

Effect of Aflatoxin B1 on Histomorphometric Parameters of Testis in Male Mature Albino Mouse

Toraj Zamir Nasta¹, Mazdak Razi^{1}, Shapour Hassanzadeh¹, Hassan Malekinejad²*

¹Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

²Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding Author:
Mazdak Razi, Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Email:
mazdak.razi@gmail.com

Received: 22 Jan, 2016

Accepted: 4 Apr, 2016

Abstract

Background and Objectives: Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin, which is produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Among four types of AFB (AFB1, AFB2, AFB3, and AFB4), AFB1 is the most abundant and toxic in the world. Aflatoxin decreases sperm production and quality. In the present study, the effect of AFB1 was investigated on spermatogenesis, spermiogenesis, and cell apoptosis in the testicular tissue.

Methods: In this experimental study, 24 albino mice were divided into 4 groups; control group intraperitoneally received 0.2 ml corn oil and experimental groups received AFB1 (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 DNA damage was evaluated using DNA Ladder method. Data analysis was carried out using one-way ANOVA at the significance level of $p < 0.05$.

Results: In this study, AFB1 led to tissue damage, especially in germ cells line. The percentage of seminiferous tubules with differentiation indices, tubular repopulation, and negative spermiogenesis, increased in the mice received AFB1; seminiferous tubules diameter and germinal epithelium thickness, significantly decreased ($p < 0.05$). Finally, AFB1 increased the DNA damages.

Conclusion: The findings of this study revealed that AFB1 increases testicular cell apoptosis via DNA damages, also it can increase differentiation indices, tubular differentiation, and spermiogenesis in testicular tissue, which consequently lead to decrease in sperm production and quality.

Keywords: Aflatoxin B1; Spermatogenesis; Spermiogenesis; DNA damage; Mice.

تأثیر آفلاتوکسین B1 بر پارامترهای هیستومورفومتریکی بیضه در موش سوری نر بالغ

تورج ضمیرنستا^۱، مزدک رازی^{۱*}، شاپور حسن زاده^۱، حسن ملکی نژاد^۲

^۱گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آفلاتوکسین B1 (AFB1)، میکوتوکسینی است که به وسیله قارچ آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس تولید می‌شود. AFB1 در بین چهار نوع AFB1، AFB2، AFB3 و AFN4، فراوان‌ترین و سمی‌ترین نوع در دنیا است. آفلاتوکسین، تولید و کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر تأثیر AFB1 بر روند اسپرماتوژنز، اسپرمیوژنز و آپوپتوز سلولی در بافت بیضه بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۴ قطعه موش سوری در ۴ گروه کنترل قرار گرفتند. گروه کنترل؛ ۰/۲ میلی گرم روغن ذرت و گروه‌های آزمایشی؛ AFB1 (دوز ۲۰ میکروگرم) را به ترتیب ۷، ۱۵ و ۳۵ روز با تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. متعاقب ۷، ۱۵ و ۳۵ روز، نمونه‌های بافت بیضه گرفته شد و بعد از تهیه مقاطع بافتی، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین (H&E) انجام گرفت. پارامترهای هیستومورفومتریکی و آسیب DNA به روش DNA Ladder

ارزیابی گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز یک طرفه در سطح معنی داری، $p < 0.05$ تحلیل شدند. **یافته‌ها:** در این مطالعه، AFB1 منجر به آسیب بافتی، به ویژه در رده سلول‌های زایا گردید. درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضرایب تمایزی، جایگزینی لوله‌ای و اسپرمیوژنز منفی در موش‌های دریافت‌کننده AFB1، افزایش و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم ژرینال، به طور معنی داری ($p < 0.05$) کاهش یافت. در نهایت، AFB1 آسیب‌های وارده به DNA را افزایش داد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد AFB1 با افزایش آسیب‌های وارده به DNA، آپوپتوز سلولی را در بیضه افزایش می‌دهد، همچنین می‌تواند ضرایب جایگزینی، تمایز و اسپرمیوژنز را در بافت بیضه کاهش دهد که در پی آن موجب کاهش تولید و کیفیت اسپرم می‌گردد.

کلید واژه‌ها: آفلاتوکسین B1؛ اسپرماتوژنز؛ اسپرمیوژنز؛ آسیب DNA؛ موش.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مزدک رازی، گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

mazdak.razi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Zamir Nasta T, Razi M, Hassanzadeh Sh, Malekinejad H. Effect of Aflatoxin B1 on histomorphometric parameters of testis in male mature albino mouse. Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):10-17. [Full Text in Persian]

