مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۲ شماره ۱ فروردین و اردیبهشت ۱۳۸۹ صفحات ۷۹-۷۳

اثر سلنیوم بر روی بیان ژن CatSper در بیضه موش سوری مسن

شبنم محمدی : گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
منصوره موحدین: گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس: نویسنده رابط
Email: mansoure@modares.ac.ir
سید جواد مولی: گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۸۷/۷/۶ ، **پذیرش**: ۸۸/۶/۱

چکیده

زمینه و اهداف: خانواده ژنی CatSper 1-4 کانالهای کلسیمی منحصر به فردی را در اسپرم کد می‌کنند. این ژنها تنها در بیضه بیان می شوند و حضور آنها برای تحرک و قدرت باروری اسپرم ضروری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر سلنیوم بر روی بیان ژن CatSper در موش مسن بوده است.

روش بررسی: ۳۰ سر موش نر سوری ۱۲-۱۰ ماهه و ۳۰ سر موش نر سوری ۳-۲ ماهه بطور تصادفی به سه گروه (کنترل، شم و آزمون) تقسیم شدند. به گروه کنترل هیچ تزریقی انجام نشد. به گروه شم، نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروههای آزمون دوز ۰/۲ (mg/kg Na_2Seo_3, سلنیوم به صورت داخل صفاقی و به مدت ۵ هفته دریافت کردند. بعد از ۲۱، ۲۸، ۳۵ و۴۲ روز از شروع تزریقات، موشها به روش در رفتگی مهره های گردن شدند و یکی از بیضه ها برای واکنش Semi-Quentitative- RT-PCR استفاده شد. از نمونه های بیضه RNA استخراج و ژن β2m بعنوان کنترل داخلی انتخاب شد. محصول واکنش RT-PCR در ژل آگارز عکسبرداری و شدت نسبی بیان ژن با نرم افزار uvidoc سنجیده شد. در ضمن رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی اسپرمها جهت جایابی پروتئین CatSper انجام شد. سپس داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که افزایش معنی داری در میانگین بیان ژن CatSper موش های گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد ($P<۰/۰۵$). درمان با سلنیوم در موشهای مسن شدت نسبی بیان ژنی بیشتری را در مقایسه با موشهای بالغ نشان داد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی محل قرار گیری پروتئینهای CatSper را در ناحیه اصلی دم اسپرم و ناحیه آکروزومی سر اسپرم جایابی کرد.

نتیجه گیری: سلنیوم باعث افزایش بیان ژن CatSper (یکی از ژنهای مسئول تحرک اسپرم) می شود.

کلید واژه ها: سلنیوم، بیان ژن، موش

مقدمه

اخیراً یک خانواده از کانالهای کاتیونی ویژه اسپرم شامل CatSper1 تا CatSper4 شناسایی شدند. این پروتئین ها کانالهای یونی وابسته به ولتاژ هستند که بعنوان تنظیم کننده‌های تحرک اسپرم عمل می‌کنند (۱). CatSper1 در سال ۲۰۰۱، توسط Ren و همکاران (۱) شناسایی شد. این ژن نقش کلیدی در کنترل تحرک اسپرم دارد و یک کانال کلسیمی را کد می‌کند که محصول آن تنها در قسمت اصلی(Principal) دم اسپرم مستقر است و جریان ورودی کلسیم به داخل اسپرم را کنترل می‌کند. ورود یونهای کلسیم به نوبه خود تحرک اسپرم را کنترل می‌کند. کانال فوق انحصاراً در بیضه بیان می‌شود. حذف (ناک اوت Knock out) ژن CatSper در موش مشخص کرد که حضور این کانال برای باروری در موش‌های نر، تحرک طبیعی اسپرم و نفوذ آن به تخمک

