



تأثیر ان-استیل سیستئین بر تغییرات بیان ژنهای FAS و ERK در بیضه موشهای صحرایی تیمار شده با آکریل آمید

آرش پایه‌دار^{۱*}، مهرداد شریعتی^۱، الهام شهرزاد^۲

گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۵ اصلاح نهایی: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: آکریل آمید یک ماده سمی و سرطان‌زاست که در مواد غذایی نشاسته‌دار در حرارت بالا تولید می‌شود و اثرات منفی بر سیستم تولید مثلی دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر ان-استیل سیستئین بعنوان یک آنتی اکسیدان بر تغییرات بیان ژنهای FAS و ERK بعنوان ژنهای درگیر در آپاپتوزیس در بیضه موشهای صحرایی تیمار شده با آکریل آمید بود.

مواد و روش‌ها: موشهای صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۶ گروه ۶ تایی گروه‌بندی شدند. گروه کنترل هیچگونه تیمار دارویی دریافت نکرد در حالیکه حیوانات گروه تجربی ۱ ۵۰ mg/kg آکریل آمید به صورت گاوژ و گروه تجربی ۲ ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستئین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند. حیوانات گروه‌های تجربی ۳، ۴ و ۵ ابتدا ۵۰ mg/kg آکریل آمید به صورت گاوژ و سپس به ترتیب ۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستئین به صورت تزریق درون صفاقی به مدت ۲۸ روز دریافت نمودند. در پایان مطالعه، سطح بیان mRNA FAS و ERK با روش real-time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در گروه تجربی ۱ افزایش معنادار سطح بیان ژن FAS ($p < 0.05$) و کاهش معنادار سطح بیان ژن ERK ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل و تجربی ۲ مشاهده گردید. در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ افزایش معنادار سطح بیان ژن FAS ($p < 0.05$) و کاهش معنادار سطح بیان ژن ERK ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. در گروه تجربی ۵، تفاوت معناداری در بیان ژنهای FAS و ERK در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$).
نتیجه‌گیری: آکریل آمید می‌تواند با تغییر در بیان ژنهای FAS و ERK آپاپتوزیس را در بافت بیضه القا کند. در مقابل، ان-استیل سیستئین می‌تواند در دوز حداکثر (۴۰ mg/kg) با اثرات آنتی اکسیدانی موجب بهبود بیان ژنهای FAS و ERK شود و آپاپتوزیس القا شده توسط آکریل آمید را در بافت بیضه مهار کند.

واژه‌های کلیدی: آکریل آمید، ان-استیل سیستئین، بیضه، آپاپتوزیس، ژن FAS، ژن ERK

آرش پایه دار، مهرداد شریعتی، الهام شهرزاد. تأثیر ان-استیل سیستئین بر تغییرات بیان ژنهای FAS و ERK در بیضه موشهای صحرایی تیمار شده با آکریل آمید. مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۰؛ ۴(۱۱): ۶۱۷-۶۳۰.

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

مقدمه

امروزه به دلیل تغییر در سبک زندگی استفاده از غذاهای فرآوری شده و سرخ شده افزایش یافته است. استفاده از این مواد غذایی چالشی بزرگ ایجاد کرده است زیرا از یک طرف حرارت دهی بالا به مواد غذایی باعث افزایش کیفیت آنها و از طرف دیگر باعث ایجاد برخی مواد سمی در ترکیبات غذایی می شود (Koszucka et al., 2020). آکریل آمید با فرمول شیمیایی C_3H_5NO یک ماده سمی است که طی پخت مواد غذایی ناشسته دار در حراراتهای بالا (بالای ۱۲۰ درجه سانتی گراد) از طریق واکنش میلارد که میان قندهای احیا و اسیدهای آمینه است ساخته می شود (Berk et al., 2019). واکنش میلارد یک واکنش منفرد نیست بلکه مجموعه ای از واکنش های پیچیده است که طی فرآیندهای حرارتی رخ می دهد. در طی این واکنش غیر آنزیمی، قندهای احیا کننده (گلوکز و فروکتوز) با اسیدهای آمینه، عمدتاً آسپاراژین، متراکم می شوند تا N-گلیکوزید تولید کنند. N-گلیکوزید به نوبه خود طی واکنشهای مختلف ملانوئیدین را تولید می کند که دکربوکسیلاسیون بیشتر آن منجر به تشکیل آکریل آمید می شود (Rifai & Saleh, 2020). آکریل آمید می تواند از طریق دهان، پوست و استنشاق وارد بدن شود. علاوه بر این، به دلیل طیف گسترده ای از کاربردهای صنعتی غیرغذایی، بسیاری از افراد می توانند از طریق جذب پوستی یا استنشاق در معرض آکریل آمید قرار گیرند. بنابراین، مواجهه با آکریل آمید می تواند ترکیبی از منابع مختلف مانند رژیم غذایی، سیگار کشیدن، آب آشامیدنی و منابع شغلی باشد (Mojska et al., 2016; Rifai & Saleh, 2020). آکریل آمید پس از مصرف به سرعت و به طور کامل توسط دستگاه گوارش در موش های صحرایی جذب می شود و از

