‌های اسپرم ساز به ترتیب در گروه کنترل (الف)، گروه شم (ب)، گروه دیازینون ۱ (ج) و گروه دیازینون ۲ (د). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. بزرگنمایی ۲۰۰ × ضخامت اپی تلیوم در شکل با رنگ زرد مشخص شده است

جدول ۱. ضخامت اپی تلیوم ژرمینال در گروه‌های مختلف آزمون

گروه کنترل	گروه شم	گروه دیازینون ۱	گروه دیازینون ۲
۶۳/۷۱ ± ۳/۴۶	۶۳/۵۵ ± ۴/۳۹	$^{\#*}$ ۴۱/۲۶ ± ۵/۲۵	$^{\#*}$ ۳۸/۶۷ ± ۱/۷۹

*: تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل($p< ۰/۰۵$).

#: تفاوت معنی‌داری با گروه شم($p< ۰/۰۵$).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد تحرک اسپرم پس از تجویز دیازینون کاهش چشمگیری یافت. میزان این کاهش وابسته به دوز دریافتی دیازینون بود. جورسرایی و همکاران (۲۰۰۵) ، تأثیر سموم هینوزان ودیازینون بر پارامترهای اسپرم را در یک مرکز ناباروری در حالت In vitro بررسی کردند. نتایج نشان داد که این سموم باعث کاهش تعداد و تحرک اسپرم می‌شوند. این اثرات وابسته به دوز نبوده ولی با گذشت زمان تغییر می‌کند(۷). در مطالعه دیگری Okamura و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که دریافت دوز mg/kg ۳ دیازینون به مدت ۹ هفته باعث ایجاد قطره سیتوپلاسمی در سر اسپرم، افزایش اسپرم شکسته و کاهش تحرک اسپرم می‌شود(۸).

نتایج مطالعه Adamkovicova و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که دوز mg/kg ۴۰ دیازینون و دوز mg/kg۳۰ دیازینون باعث افزایش اسپرم با شکل غیرطبیعی و کاهش تحرک اسپرم می‌شود(۹). Adamkovicova و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که پس از تجویز mg/kg ۴۰ دیازینون، اسپرم با مرفولوژی غیرطبیعی افزایش یافت. به علاوه، تحرک اسپرم کاهش یافت(۱۱). سازگار با تحقیقات بالا، در مطالعه حاضر نیز تزریق دیازینون باعث کاهش در تحرک اسپرم شد.

در تحقیق حاضر کاهش معنی‌داری در بیان ژن CatSper1 در گروه‌های دریافت‌کننده دوز mg/kg ۷/۵ و mg/kg ۳۰ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. از بین ژن‌های CatSper 1-4، ژن CatSper1 کمتر دستخوش تغییر می‌شود و از تنظیم ژنی قوی‌تری برخوردار است. محمدی و همکاران (۲۰۱۷) اثرات تجویز ۶۰ میلی‌گرم سرب و ۱/۲۵ میلی‌گرم جیوه را در موش‌ها بررسی کردند. نتایج نشان داد که هر دو فلز سنگین باعث کاهش بیان ژن‌های CatSper 1, 2 می‌شود که این اثرات در مورد جیوه خیلی شدیدتر بود. به علاوه تجویز این دو ماده باعث کاهش کیفیت اسپرم و افزایش استرس اکسیداتیو شد(۲۳). همین محققان گزارش کردند تجویز نیکل و کادمیوم نیز بر بیان ژن CatSper مؤثر است(۲۴). Wang و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که دوزهای ۰، ۱۰، ۵۰ و ۲۵۰ میکرومول کلرید کادمیوم باعث کاهش زنده‌ماندن، تحرک و واکنش اکروزومی در اسپرم شد. بعد از دریافت کلرید کادمیوم ژن‌های CatSper1، ۳ و ۴ کاهش یافتند ولی ژن CatSper 2 تغییری محسوسی نداشت(۲۵).

نجفی و همکاران (۲۰۱۰) mg/kg ۷۰ دیازینون را به مدت ۶۰ روز به صورت خوراکی به موش‌های صحرایی بالغ دادند. نتایج نشان داد که دیازینون باعث آسیب به لوله‌های اسپرم ساز، آتروفی و نامنظم شدن آن‌ها و نیز کاهش قطر و ضخامت اپی تلیوم لوله‌های اسپرم ساز شد. به علاوه ادم بافتی در ناحیه زیر کپسول بیضه و بافت بینابینی مشاهده شد(۱۰). سازگار این مطالعه، در تحقیق حاضر تزریق دیازینون باعث کاهش ضخامت اپی تلیوم ژرمینال شد.

نتیجه گیری

با جستجویی که ما انجام دادیم تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثرات دیازینون بر بیان ژن CatSper انجام نشده است. بهتر بود در این پژوهش بیان پروتئین CatSper1 توسط ایمونوهیستوشیمی و یا وسترن بلات بررسی می‌شد که به محققین برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود. به علاوه، بررسی اثر دیازینون بر بیان دیگر ژن‌های خانواده CatSper پیشنهاد می‌گردد. نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که دیازینون با کاهش تحرک اسپرم و تغییرات دژنراتیو در اپی تلیوم ژرمینال بر باروری جنس نر اثر می‌گذارد. به علاوه بیان ژن CatSper1 را که از ژن‌های کلیدی باروری است کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از کارکنان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی مشهد تشکر کنند. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه آقای حمیدرضا فرج نژاد دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر به شماره ۹۱۱۰۳۴۰۶۲ است.