و نیز برای ورود یون کلسیم ضروری می‌باشد. موش‌های فوق کاملاً عقیم بوده با این حال فیزیولوژی تولید مثل و سایر رفتارهای آنها، شبیه موش‌های طبیعی بود و هیچ‌گونه ناهنجاریهای جانبی دیگر به غیر از عدم تحرک اسپرم و ناباروری در آنها دیده نشد (۱). به دنبال آن Quill و همکاران (۲) نیز یک کانال یونی باز شونده توسط ولتاژ (CatSper2) را در سلولهای جنسی مذکر شناسایی کردند که الگوی بیان این ژن منحصر به بیضه بود و هیچ سیگنالی بیانی در دیگر بافتها مشاهده نگردید. با توجه به بیان ژن CatSper2 در اواخر اسپرماتوژنز، حذف این ژن بر روی وزن بیضه، بافت شناسی آن و تعداد سلولهای اسپرم اثری نگذاشت ولی با تمام این شرایط حذف ژن CatSper2 منجر به عقیمی کامل در جنس نر شد. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داد که CatSper2 برای ایجاد یک حالت بیش فعال تحرک اسپرم ضروری است و این تحرک نیز لازمه لقاح موفق می‌باشد (۲). با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک دو عضو دیگر این خانواده بنام‌های CatSper3 و CatSper4 شناسایی شد.CatSper3,4 نیز مثل دو عضو دیگر خانواده CatSper بطور اختصاصی در بیضه بیان می‌شوند (۳). ایمونوفلورسنت غیر مستقیم نشان داد که این پروتئین‌ها در ناحیه آکروزومی سر اسپرم، قرار دارند و ممکن است در واکنش آکروزمی نقش داشته باشند (۴).

با افزایش سن تغییرات دژنراتیوی در بافت بیضه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم دیده می‌شود (۸-۵). از جمله عواملی که اثر سمی روی کیفیت اسپرم دارد زیاد شدن رادیکالهای آزاد اکسیژن است که میزان کم آنها برای اسپرم ضروری است تا توانایی باروری را کسب کند ولی مقدار زیاد آنها باید دائماً غیر فعال شوند تا عملکرد سلول طبیعی بماند (۹). انواعی از آنتی اکسیدان‌ها رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند (۹). دو نوع آنتی اکسیدان وجود دارد: آنتی اکسیدانهای پیشگیری کننده که شامل پروتیئنهایی مثل آلبومین، سرولوپلاسمین و ...است که جلو تشکیل شدن ROS را می‌گیرند و به این ترتیب از شروع واکنش زنجیره ای جلوگیری می‌کنند در حالیکه آنتی اکسیدانهای جاروب کننده مثل ویتامین E، ویتامین C، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و سلنیوم ROS بوجود آمده را حذف می کند تا از غشای پلاسمایی در برابر پراکسیداسیون لیپید حمایت کنند (۱۰). آنتی‌اکسیدان سلنیوم به مقدار زیاد در فرآورده های دریایی، جگر و غلات یافت می‌شود (۱۱). این عنصر برای سیستم آنتی اکسیدانی داخل سلولی به عنوان یک جزء ساختاری گلوتاتیون پر اکسیداز است و به شکل گلوتاتیون پراکسیداز اثرات ویتامین E را تکمیل می‌کند (۱۲). بیضه یکی از ارگانهای مهم هدف برای سلنیوم است (۱۳). غلظت سلنیوم بافت بیضه در طول بلوغ با شروع اسپرماتوژنز افزایش می‌یابد (۱٤). شاید علت غلظت بالای سلنیوم در بیضه نقش حمایتی آن در ساختمان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در طول اسپرماتوژنز باشد (۱٤). سلنیوم در ساخت سلنوپروتئین‌ها شرکت می‌کند (۱۵). سلنوپروتئین‌ها قسمت عمده‌ای از کپسول میتوکندری ناحیه میانی اسپرم را تشکیل می‌دهند (۱۵). کمبود سلنیوم در موش صحرایی، منجر به ایجاد تغییر شکل غیرطبیعی اسپرم (دمهای غیرطبیعی و بی حرکت) می‌شود. مشخص شده است که این ناهنجاریها با افزایش شکنندگی کپسول میتوکندری اسپرم ارتباط دارند (۱۵). بنابراین سلنیوم برای ایجاد انرژی جهت حرکت اسپرم و همچنین برای اسپرماتوژنز ضروری است (۱۵).

تاکنون تحقیقی در زمینه اثر آنتی اکسیدانها بر بیان ژن CatSper انجام نشده است. بررسی مطالعات مختلف نشان می دهد که آنتی اکسیدانها بر روی بیان ژن تأثیر می‌گذارند. از آن جمله fischer و همکاران (۱٦) نشان دادند که کمبود سلنیوم و ویتامین E باعث down-regulation بیان ژنهای مؤثر در آپوپتوز، سیکل سلولی و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی می‌گردد. همچنین در مطالعه ای دیگر Shalini و همکاران (۱۷) گزارش کردند که کمبود سلنیوم منجر به کاهش بیان ژنهای cJun وcFos درسلولهای ژرم بیضه می‌شود. کاهش در این ژنها باعث کاهش تمایز سلولهای ژرم و درنتیجه کاهش باروری می شود. در مطالعات انجام شده هیچ گزارشی مبنی بر وجود رابطه بین بیان ژن CatSper و افزایش سن وجود ندارد و همچنین مشخص نشده است که آیا با تجویز آنتی اکسیدان ها تأثیری روی بیان ژن CatSper هم دارد یا نه؟ هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن CatSper در بیضه موش مسن پس از تجویز آنتی اکسیدان سلنیوم بوده است.