طریق گردش خون در بافت های محیطی توزیع می شود. تایید شده است که آکریل آمید می تواند از سد خونی-جفتی و همچنین از سد خونی-شیر مادر در شرایط *in vivo* عبور کند. آکریل آمید پس از جذب از طریق ۲ مسیر اصلی متابولیزه می شود. ۱- ممکن است توسط گلوکوتایون-S-ترانسفراز به N-Acetyl-S-(3-amino-3-oxopropyl)-L-cysteine-کونژوگه شود و یا ۲- ممکن است در واکنشی که توسط کمپلکس آنزیمی سیتوکروم P450 کاتالیز می شود (CYP450) به گلیسید آمید تبدیل شود. مشخص شده است که گلیسید آمید نسبت به ترکیب اصلی آکریل آمید نسبت به DNA و پروتئین واکنش پذیرتر است (Rifai & Saleh, 2020). سمیت عصبی پیامد اصلی قرار گرفتن در معرض آکریل آمید است. این ترکیب به عنوان یک سم عصبی در جوندگان و همچنین در انسان در نظر گرفته می شود. در شرایط آزمایشگاهی، نشان داده شد که آکریل آمید باعث القای آپوپتوزیس در آستروسیت های اولیه موش می شود و باعث اختلال عملکرد میتوکندری و آپوپتوزیس در سلول های میکروگلیال می گردد (Liu et al., 2015). گزارش شده است که آکریل آمید با مهار تمایز سلولی نوروبلاستوما و گلیوبلاستوم، سیستم عصبی را مختل می کند (Chen & Chou, 2015). علائم سمیت عصبی عبارتند از آتاکسی، ضعف عضلات اسکلتی، کاهش وزن، تورم دیستال و دژنراسیون آکسون ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی (Rifai & Saleh, 2020).

سمیت ژنتیکی آکریل آمید و متابولیت اصلی آن گلیسید آمید در چندین مطالعه بررسی شده است. نشان داده شده است که دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ mg/kg آکریل آمید بطور قابل توجهی باعث آسیب DNA می شود (Alzahrani, 2011). علاوه

بر این، قرار گرفتن طولانی مدت حیوانات با غلظت‌های بالای آکريل آميد در آب آشاميدنی منجر به ايجاد تومور در بافت‌های مختلف در هر دو جنس نر و ماده می‌شود (Exon, 2006). سمیت تولید مثلی آکريل آميد در هر دو جنس نر و ماده نیز گزارش شده است. کاهش اسپرم ایدیدیم، کاهش غلظت تستوسترون و پرولاکتین در موش‌های صحرایی نر نشان داده شده است. در موش‌های ماده تحت درمان با آکريل آميد نیز کاهش بقای سلول‌های گرانولوزی، کاهش تعداد اجسام زرد و تولید پروژسترون مشاهده شده است (Rifai & Saleh, 2020). آکريل آميد و متابولیت آن گلیسید آميد می‌توانند از طریق کاهش گلوکاتایون و افزایش پراکسیداسون لیپیدها و همچنین تغییر در بیان پروتئین‌های مرتبط با آپاپتوزیس مانند Bcl2, Bax و Caspase3 باعث القای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف بدن از جمله سیستم تولید مثلی شوند (Camacho et al., 2012; Mehri et al., 2015; Li et al., 2006; Pan et al., 2108). هر چند آپاپتوزیس جهت تکوین و عملکرد طبیعی اسپرماتوژنز ضروری است با این حال مشخص شده است که آکريل آميد می‌تواند با تغییر در بیان ژن‌های مسئول آپاپتوزیس بر سیستم تولید مثلی تاثیر بگذارد (Camacho et al., 2012). FAS یک پروتئین ترانس ممبران نوع I است که متعلق به خانواده گیرنده فاکتور نکروز تومور (TNF) و فاکتور رشد عصبی است و آپاپتوزیس را القا می‌کند. FASL توسط سلول‌های سرتولی بیان شده و به گیرنده خود (FAS) که توسط سلول‌های زایا بیان می‌شوند متصل می‌شود و با این مکانیسم جمعیت سلول‌های زایا را کنترل می‌کنند (Shukla et al., 2012). سیگنال دهی Fas/FasL یک عنصر کلیدی از مسیر سیگنال دهی گیرنده مرگ است و لیگاند آن FasL تاثیر عمیقی بر

تعادل تکثیر و آپاپتوزیس دارد. مسیر سیگنالینگ Fas/FasL یکی از مسیرهای اصلی تنظیمی آپاپتوزیس است (Lavrik, 2014). ERK یک کیناز تنظیم کننده سیگنال خارج سلولی و متعلق به خانواده پروتئین کینازهای فعال کننده میتوزن است که طیف وسیعی از فعالیت‌های سلولی مانند تکثیر، مهاجرت، تمایز و مرگ را کنترل می‌کند. فعالیت مناسب ERK باعث بقا و مهار آپاپتوزی سلول و فعالیت بیش از حد آن باعث ایجاد سرطان می‌شود اما در شرایط خاص می‌تواند عملکرد پروآپاپتوزی نیز داشته باشد (Sumizawa & Igisu, 2007; Cangol & Chambard, 2010).

ان-استیل سیستین پیش ساز اسید آمینه L-سیستین و در نتیجه آنتی اکسیدان گلوکاتایون است (Pieralisi et al., 2016). گروه سولفیدریل (SH-) در مولکول ان-استیل سیستین به طور مستقیم گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را مهار می‌کند (Radomska-Leśniewska & Skopiński, 2012). ان-استیل سیستین یک داروی موکولیتیک با تحمل خوب است که فعالیت گلوکاتایون S ترانسفراز را افزایش می‌دهد. در طی مصرف خوراکی، واکنش استیلاسیون ان-استیل سیستین هنگام عبور از روده کوچک و همچنین کبد اتفاق می‌افتد، بنابراین فراهمی زیستی آن به ۴-۱۰٪ کاهش می‌یابد. ان-استیل سیستین بیوستز گلوکاتایون را تحریک می‌کند، سم زدایی را تقویت می‌کند و مستقیماً به عنوان یک پاک کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند. این دارو یک آنتی اکسیدان قوی و یک گزینه درمانی بالقوه برای بیماری‌هایی است که با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مشخص می‌شوند (Mokhtari et al., 2017). ان-استیل سیستین با افزایش سطح گلوکاتایون درون سلولی و کاهش دیپلاریزاسیون غشای