References

1. Hamidabadi HG, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, Forouzandeh M, Sobhani A. Functional Concentrations of BMP4 on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Primordial Germ Cells. Int J Fertil Steril. 2011;5(2):104-9.
2. Annelien Massart, Willy Lissens, Herman Tournaye, Katrien Stouffs. Genetic causes of spermatogenic failure. Asian J Androl. 2012; 14(1): 40–48.
3. Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicol Appl Pharmacol. 2005 15;202(2):189-98.
4. Perry MJ, Venners SA, Barr DB, Xu X. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. Reprod Toxicol. 2007; 23: 113-8.
5. Wang D, Singhasemanon N, Goh KS. A review of diazinon use, contamination in surface waters, and regulatory actions in California across water years 1992-2014. Environ Monit Assess. 2017;189(7):310.
6. Taghavi R, Tavakoli Tabasi K, Mogharabian N, Asadpour A, Golchian A, Mohamadi S, Ataran Kabiri A. The Effect of Acupuncture on Relieving Pain after Inguinal Surgeries. Korean J Pain. 2013; 26(1): 46–50.
7. Jor Saraei G, Beiki A, Yousef Nia Pasha Y, Alizadeh Navaei R. The in vitro effects of Hinosan and Diazinon on human sperm parameters. JBUMS. 2005; 7 (2):30-34
8. Okamura A, Kamijima M, Ohtani K, Yamanoshita O, Nakamura D, Ito Y, Miyata M, Ueyama J, Suzuki T, Imai R, Takagi K, Nakajima T. Broken sperm, cytoplasmic droplets and reduced sperm motility are principal markers of decreased sperm quality due to organophosphorus pesticides in rats. J Occup Health. 2009;51(6):478-87.
9. Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R, Krajcovicova V1, Grosskopf B, Massanyi P. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. Reprod Biol Endocrinol. 2016;14(1):42.
10. GR Najafi, S Salami, A Karimi. The effect of diazinon on testicular tissue in adult male rat: a histological study. J Urmia Univ Med Sci. 2010; 20 (4):313-319
11. Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R, Krajcovicova V, Grosskopf B, Massanyi P. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. Reprod Biol Endocrinol. 2016;14(1):42.
12. Povey AC. Gene-environmental interactions and organophosphate toxicity. Toxicology. 2010;278(3):294-304.
13. Chávez JC, De la Vega-Beltrán JL, José O1, Torres P, Nishigaki T, Treviño CL, Darszon A. Acrosomal alkalization triggers Ca2+ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. J Cell Physiol. 2018;233(6):4735-4747.
14. Beltrán C, Treviño CL, Mata-Martínez E, Chávez JC, Sánchez-Cárdenas C, Baker M, et al. Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2016;220:35-69.
15. Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? Oncotarget. 2017 10;8(2):3600-3627.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]

16. Parodi J. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. Syst Biol Reprod Med. 2014;60(2):65-71.
17- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers D. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature. 2003;413:603-9
18. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 2001; 413: 603-9 .
19. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle JK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. Proc Natt Acad Sci. 2003; 100: 14869 -74.
20. Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterization of a common interaction domain evidence for expression in testis. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 53-68.
21. Liu J, Xia J, Cho KH, Clapham DE, Ren D. CatSper beta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. J Biol Chem 2007; 282:18945-52.
22. Wang H, Liu J, Cho KH, Ren D. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. Biol Reprod 2009; 81:539-44.
23. Mohammadi Sh, Golamin M, Mohammadi M, Mansouri A, Mahmoodian R, Attari S, et al. Down-regulation of CatSper 1 and CatSper 2 genes by lead and mercury. Environ Toxicol Pharmacol. 2018; 59:82-6.
24. Mohammadi S, Gholamin M, Mansouri A, Mahmoodian RS, Babazadeh B, Kebriaei SM, et al. Effect of cadmium and nickel on expression of CatSper 1 and 2 genes in mice, Toxin Reviews, 2018; 37(3): 216-222, DOI: 10.1080/15569543.2017.1350192
25. Wang HF, Chang M, Peng TT, Yang Y, Li N, Luo T, et al. Exposure to Cadmium Impairs Sperm Functions by Reducing CatSper in Mice. Cell Physiol Biochem. 2017;42(1):44-54.
26. Mohammadi S, Rahmani F, Hasanian SM, Beheshti F, Akbari Oryani M, Ebrahimzadeh A, Farzadfar S. Effects of dioxin on testicular histopathology, sperm parameters, and CatSper2 gene and protein expression in Naval Medical Research Institute male mice. Andrologia. 2019; 11(51):1-7.
27. Attari S, Mohammadi S, Ebrahimzadeh A, Hosseinzadeh H, Soukhtanloo M, Rajabzadeh A**.** Effects of thymoquinone on sperm parameters, apoptosis, testosterone level, and oxidative stress in a mouse model of D-galactose-induced aging. Pharm Sci. 2018; 24(3): 180-186.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 1-29.
29. Mohammadi S. Protective Effect of N-Acetyl Cysteine Against Formaldehyde-Induced Neuronal Damage in Cerebellum of Mice. Pharmaceutical sciences. 2014; 20: 61-65.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-26]

[DOI: 10.29252/sjku.24.6.68]