مواد و روشها

موشهای نر نژاد NMRI پس از خریداری از انستیتو پاستور تهران، برای تطابق با شرایط محیط به مدت ۲ هفته در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند. حیوانات تحت شرایط استاندارد از نظر غذایی و محیطی قرار گرفتند. گروههای سنی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

۳۰ سر موش بالغ ۳-۲ ماهه و ۳۰ سر موش مسن ۱۲-۱۰ ماهه.

در این تحقیق از سلنیوم به صورت سدیم سلنیت (Na_2Seo_3) محصول شرکت سیگما آلمان استفاده شد.۳۰ سر موش نر سوری ۱۲-۱۰ ماهه و ۳۰ سر موش سوری ۳-۲ ماهه به طور تصادفی به سه گروه (کنترل، شم و آزمون) تقسیم شدند. به ۵ سر موش گروه کنترل هیچ تزریقی انجام نشد. به ۵ سر موش گروه شم، هم حجم تزریق گروه آزمایش حلال سلنیوم (نرمال سالین) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروههای آزمایش دوز ۰/۲ mg/kg از سلنیوم (براساس دوزیابی انجام شده) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. تزریقات به مدت ۵ هفته و روزانه یک بار انجام شد. بعد از اتمام تزریقات، موشها به روش در رفتگی مهره های گردن کشته شدند و بعد از باز کردن حفره شکمی، یکی از بیضه‌ها خارج و تا مرحله استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

RNA کل با استفاده از محلول RNA plus (سیناژن) و طبق پروتکل شرکت سازنده، استخراج گردید. به این ترتیب که پس از

افزودن ۱ میلی لیتر محلول RNA plus و۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه شد. بعد از تکان دادن شدید، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و دور ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس به فاز رویی ایزوپروپانول افزوده شد. در ادامه پس از سانتریفوژ با شرایط قبلی، فاز بالایی دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دور ۷۵۰۰g سانتریفوژ شد. رسوب باقیمانده به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شد.

برای طراحی پرایمرها، توالی های مورد نیاز ژنهای خانواده CatSper و بتا-۲- میکروگلوبولین (β2m) از سایت NCBI بدست آمد. با استفاده از نرم افزار Generunner (نگارش ۳/۰۲، کمپانی Hosting software) پنج جفت پرایمر طراحی شدند (جدول۱).

واکنش رونویسی معکوس (Reverse Transcriptase) (۱۸)

به ۱ میکروگرم از RNAی استخراج شده ۱ میکرولیتر الیگوdT اضافه کرده و حجم آن با آب به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر(thermal cycler) انکوبه شد و سپس به RNAی دناتوره شده ٤ میکرولیتر بافر تکثیر ۵x، ۱RNasin میکرولیتر و۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۲۰mM) افزوده شد. مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از اضافه کردن آنزیم MMLV، میکروتیوب به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. محصول واکنش تا زمان استفاده در واکنش PCR، در دمای۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

به ۵ میکرلیتر و از محصول واکنش RT، ۵ میکرولیتر بافر تکثیر ۱۰X (سیناژن)، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP (۲۰mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن)، ۱ میکرولیتر پرایمر بالا و پایین دست (۲۰μM)، ۳ میکرولیتر$MgCl_2$ (۲۵mM) (سیناژن) ۳۵ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد. سپس میکروتیوب در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته و۳۰-۲۵ سیکل به صورت Denaturation (۹٤ درجه سانتیگراد۳۰ ثانیه) Annealing (۵۸/۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه)، Extention (۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه) و یک سیکل Extention نهایی(۷۲ درجه سانتیگراد ۱۰ دقیقه) اجرا شد. کلیه ژل های آگارز با استفاده از دستگاه Gel documentation (Uvitech، انگلیس) مورد عکسبرداری قرارگرفتند.