میتوکندری از آپوپتوز و سمیت ژنی مرتبط با اکسیژن در سلول های اندوتلیال جلوگیری می کند (Amin et al., 2008). قدرت آنتی اکسیدانی ان-استیل سیستین به دلیل نقش آن به عنوان پیش ساز گلوکوتایون است که یکی از مهم ترین آنتی اکسیدان های طبیعی است. مطالعات نشان داده اند که حفظ تاثیر ان-استیل سیستین در برابر سمیت مواد شیمیایی به دلیل نقش دوگانه آن به عنوان یک نوکلئوفیل و به عنوان یک اهداکننده SH- است (Mokhtari et al., 2017).

با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی و ضد آپاپتوزیسی ان-استیل سیستین، به نظر می رسد این ماده بتواند اثرات منفی آکریل آمید را بر آپاپتوزیس در بافت بیضه تعدیل کند. از این رو این مطالعه با هدف بررسی تاثیر ان-استیل سیستین به عنوان یک آنتی اکسیدان بر سطح بیان ژنهای FAS و ERK به عنوان مارکرهای آپاپتوزیس در بافت بیضه موشهای صحرایی بالغ تیمار شده با آکریل آمید طراحی شد.

مواد و روش ها

حیوانات

موشهای صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی 220 ± 20 گرم و سن ۸ هفته از خانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تهیه گردید و در شرایط استاندارد در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، دوره نوردهی ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و رطوبت ۷۰٪ به صورت سه تایی در قفس های پلی کربنات نگهداری شدند. قبل از شروع مطالعه، حیوانات به منظور تطبیق با شرایط محیطی جدید، به مدت ۲ هفته با شرایط استاندارد ذکر شده در بالا نگهداری شدند. در طول این مطالعه، حیوانات دسترسی کافی و آزاد به غذای پلت شده و آب را داشتند. پروتکل این مطالعه براساس دستورالعمل های کار با حیوانات آزمایشگاهی به تصویب کمیته اخلاق

دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز قرار گرفت (شماره کد اخلاقی: IR.IAU.SHIRAZ.16330525951004).

طراحی مطالعه

حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه مساوی ($n=6$) شامل گروه های کنترل، تجربی ۱، تجربی ۲، تجربی ۳، تجربی ۴ و تجربی ۵ تقسیم شدند. گروه کنترل هیچگونه تجویزی دریافت نکرد. حیوانات گروه تجربی ۱ هر روز ساعت ۵ بعدازظهر آکریل آمید (Merck, Germany) با دوز 50 mg/kg به صورت گاوژ دریافت نمودند. حیوانات گروه تجربی ۲ هر روز ساعت ۹ صبح ان-استیل سیستین (Merck, Germany) با دوز 40 mg/kg به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند. حیوانات گروه تجربی ۳ هر روز ساعت ۹ صبح 10 mg/kg ان-استیل سیستین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند و سپس ساعت ۵ بعدازظهر 50 mg/kg آکریل آمید به صورت گاوژ دریافت نمودند. حیوانات گروه تجربی ۴ هر روز ساعت ۹ صبح 20 mg/kg ان-استیل سیستین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند و سپس ساعت ۵ بعدازظهر 50 mg/kg آکریل آمید به صورت گاوژ دریافت نمودند. حیوانات گروه تجربی ۵ هر روز ساعت ۹ صبح 40 mg/kg ان-استیل سیستین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند و سپس ساعت ۵ بعدازظهر 50 mg/kg آکریل آمید به صورت گاوژ دریافت نمودند. دوره آزمایش در تمامی گروه ها ۲۸ روز در نظر گرفته شد. دوزهای تجویزی ان-استیل سیستین و آکریل آمید بر اساس مطالعات قبلی تعیین گردید (۷، ۱۶). در پایان مطالعه، حیوانات با استفاده از اتر (Merck, Germany) بیهوش شدند و با باز نمودن حفره

شکمی، بیضه های همه ی موش های صحرایی جهت بررسی سطوح بیان ژنهای FAS و ERK خارج گردید.

آنالیز کمی بیان ژن FAS و ERK با استفاده از real-time PCR

برای استخراج RNA از بیضه ها، نمونه های بافتی کوچکی از بیضه ها جدا گردید و دو بار با فسفات بافر سالین شستشو شدند. سپس نمونه های جدا شده در نیتروژن مایع به مدت ۱ تا ۲ دقیقه قرار گرفتند و سپس با هاون پودر گردیدند. یک سی سی ترایزول یا Rio EX به آن اضافه گردید و با یک میکروتیوب با هموژنایزر دستی هر نمونه دو دقیقه روی یخ و به صورت متناوب هموژنیزه شد. پس از هموژنیزه نمودن، نمونه ۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت باقی مانده و سپس به منظور چربی زدایی ۲۰۰ لاندا کلروفرم به آن اضافه شد. نمونه ۱۵ ثانیه به صورت محکم تکان داده شد تا شیری رنگ شود. نمونه شیری رنگ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار در RCF ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی که شامل RNA بود با استفاده از میکروتیوب استریل جدا گردید. یک حجم از بافر RB1 (GeneAll Biotechnology, South Korea) به میکروتیوب حاوی محیط رویی اضافه شد. سپس محتویات میکروتیوب به ستون منتقل شد. پس از ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ در دمای اتاق در RCF ۱۲۰۰۰ محیط زیر ستون خارج شده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر SW1 (GeneAll Biotechnology, South Korea) به آن اضافه شد. پس از ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ در دمای اتاق و RCF ۱۲۰۰۰ دوباره محیط زیر ستون دور ریخته شد. در مرحله بعد به ستون ۵۰۰ میکرولیتر بافر RNW (GeneAll Biotechnology, South Korea) اضافه

شد و پس از سانتریفیوژ در دمای اتاق و RCF ۱۲۰۰۰ ستون ها به میکروتیوب جدید منتقل شده و به آن ۵۰ میکرولیتر Nucleas Water اضافه شد و بعد از سانتریفیوژ در RCF ۱۲۰۰۰ تخلیص گردید. به منظور ارزیابی کمی غلظت RNA دو لاندا از نمونه اصلی قبل از قراردادن بر روی ترموسایکلر از آن جدا و با دستگاه نانودراپ غلظت و میزان بازدهی RNA سنجیده شد. با استفاده از واکنش رونویسی معکوس، mRNA به DNA مکمل (cDNA) طبق دستورالعمل کیت شرکت سازنده (Biofact, South Korea) تبدیل گردید. پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر و ارزیابی کمی بیان ژن ها، بر روی cDNA ساخته شده واکنش real-time PCR به روش cyber green با استفاده از دستگاه Q rotor Gene ساخت شرکت Qiagen انجام گرفت. برای ارزیابی کار در این مرحله ژن β -Actin (جدول ۱) به عنوان ژن Housekeeping بررسی شد.

واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای FAS و ERK (Metabion, Germany) (جدول ۲) و مخلوط واکنش Power SYBR green PCR (Applied Biosystems, UK) master mix استفاده از دستگاه Real-time PCR system step one plus (Applied Biosystems, UK) طی برنامه ای شامل دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. میانگین CT ها با استفاده از $2^{-\Delta CT}$ محاسبه شد.

نام ژن	توالی پرایمر (5'-3')
β -Actin-Forward	CGTGCGTGACATTAAAGAGAA
β -Actin-Reverse	CGCTCATTGCCGATAGTGAT

جدول ۱. توالی پرایمر ژن β -Actin بعنوان ژن Housekeeping

نام ژن	توالی پرایمر (5'-3')
Fas-Forward	TATCACCACTATTGCTGGAGTCA
Fas-Reverse	GCTGTGTCTTGACATTGTCA
ERK-Forward	CGTTCAGATGTCGGTGTC
ERK-Reverse	AAAGGAGTCAAGAGTGGG

جدول ۲. توالی پرایمر ژن های Fas و ERK بعنوان مارکرهای آپاپتوزیس

آنالیز آماری

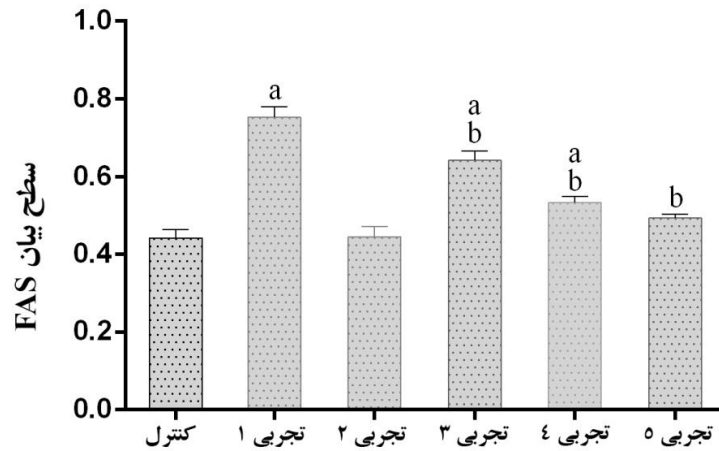
برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. بدین منظور ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov توزیع نرمال داده ها بررسی و تایید گردید و سپس با استفاده از آزمون one way ANOVA و تست تعقیبی LSD از لحاظ معناداری بین گروه کنترل و گروه های تحت تیمار در سطح $P < 0.05$ بررسی شدند. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین در نمودار (GraphPad Prism 6, Inc., San Diego, CA, USA) و جدول بیان گردیدند.

نتایج

یافته های سطح بیان ژن FAS

نمودار ۱ اندازه گیری سطح بیان ژن FAS با استفاده از RT-PCR را نشان می دهد. در گروه تجربی ۱ دریافت کننده

۵۰ mg/kg آکريل آميد، سطح بیان ژن FAS در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنادار نشان داد ($p < 0.05$). در گروه تجربی ۲ دریافت کننده ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستین، سطح بیان ژن FAS تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان نداد ($p > 0.05$). در گروه تجربی ۱ دریافت کننده ۵۰ mg/kg آکريل آميد و ۱۰ mg/kg ان-استیل سیستین و گروه تجربی ۲ دریافت کننده ۵۰ mg/kg آکريل آميد و ۲۰ mg/kg ان-استیل سیستین سطح بیان ژن FAS در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد اما این کاهش معنادار نبود ($p > 0.05$) در مقابل، هر دو گروه در مقایسه با گروه تجربی ۱ افزایش معنادار داشتند ($p < 0.05$). در گروه تجربی ۳ دریافت کننده ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستین و ۵۰ mg/kg آکريل آميد و ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستین سطح بیان ژن FAS تفاوت معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($p > 0.05$).