برای اطمینان از اینکه در هر واکنش میزان یکسانی از RNA بکار رفته و تفاوت احتمالی در شدت سیگنال باند مربوط به ژن CatSper هر گروه، ناشی از اختلاف در میزان RNA ی بکار رفته نبوده است، از ژن β2m بعنوان کنترل داخلی استفاده شد. الکترفورز محصولات PCR دو باند با اندازه های مختلف را برای هر ژن CatSper نشان داد که یک باند مربوط به ژنهای خانواده CatSper و دیگری مربوط به کنترل داخلی β2m بود. برای هر گروه سنی، آزمایشRT-PCR در سه سری مختلف از موشها تکرار شد و شدت سیگنال برای کلیه باندها به کمک نرم افراز Uvidoc سنجیده شد. به این ترتیب که شدت باند β2m (باند مرجع) و شدت باندهای CatSper تعیین شد و با تقسیم این دوعدد بر هم شدت نسبی بیان ژنهای CatSper بدست آمد.

به منظور جایابی زیر سلولی پروتئین CatSper در اسپرم از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. ابتدا اسمیر اسپرم به مدت ۲۰ دقیقه با متانول فیکس و بعد از شستشو با بافرPBS، عمل بازیافت (retrival) توسط بافر سیترات انجام شد. بعد از شستشوی مجدد، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب اکسیژنه ۳٪ قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با سرم ۱۰ درصد بز و در ادامه با آنتی‌بادی اولیه (آنتی بادی پلی کلونال CatSper محصول شرکت Santa Cruz) به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد آنتی بادی ثانویه (آنتی‌بادی horse-radish peroxidaseanti-anti goat) به مدت ۲ ساعت روی نمونه ها قرار گرفت و با محلول سوبسترای DAB در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت نمونه ها آبگیری و شفاف سازی شد و با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. در تمامی ارزیابی های ایمونوهیستوشیمی از گروه کنترل منفی استفاده شد. کلیه مراحل ایمونوهیستوشیمی برای این گروه مشابه گروه آزمایش بود با این تفاوت که در گروه کنترل منفی از آنتی بادی اولیه استفاده نشد (شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمایش بصورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. سپس داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 13- و آزمون آنالیز واریانس و آزمون تکمیلی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری$P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

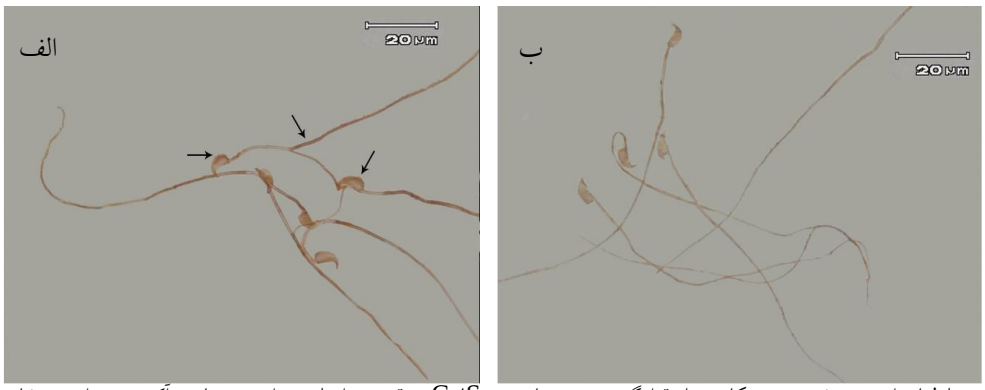
یافته ها

نمودار ۱ شدت نسبی بیان ژن CatSper در موشهای بالغ را نشان می دهد. باتوجه به نمودار، شدت نسبی بیان ژنCatSper1 در روز ۲۱ آزمایش نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری افزایش، در روز ۲۸ آزمایش کاهش و دوباره در روز ۳۵ افزایش و در روز ٤۲ کاهش یافته است. شدت نسبی بیان ژن CatSper2 در روز ۲۱ آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش و در روز ۲۸ آزمایش کاهش شدیدی یافته و دوباره در روز ۳۵ کاهش داشته ولی این کاهش نسبت به گروه کنترل معنی دار نبوده است. در روز٤۲ به طور معنی داری افزایش می یابد. نتایج مشابهی برای ژن CatSper3بدست آمد. شدت نسبی بیان ژن CatSper 4 در روز ۲۱ آزمایش افزایش داشته، سپس در روز ۲۸ و ۳۵ کاهش یافته و در روز ٤۲ افزایش بیان ژن مشاهده شد. نمودار ۲ شدت نسبی بیان ژن CatSper در موشهای مسن را نشان می دهد. باتوجه به این نمودار شدت نسبی بیان ژنCatSper۱ در روز ۲۱ نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری افزایش داشته، سپس در روز ۲۸و ۳۵ کاهش یافته و در روز ٤۲ افزایش بیان ژن مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل معنی دار بود. شدت نسبی بیان ژنCatSper۲ در روز