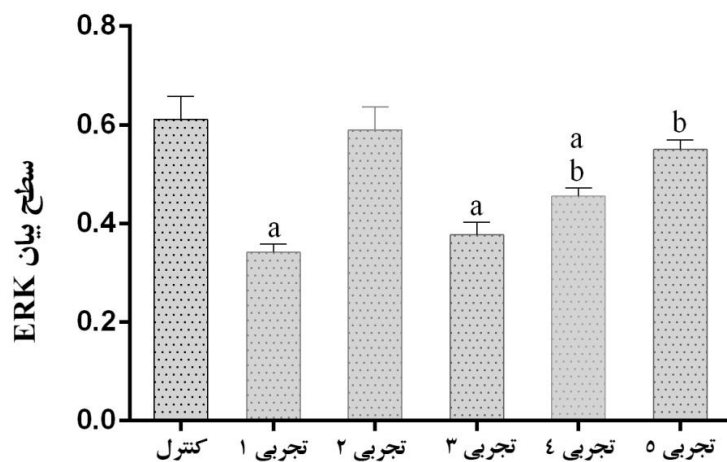


نمودار ۱. مقایسه میانگین و انحراف معیار از میانگین سطح بیان ژن FAS در گروه های مختلف. a: در مقایسه با گروه کنترل و b: در مقایسه با گروه تجربی ۱.

یافته های سطح بیان ژن ERK

نمودار ۲ سطح بیان ژن ERK را با استفاده از RT-PCR نشان می دهد. در گروه تجربی ۱ دریافت کننده ۵۰ mg/kg آکریل آمید، سطح بیان ژن ERK در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار نشان داد ($p < 0.05$). در گروه تجربی ۲ دریافت کننده ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستئین، سطح بیان ژن ERK تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان نداد ($p > 0.05$). در گروه تجربی ۱ دریافت کننده ۵۰ mg/kg آکریل آمید و ۱۰ mg/kg ان-استیل سیستئین، سطح بیان ژن

ERK در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار نشان داد ($p < 0.05$). در گروه تجربی ۲ دریافت کننده ۵۰ mg/kg آکریل آمید و ۲۰ mg/kg ان-استیل سیستئین سطح بیان ژن ERK در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار نشان داد ($p < 0.05$). با این حال، در مقایسه با گروه تجربی ۱ افزایش معنادار داشت ($p < 0.05$). در گروه تجربی ۳ دریافت کننده ۵۰ mg/kg آکریل آمید و ۴۰ mg/kg ان-استیل سیستئین سطح بیان ژن ERK تفاوت معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($p > 0.05$).



نمودار ۲. مقایسه میانگین و انحراف معیار از میانگین سطح بیان ژن ERK در گروه های مختلف. a: در مقایسه با گروه کنترل و b: در مقایسه با گروه تجربی ۱.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که آکريل آميد می تواند با افزایش سطح بیان mRNA FAS و کاهش سطح بیان mRNA ERK باعث القای آپاپتوزیس در بافت بيضه شود. مطالعات قبلی نشان می دهد که با افزایش دوز آکريل آميد سطح بیان FAS در بافت بيضه موشهای صحرایی افزایش می يابد (Camacho *et al.*, 2012) که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

آپاپتوزیس در مراحل مختلف تکوين بيضه عملکردهای متفاوتی دارد. آپاپتوزیس برای حفظ نسبت بهينه سلولهای زایا به سلولهای سرتولی و در نهایت تضمين اسپرماتوژنز موفق و باروری ضروری است. آپاپتوزیس در بيضه توسط مسیرهای مرتبط و نزدیک با سلولهای سرتولی، سلولهای زایا، سلولهای لیديگ و سيگنالهای مختلف ديگر واسطه می شود. چنین فرآيندهایی به طور انتخابی سلولهای زایایی را که توسط طيف گسترده ای از محرک های فیزیولوژیکی و محیطی آسیب دیده اند حذف می کنند. شواهد نشان می دهد که مواد سمی محیطی اثرات نامطلوبی بر عملکرد توليد مثل دارند. مطالعات اخير تاييد کرده اند که عدم تعادل بين بقای سلولی و آپاپتوزیس ناشی از بیماری و یا عوامل محیطی به طور جدی بر اسپرم زایی تاثیر می گذارد و در نهایت منجر به اولیگواسپرمی یا آزواسپرمی می شود (Wang & Su, 2018). مطالعات نشان می دهند که آکريل آميد به عنوان يک عامل محیطی می تواند استرس اکسیداتیو را در بدن با کاهش سطح گلوکوتایون و به دنبال آن افزایش سطح پراکسیداسیون لیپيدها، افزایش دهد. مطالعات در مورد اثرات سمی آکريل آميد بر روی موشهای نشان می دهد که این ماده تاثیرات عمده ای بر متیلاسیون DNA، توليد گونه های