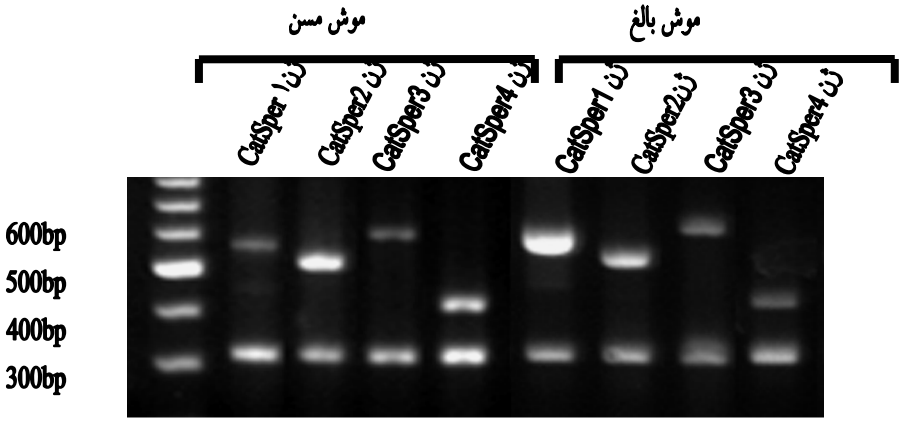
۲۱ آزمایش افزایش داشته ولی این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی دار نبوده است. در روز ۲۸ کاهش و در روز ۳۵ دوباره افزایش معنی دار بیان ژن مشاهده شد. در روز ٤۲ دوباره بیان ژن کاهش پیدا کرد. شدت نسبی بیان ژن CatSper۳ در روز ۲۱ افزایش داشته ولی در روزهای ۲۸ و ۳۵ کاهش یافت و در روز ٤۲ دوباره افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل پیدا کرد. شدت نسبی بیان ژنCatSper٤ در روز ۲۱ آزمایش افزایش داشته ولی این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی دار نبوده است. در روز ۲۸ آزمایش کاهش و در روز ۳۵ و ٤۲ دوباره افزایش بیان ژن مشاهده شد. تکنیک مورد استفاده در این تحقیق روش ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم بود. در پایان این تکنیک محصول نهایی واکنش ایمونوهیستوشیمی CatSper به شکل رسوب قهوه ای رنگ دیده شد که در واقع محل قرار گرفتن پروتئین CatSper را نشان می دهد (شکل۱). هیچگونه واکنش رنگی در نمونه های کنترل منفی دیده نشد. نمونه های کنترل منفی لام هایی هستند که در مرحله انکوبه کردن، به جای آنتی بادی اولیه از PBS یک صدم مولار استفاده شده است. نبود رسوب قهوه ای رنگ در رنگ آمیزی بدون آنتی بادی اولیه نشان دهنده اختصاصی بودن واکنش آنتی بادی اولیه می باشد. همان طور که در شکل ۱ دیده می شود محل قرارگیری پروتئین CatSper در ناحیه اصلی دم اسپرم و در ناحیه آکروزومی سر اسپرم قرار دارد. در مورد موشهای بالغ هم نتایج مشابهی بدست آمد.

جدول ۱: مشخصات تکثیری با ترکیب جفت پرایمرهای مختلف طراحی شده برای DNAی خانواده CatSper