فعال اکسيژن (ROS) و القای آپاپتوزیس دارد (Kashani *et al.*, 2021). ROS هم در حفظ باروری و هم در تغییرات پاتولوژیک بافت بيضه نقش مهمی دارد. سطوح فوق فیزیولوژیکی ROS، به ویژه برای دوره های طولانی مدت، می تواند استرس اکسیداتیو شديد با عواقب سمی را برای سلولها ایجاد کند. در این راستا، اسپرمها به دليل ساختار و ویژگی های بیوشیمیایی منحصر به فرد خود آسیب پذیر هستند. استرس اکسیداتیو می تواند مرگ سلولی را از طریق چندین مسیر آپاپتوزیسی از جمله فعال سازی گیرنده های Fas واسطه کند. افزایش بیان همزمان Fas و FasL در سلولهای زایای نشان می دهد که مرگ سلولی از طریق مسیر انتقال سيگنال آپاپتوزی با واسطه Fas/FasL می تواند از طریق مکانیسمهای اتوکرین و یا پاراکرین رخ دهد (Hasan *et al.*, 2022). مطالعات نشان می دهند که آکريل آميد می تواند آپاپتوزیس را از طریق مسیرهای وابسته به کاسپاز ۳ که در قطعه قطعه کردن هسته سلول در مراحل انتهایی آپاپتوز نقش دارد القا کند. به نظر می رسد آکريل آميد با فعال سازی کمپلکس پیام رسانی FAS و پروکاسپاز-۸ می تواند موجب فعال سازی کاسپاز-۸ شود. فعال سازی کاسپاز-۸ نیز می تواند به صورت مستقیم کاسپاز-۳ را فعال کند و نهایتا آپاپتوزیس را القا کند (Zhang *et al.*, 2009). ERKها معمولاً به عنوان فاکتورهای بقای سلول شناخته می شوند زیرا در پاسخ به فاکتورهای رشد می توانند تکثیر و تمایز سلول را تنظیم کنند. هر چند فعال سازی ERK می تواند آپاپتوزیس را سرکوب کند اما برخی از مطالعات نشان می دهند که برخی از عوامل توکسیک مانند آکريل آميد نیز می توانند با درگیر کردن مسیرهای ERK باعث آپاپتوزیس و نهایتا مرگ سلولی شوند (Sumizawa & Igisu, 2007). مارکرهای کلاسیک

آپاپتوزیس مانند کاسپاز-۳ و آنکسین-V با مسیر ERK در ارتباط می باشند. فعالیت مسیر ERK می تواند با توجه به ماهیت سلول و آسیب وارد شده موجب فعالسازی کاسپاز ۸ شود (۱۹). همچنین، تایید شده است که مهار مسیر ERK با استفاده از یک مهارکننده دارویی، حساسیت سلولها را به فعالسازی کاسپاز و آپاپتوزیس ناشی از Fas افزایش می دهد (Besirli et al., 2012). با توجه به نتایج این مطالعه می توان استدلال نمود که کاهش سطح بیان ERK با افزایش سطح بیان Fas در بافت بیضه موشهای صحرایی مرتبط می باشد. بنابراین مهار ERK توسط آکريل آميد موجب افزایش فعالیت مسیر Fas و در نتیجه القای آپاپتوزیس در بافت بیضه گردیده است.

مطابق با نتایج این مطالعه، تجویز ان-استیل سیستئین با دوز ۴۰ mg/kg در موشهای صحرایی تیمار شده با آکريل آميد با کاهش سطح بیان Fas و افزایش سطح بیان ERK در مقایسه با گروه تجربی ۱ همراه بود به گونه ای که سطح هر دو ژن تفاوت معناداری با گروه های کنترل نداشت. ان-استیل سیستئین یک آمینوتیول و پیش ساز مصنوعی سیستئین داخل سلولی و گلوکوتایون است و بنابراین بعنوان یک آنتی اکسیدان مهم در نظر گرفته می شود. ان-استیل سیستئین به طور گسترده به عنوان یک ابزار تحقیقاتی در زمینه تحقیقات آپاپتوزیس برای بررسی نقش ROS در القای آپاپتوزیس استفاده می شود. به طور کلی فرض بر این است که عملکرد ان-استیل سیستئین به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی آن یا مهار رادیکالهای آزاد از طریق افزایش سطح گلوکوتایون درون سلولی ناشی می شود (Sun, 2010). اخیراً ثابت شده است که ان-استیل سیستئین با حفظ محتوای گلوکوتایون درون سلولی و کاهش دپلاریزاسیون غشای میتوکندری از

آپاپتوزیس جلوگیری می کند. علاوه بر این، ان-استیل سیستئین بعنوان یک مکمل غذایی بی خطر تایید شده است و ممکن است در درمان بالینی بیماریهایی که با واسطه ROS هستند، مفید باشد. مطالعات نشان می دهند که ان-استیل سیستئین می تواند افزایش بیان کاسپاز-۳، کاسپاز-۸ و Fas را در سلولهای اپتلیال روده خوک معکوس کند و از القای آپاپتوزیس جلوگیری کند (Zhu et al., 2013). دو مسیر اصلی آپاپتوزیس وجود دارد: ۱- مسیر درونی (آپاپتوزیس وابسته به میتوکندری) و مسیر بیرونی (آپاپتوزیس وابسته به Fas). مسیر درونی با واسطه میتوکندری است و عمدتاً با فعال شدن کاسپاز-۹ مشخص می شود، در حالی که مسیر بیرونی شامل کاسپاز-۸ است که از طریق فعال شدن گیرنده های مرگ غشایی، مانند Fas فعال می شود. هر دو این مسیرها به یک مرحله مشترک ختم می شوند که به فعال سازی پروتئولیتیک کاسپاز-۳ نیاز دارد و باعث ایجاد یک آبشار فعال سازی کاسپاز می شود (Riedl & Shi, 2004). از آنجا که تیول فعالیت بسیاری از آنزیمها را تعدیل می کند نشان داده شده است که ان-استیل سیستئین قادر است تا فعالیت آنزیم مسئول شکافتگی Fas و کاسپاز-۳ را تعدیل کند (Juric et al., 2009; Delneste et al., 1996). عملکرد پروآپاپتوزیس مسیر ERK برای آپاپتوزیس ناشی از عوامل آسیب رسان به DNA به خوبی ثابت شده است. فعالیت ERK به ویژه در آپاپتوزیس با واسطه سیس پلاتین در سلول های کلیوی نقش دارد. فعالیت ERK همچنین در مرگ سلولی ناشی از ترکیبات ضد توموری مختلف نقش داشته است. اکثر این داروها مسیر آپاپتوتیک درونی را القا می کنند. با این حال، فعالیت ERK در فعال سازی مسیر آپاپتوتیک بیرونی توسط لیگاندهای گیرنده مرگ مانند

FAS، کاهش سطح بیان ژن ERK و القای آپاپتوزیس در بافت بیضه موشهای صحرایی می شود. با این حال تجویز ان-استیل سیستین در دوز حداکثر (40 mg/kg) در موش های صحرایی تیمار شده با آکریل آمید باعث کاهش سطح بیان ژن FAS، افزایش سطح بیان ژن ERK و کاهش آپاپتوزیس گردید. بنابراین بنظر می رسد استفاده از ان-استیل سیستین بتواند در کاهش اثرات منفی آکریل آمید بر بیان ژنهای درگیر در آپاپتوزیس بافت بیضه موشهای صحرایی موثر باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون و شیراز و کلیه افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری و حمایت نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که تعارض منافی وجود ندارد.

TNF α و FAS گزارش شده است. مرگ سلولی ناشی از سایر مسیرهای مرگ که در پاسخ به استرس اکسیداتیو، به ویژه در پاسخ به تیمار با ONOO⁻، H₂O₂ یا NO رخ می دهد نیز به فعالیت ERK نیاز دارد (Cagnol & Chambard, 2010). ان-استیل سیستین با مهار فاکتورهای التهابی و فعال نمودن سطح بیان ERK نقش مهمی در قدرت بقای کندروسیت ها بازی می کند. همچنین، نشان داده شده است که ان-استیل سیستین از آپاپتوزیس بواسطه از دست دادن حمایت تغذیه ای (عدم فاکتور رشد عصبی) جلوگیری می کند و با القای مسیر ERK، بقای نورون ها را ارتقا می دهد (Li et al., 2000). از محدودیتهای این مطالعه می توان به کوتاه بودن دوره مطالعه و عدم سنجش فاکتورهای التهابی و آنتی اکسیدانی اشاره نمود لذا پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی موارد ذکر شده در نظر گرفته شود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آکریل آمید با دوز 50 mg/kg در مدت 28 روز باعث افزایش سطح بیان ژن

References

- Alzahrani HAS. Protective effect of l-carnitine against acrylamide-induced DNA damage in somatic and germ cells of mice. Saudi J Biol Sci, 2011; 18(1): 29-36.
- Amin AF., Shaaban OM. and Bediawy MA. N-acetyl cysteine for treatment of recurrent unexplained pregnancy loss. Reprod Biomed Online, 2008; 17(5): 722-726.
- Berk E., Hamzalıoğlu A. and Gökmen V. Investigations on the Maillard Reaction in

Sesame (*Sesamum indicum* L.) Seeds Induced by Roasting. J Agric Food Chem, 2019; 67(17): 4923-4930. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01413.

Besirli CG., Zheng QD., Reed DM. and Zacks DN. ERK-mediated activation of Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (Faim2) prevents apoptosis of 661W cells in a model of detachment-induced photoreceptor cell death. PLoS One, 2012; 7(9): e46664. doi: 10.1371/journal.pone.0046664.

- Cagnol S. and Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*, 2010; 277(1): 2-21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x.
- Camacho L., Latendresse JR., Muskhelishvili L., Patton R., Bowyer JF., Thomas M., et al. Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicol. Lett*, 2012; 211(2): 135-143.
- Cagnol S. and Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*, 2010; 277(1): 2-21.
- Chen JH. and Chou CC. Acrylamide inhibits cellular differentiation of human neuroblastoma and glioblastoma cells. *Food Chem Toxicol*, 2015; 82: 27-35.
- Delneste Y., Jeannin P., Sebille E., Aubry JP. and Bonnefoy JY. Thiols prevent Fas (CD95)-mediated T cell apoptosis by down-regulating membrane Fas expression. *Eur J Immunol*, 1996; 26(12): 2981-8.
- Exon JH. A review of the toxicology of acrylamide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2006; 9(5): 397-412.
- Hasan H., Bhushan S., Fijak M. and Meinhardt A. Mechanism of inflammatory associated impairment of sperm function, spermatogenesis and steroidogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022; 13: 897029. doi: 10.3389/fendo.2022.897029.
- Juric V., Chen CC. and Lau LF. Fas-mediated apoptosis is regulated by the extracellular matrix protein CCN1 (CYR61) in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*, 2009; 29(12): 3266-79. doi: 10.1128/MCB.00064-09.
- Kashani MH., Ramezani M. and Piravar Z. The effect of acrylamide on sperm oxidative stress, total antioxidant levels, tyrosine phosphorylation, and carboxymethyl-lysine expression: A laboratory study. *Int J Reprod Biomed*, 2021; 19(7): 625-636. doi: 10.18502/ijrm.v19i7.9473.
- Koszucka A., Nowak A., Nowak I. and Motyl I. Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated European Union legal regulations in food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020; 60(10): 1677-1692. doi: 10.1080/10408398.2019.1588222.
- Lavrik IN. Systems biology of death receptor networks: live and let die. *Cell Death Dis*, 2014; 5: e1259.
- Li SX., Cui N., Zhang CL., Zhao XL., Yu SF. and Xie KQ. Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the rat nervous system. *Toxicology*, 2006; 217(1): 46-53.
- Li WQ., Dehnade F. and Zafarullah M. Thiol antioxidant, N-acetylcysteine, activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 275(3): 789-94. doi: 10.1006/bbrc.2000.3385.