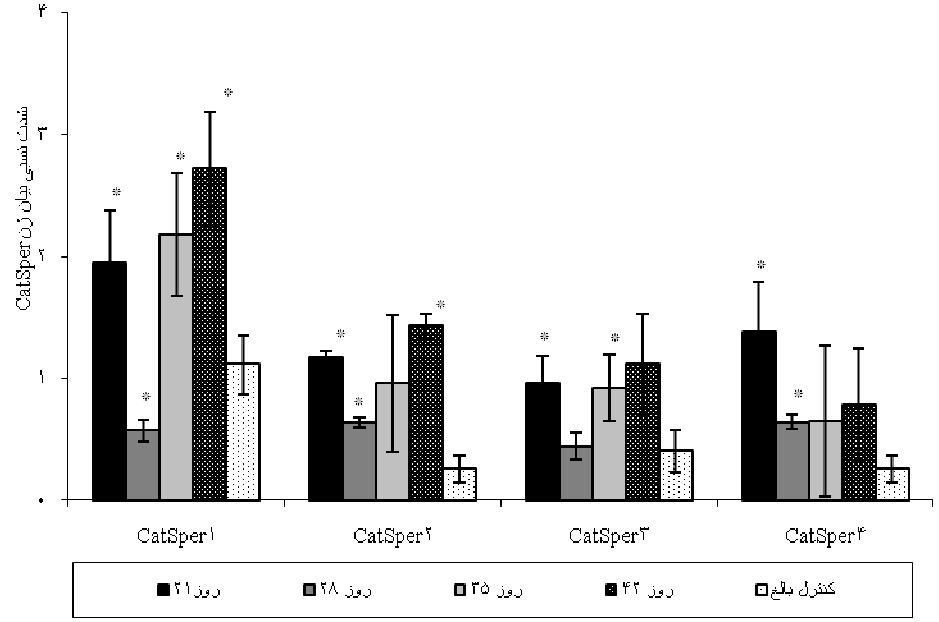
ژن	شماره دستیابی	پرایمر پائین دست	پرایمربالا دست	طول قطعه
CatSper1	AF407332	5CACACACCGGGAATATCTTC3´	5TCGGAGAACCACAGAGAAGAG3´	**566**
CatSper2	AF411816	5TGTCAGGCTGTTGCTTTGTC3´	5TGGCCACAGAGCAGTATTTG3´	**513**
CatSper3	AK014942	5GCTCTTCCTCCTCATGTTTG3´	5TCTTCCAACATCAGGCTCAG3´	**597**
CatSper4	AK077145	5´AAGGGGACACAGCAAAGATG3	5TATTCCAGCCATCCTTCCAG3´	**417**
β2m	NM-009735	5´TGACCGGCTTGTATGCTATC3´	5´CACATGTCTCGATCCCAGTAG3´	**316**



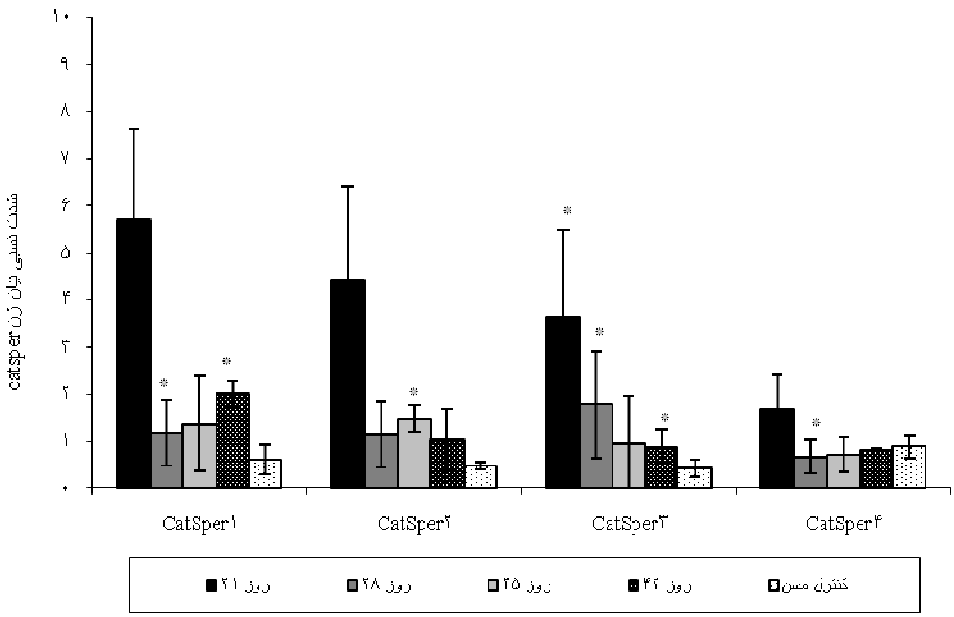
شکل ۱- الف) تصویر سلولهای اسپرم موش مسن. پیکان محل قرارگیری پروتئینهای CatSper در قسمت اصلی دم اسپرم و ناحیه آکروزومی اسپرم نشان می دهد. ب) تصویر نمونه کنترل منفی که به دلیل عدم استفاده از آنتی بادی اولیه هیچگونه رسوب رنگ DAB مشاهده نمی شود.



شکل ۲: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR ژن های β2m وCatSper در گروه کنترل مسن (سمت چپ) و در گروه کنترل بالغ (سمت راست).



نمودار ۱: شدت نسبی محصول ژنهای CatSper در موشهای بالغ در روزهای مختلف آزمایش. اندازه گیری بصورت نسبت شدت باند CatSper به β2m می باشد. نتایج بصورت Mean± SD نشان داده شده است.
× اختلاف معنی دار با گروه کنترل همان ژن (P<0.05).



نمودار ۲: شدت نسبی محصول ژنهای CatSper در موشهای مسن در روزهای مختلف آزمایش. اندازه گیری بصورت نسبت شدت باند CatSper به β2m می باشد. نتایج بصورت Mean± SD نشان داده شده است.
× اختلاف معنی دار با گروه کنترل همان ژن (P<0.05).

بحث

در تحقیق حاضر تأثیر سلنیوم بر شدت نسبی بیان ژن CatSperدر موش سوری مسن مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال این هدف از یکی از بیضه ها RNA استخراج و پس از انجام تکنیک RT-PCR، بیان ژن CatSper در آنها بررسی شد. با توجه به کارهای Nikpoor و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۰۴ که اعلام کرده بودند که ژن CatSper از هفته سوم پس از تولد در بیضه موش بیان می شود، انتظار می رفت که این ژن در رده های سنی تحقیق ما نیز بیان شود. در تحقیق حاضر موش های بالغ ۲-۳ ماهه و موش های مسن۱۲-۱۰ماهه بیان این ژن را حفظ کرده و با افزایش سن افت محسوسی در بیان این ژن وجود نداشت. درمان

با سلنیوم شدت بیان ژن CatSper در موشهای مسن نسبت به موشهای بالغ بیشتر افزایش داد. این نشان می دهد درمان با سلنیوم روی بیان ژن CatSper در موش مسن اثرگذار است و باعث up-regulation در ژن آنها می شود. ژن CatSper، یک ژن مهم در لقاح پستانداران است و درمان با سلنیوم می تواند بیان این ژن را افزایش دهد. با توجه به این که تغییرات شدت بیان ژن CatSper1 نسبت به بقیه اعضاء این خانواده ژنی بیشتراست نشان می دهد که این ژن از قابلیت تنظیمی قوی‌تری (حداقل در مورد سلنیوم) برخودار است. این تنظیم ژنی با افزایش سن تغییر نمی کند چون در موش مسن هم در روز ۲۱ آزمایش یک پیک بیانی برای این ژن مشاهده شد. شدت بیان ژنهای CatSper در روزهای ۲۱ و ۲۸ آزمایش در موشهای مسن بیشتر و در روزهای ۳۵ و ٤۲ در موش های بالغ بیشتر است. با توجه به این که این اولین تحقیق است که بر روی اثر تغذیه بر بیان ژن CatSper صورت گرفته است بررسی های مولکولی بیشتری برای علت این امر لازم به نظر می‌رسد.

تاکنون تحقیقی در زمینه اثر آنتی اکسیدانها بر بیان ژن CatSper انجام نشده است. بررسی مطالعات مختلف نشان می دهد که آنتی اکسیدانها بر روی بیان ژن تأثیرگذارند. از آن جمله Gan و همکاران (۲۰) با تجویز دوزهای متفاوتی از سلنیوم مشاهده کردند که تزریق دوز ۰/۰۲ mg/kg سلنیوم باعث افزایش بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز در بیضه و تجویز دوزهای ۰/۰٤ mg/kg و ۰/۰۸mg/kg باعث کاهش بیان ژن در بیضه می‌شود. همچنین fischer و همکاران (١٦) نشان دادند که کمبود سلنیوم و ویتامین E باعث down-regulation بیان ژنهایی مؤثر در آپوپتوز، سیکل سلولی و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی می گردد. در مطالعه ای دیگر Rota و همکاران (۲۱) گزارش کردند که رژیم غذایی با کمبود طولانی مدت ویتامین E باعث کاهش بیان ژنها در هیپوکامپ می شود. نتایج مطالعه Jervis و همکاران (۲۲) نشان می‌دهد که درمان با ویتامین E در رتهای مسن باعث کاهش بیان ژنهای مؤثر در استرس اکسیداتیو و همچنین کمبود ویتامین E باعث تشدید اثرات وابسته به سن و تجمع فرآورده های استرس اکسیداتیو می شود. نتایج تحقیق حاضر هم نشان داد سلنیوم بر روی بیان ژن CatSper در بیضه تأثیرگذار است و باعث افزایش بیان ژنCatSper می‌شود .