- Liu Z., Song G., Zou C., Liu G., Wu W., Yuan T., et al Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free Radic Biol Med*, 2015; 84: 42-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.013.
- Mehri S., Abnous K., Khooei A., Mousavi SH., Shariaty VM. and Hosseinzadeh H. Crocin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rat through inhibition of oxidative stress. *Iran J Basic Med Sci*, 2015; 18(9): 902-8.
- Mojska H., Gielecińska I. and Cendrowski A. Acrylamide content in cigarette mainstream smoke and estimation of exposure to acrylamide from tobacco smoke in Poland. *Ann Agric Environ Med*, 2016; 23(3): 456-461.
- Mokhtari V., Afsharian P., Shahhoseini M., Kalantar SM. and Moini A. A review on various uses of n-acetyl cysteine. *Cell J*, 2017; 19(1): 11-17. doi: 10.22074/cellj.2016.4872.
- Pan X., Wu X., Yan D., Peng C., Rao C. and Yan H. Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF- κ B pathways regulated by MAPKs. *Toxicol Lett*, 2018; 288: 55-64.
- Pieralisi A., Martini C., Soto D., Vila MC., Calvo JC. and Guerra LN. N-acetylcysteine inhibits lipid accumulation in mouse embryonic adipocytes. *Redox Biol*, 2016; 9: 39-44. doi: 10.1016/j.redox.2016.05.006.
- Radomska-Leśniewska DM. and Skopiński P. N-acetylcysteine as an anti-oxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications. *Cent J Immunol*, 2012; 37: 57-66.
- Riedl SJ. And Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004; 5: 897-907.
- Rifai L. and Saleh FA. A review on acrylamide in food: occurrence, toxicity, and mitigation strategies. *Int J Toxicol*, 2020; 39(2): 93-102. doi: 10.1177/1091581820902405.
- Shukla KK., Mahdi AA. and Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012; 4: 746-54.
- Sumizawa T. and Igisu H. Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol*, 2007; 81(4): 279-282.
- Sun SY. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol Ther*, 2010; 9(2): 109-10. doi: 10.4161/cbt.9.2.10583.
- Wang M. and Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Syst Biol Reprod Med*, 2018; 64(2): 93-102. doi: 10.1080/19396368.2017.1422046..
- Zhang X., Chen F. and Huang Z. Apoptosis induced by acrylamide is suppressed in a 21.5% fat diet through caspase-3- independent pathway in mice testis. *Toxicol Mech Methods*, 2009; 19(3): 219-24.

Zhu L., Cai X., Guo Q., Chen X., Zhu S. and Xu J. Effect of N-acetyl cysteine on enterocyte apoptosis and intracellular signalling pathways' response to oxidative stress in weaned piglets. Br J Nutr, 2013; 110(11): 1938-47. doi: 10.1017/S0007114513001608.



Effect of N-acetylcysteine on FAS and ERK Genes Expression Changes in Testicular Tissue of Rats Treated with Acrylamide

Arash Payehdar^{1*}, Mehrdad Shariati¹, Elham Shahrazad²

¹Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

²Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received: 26/Dec/2021

Revised: 09/Feb/2022

Accepted: 14/Feb/2022

Abstract

Background and aim: Acrylamide is a toxic and carcinogenic substance that is produced in starchy foods at high heat and has negative effects on the reproductive system. The purpose of this study was to investigate the effect of N-acetylcysteine as an antioxidant on changes in the expression of FAS and ERK genes as genes involved in apoptosis in the testes of rats treated with acrylamide.

Materials and Methods: Adult male Wistar rats were randomly grouped into 6 groups of 6. The control group did not receive any drug treatment, while the animals of the experimental group 1 received 50 mg/kg acrylamide by gavage and experimental group 2 received 40 mg/kg N-acetylcysteine intraperitoneally injection. The animals of experimental groups 3, 4 and 5 first received 50 mg/kg acrylamide by gavage and then received 10, 20 and 40 mg/kg N-acetylcysteine intraperitoneally respectively, for 28 days. At the end of the study, FAS and ERK mRNA expression levels were measured by real-time PCR method.

Results: In experimental group 1, there was a significant increase in FAS gene expression level ($p < 0.05$) and a significant decrease in ERK gene expression level ($p < 0.05$) compared to control and experimental group 2. In experimental groups 3 and 4, there was a significant increase in FAS gene expression level ($p < 0.05$) and a significant decrease in ERK gene expression level ($p < 0.05$) compared to the control group. In experimental group 5, there was no significant difference in the expression of FAS and ERK genes compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: Acrylamide can induce apoptosis in testicular tissue by changing the expression of FAS and ERK genes. On the other hand, N-acetylcysteine can improve the expression of FAS and ERK genes in the maximum dose (40 mg/kg) with antioxidant effects and inhibit acrylamide-induced apoptosis in testicular tissue.

Keywords: Acrylamide, N-acetylcysteine, Testis, Apoptosis, FAS gene, ERK gene

Cite this article as: Arash Payehdar, Mehrdad Shariati, Elham Shahrazad. Effect of N-acetylcysteine on FAS and ERK genes expression changes in testicular tissue of rats treated with acrylamide. J Altrn Vet Med. 2021; 4(11): 617-630.

* Corresponding Author

Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

E-mail: arash2347@gmail.com, Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5281-6114>