Ren و همکاران (۱)، با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسنت غیر مستقیم نشان دادند که پروتئین CatSper در ناحیه اصلی دم اسپرم قرار دارد. برای تعیین محل دقیق پروتئین در دم اسپرم از تکنیک میکروسکوپ الکترونی با ایونوگلد غیرمستقیم استفاده شد و حضور این پروتئین در غشای پلاسمایی ناحیه اصلی اسپرم تائید شد (۱). به دنبال آن Lobely (۳)، Quill (۲) و Hong –gong (۲۳) نیز محل پروتئین CatSper را در ناحیه فلاژلی اسپرم یافتند. در سال ۲۰۰۵ مطالعات Jin و همکاران (۴) نشان داد که پروتئین CatSper 3,4 در ناحیه آکروزومی سر اسپرم قرار دارد. نتایج تحقیق حاضر هم پروتئینهای CatSper را در دو ناحیه آکروزومی و ناحیه اصلی دم اسپرم جایابی کرد.

نتیجه گیری

در یک جمع بندی کلی می توان گفت درمان با سلنیوم روی بیان ژن CatSper در موش مسن اثر گذار است و باعث up-regulation در ژن آنها می شود. ژن CatSper، یک ژن مهم در اسپرماتوژنز پستانداران است و درمان با سلنیوم ممکن است بیان این ژن را افزایش دهد. بنابراین ممکن است تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی بتواند بعنوان راهکاری در بهبود اسپرم در نظر گرفته شود.

References:

1. 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**: 603-609.
2. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyper activated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 14869-14874.
3. Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D. Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: Characterisation of a common interaction domain and evidence for experssion in testis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; **53**(1): 53-67.
4. Jin J, Odoherty AM, Wang Sh, Zheng H, Sandres KM. CatSper3 and CatSper4 Encode Two Cation Channel-like Proteins Exclusively in the testis. *Biol Reprod* 2005; **105**: 454-468.
5. Homonnai ZT, Fainman N, David MP. Paz GF. Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *J Androl* 1982; **14**: 164-170.
6. Dondero F, Mazzilli F, Giovenco P, Lenzi A, Cerasaro M. Fertility in older men. *J Endocrinol Invest* 1985; **8**: 87-91.
7. Centola GM, Eberly S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration. *Fertil Steril* 1999; **72**: 803-808.
8. Haidl G, Jung A, Schill WB. Aging and sperm function. *Hum Reprod* 1996; **11**: 558-560.
9. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SR, Said TM. Role of antioxidant in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; **8**: 616-627.
10. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; **26**(6): 654-660.

11. Schwatrz S. Essentiality and metabolic function of Selenium. *Med Clin North Am* 1976; **60**: 745-758.
12. Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr* 2003; **133**: 151-178.
13. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil* 1996; **106**: 291-297.
14. Behne D, Hofer T, Von Berswardt WR, Elger W. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *J Nutr* 1982; **102**: 1682-1687.
15. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-dificient rats. *Reprod* 2004; **127**: 335-342.
16. Fischer A, Pallauf J, Gohil K, Weber SU. Effect of Selenium and Vitamin E Dificiency on Differential Gene Expression in Rat Liver. *Biochemical biophysical research communications* 2001; **285**: 470-475.
17. Shalini S, Banasal MP. Role of selenium in spermatogenesis: differential expression of cjun and cfos in tubular cells of mice testis. *Molecular cellular biochemistry* 2006; **292**: 27-38.
18. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. NewYork, California, Academic Press, 2001; PP: 94-98.
19. Nikpoor P, Mowla SJ, Movahedin M, Ziaee AM, Tiraihi T. CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod* 2004; **19**: 124-128.
20. Gan L, Liu Q, Xu H, Zhu Y, Yang XL. Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biol Trace Element Res* 2002; **89**: 165-175.
21. Rota C, Rimbach G, Minihane AM, Stoecklin E, Barella L. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. *Nutr Neurosci* 2005 **8**(1): 21-29.
22. Jervis KM, Robaire B. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging brown Norway rat epididymis. *Biol Reprod* 2004; **71**: 1088-1095.
23. Hong-gong Li, Hua Ali, Xiao-fang Ding, Hui Zhou, Cheng-liang Xiong. The expression and significance of CatSper 1 in human testis and ejaculated spermatozoa. *Asian J Androl* 2006; **8**: 301-306.