مقدمه

به نظر می‌رسد آپوپتوز در طی اسپرماتوژنز نر مال، دو نقش ایفا می‌کند: نقش اول محدود کردن جمعیت سلول‌های جنسی به میزانی است که توسط سلول‌های سرتولی حمایت شوند و نقش دوم نیز حذف اسپرم‌های غیرنرمال می‌باشد (۲،۱). آژانس بین‌المللی پژوهش روی سرطان، آفلاتوکسین را به‌عنوان گروه اول ترکیبات سرطان‌زا برای انسان و حیوان معرفی کرده است (۳). آفلاتوکسین نوعی سم دفاعی قارچی است که به‌وسیله گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *پارازیتیکوس* تولید می‌شود. این نوع از قارچ‌ها در غلات، حبوبات و دانه‌های مغذی به سرعت رشد کرده و آفلاتوکسین را به‌عنوان یک سم دفاعی از خود ترشح می‌کنند. تاکنون انواع مختلفی از آفلاتوکسین‌ها شامل: AFB1، AFB2، AFG1 و AFG2 شناسایی شده‌اند که در میان انواع آنها نوع B1 (آفلاتوکسین B1)، مهم‌ترین نوع بوده و به میزان بسیار زیادی در غلات و حبوبات وجود دارد. چندین تظاهر در بافت بیضه، متعاقب مسمومیت با AFB1 ایجاد می‌شود که همه ناشی از آفلاتوکسیکوز هستند. این علائم شامل: کاهش راندمان تولیدمثلی (۴)، تأخیر در بلوغ، تکامل بیضه‌ها، تغییرات پیش‌رونده مورفولوژی در بیضه‌ها، دژنراسیون بیضه‌ها، تأخیر در روند تقسیم میوز، کاهش ضخامت اپی‌تلیوم (۵)، کاهش درصد بقای اسپرم‌ها، افزایش اختلالات در اسپرم‌ها (۶) و کاهش سرمی هورمون تستوسترون می‌باشد (۷). امروزه، آفلاتوکسین B1 به‌عنوان عامل هپاتوتوکسیک، موتاژن و سرطان‌زا شناسایی شده است (۸،۹). مطالعات متعدد نشان داده‌اند آفلاتوکسین در روده‌ها و کبد به‌وسیله آنزیم سیتوکروم p450s، متابولیزه شده و به AFB1-8,9-epoxide تبدیل می‌گردد. ترکیب اخیر، تمایل بسیار بالایی برای اتصال با DNA و تشکیل AFB1-Guanin Adduct دارد (۱۰). مطالعات پیشین نشان داده‌اند AFB1 با تأثیر بر روی محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی باعث اختلال در سیستم آندوکرینی بافت بیضه می‌شود (۱۱،۱۲). همچنین آفلاتوکسین و بقایای آفلاتوکسین در مایع منی بزها و حتی انسان (عمدتاً در ماه‌های اسفند و فروردین) نیز دیده شده است که نشان‌دهنده بروز برخی از آسیب‌های ناشی از آفلاتوکسین در سطح اسپرم می‌باشد (۱۳،۱۴).

بنابراین، با توجه به مطالعات انجام‌شده، اثرات سوء آفلاتوکسین بر روی دستگاه تناسلی نر و به‌طبع آن بر توان باروری این موجودات شناخته شده است. باوجود مطالعات گسترده‌ای که در رابطه با اثرات سوء آفلاتوکسین صورت گرفته، این نکته که آیا آفلاتوکسین بر پیوستگی DNA تأثیر دارد یا خیر؟، همچنان بی‌جواب باقی‌مانده است. در مطالعه حاضر پیوستگی DNA با به‌کارگیری روش DNA Ladder مورد ارزیابی قرار گرفت. در کنار این موضوع، تأثیر آفلاتوکسین بر مراحل مختلف اسپرماتوسیتوژنز و اسپرمیوژنز، امری است که می‌بایستی مورد ارزیابی قرار گیرد. در مطالعه حاضر، برای این منظور مراحل مختلف فرآیندهای مذکور با ارزیابی ضرایب جایگزینی (Repopulation Index)، تمایز لوله‌ای (Differentiation Index) و اسپرمیوژنز (Spermiogenesis) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت ارزیابی تأثیرات آفلاتوکسین به شکل وابسته به زمان، موش‌های مدل در تناوب‌های زمانی کوتاه‌مدت (۷ روز)، میان‌مدت (۱۵ روز) و طولانی‌مدت (۳۵ روز) با آفلاتوکسین مواجه شدند.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از ۲۴ قطعه موش سوری نر بالغ (با میانگین وزنی 20 ± 20 گرم) استفاده شد. تمامی موش‌ها تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 50 ± 10 ٪) نگهداری شدند. سپس به‌صورت تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. گروه کنترل؛ 0.2 میلی‌گرم روغن ذرت و گروه‌های آزمایشی AFB1 را (به میزان ۲۰ میکروگرم) به ترتیب ۷، ۱۵ و ۳۵ روز، به شکل داخل صفاقی دریافت کردند. بدین ترتیب که AFB1 (Sigma, USA, Cas NO: 1162-65-8) در روغن ذرت و اتانول (۵:۹۵ v/v) حل شده و از طریق داخل صفاقی تزریق شد (۱۲). متعاقب ۷، ۱۵ و ۳۵ روز، نمونه‌های بافت بیضه برداشته شد و بررسی‌های هیستومورفومتري انجام گرفت. برای این منظور متعاقب پاساژ بافتی در الکل‌های مختلف صعودی (۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ و دو تعویض در الکل‌های مطلق)، نمونه‌های مذکور به پارافین مذاب آغشته و در نهایت قالب‌گیری شدند.

پس از اندازه‌گیری، عدد حاصل در ضریب مخصوص که برای هر عدسی شیئی متفاوت است (بزرگنمایی $40 \times 2/5808$) ضرب شد و اندازه نهایی برحسب میکرومتر محاسبه گردید. به منظور بررسی دقیق‌تر، از هر نمونه بافتی بیضه، ۶ لام نیمه‌سریال تهیه شد.

به منظور ارزیابی شکست DNA در بافت‌های بیضه نیز از روش کیفی DNA Ladder استفاده گردید (۱۶)؛ بدین صورت که

۰/۲-۰/۳ گرم از بافت بیضه موش‌ها در ۳ میلی‌لیتر از محلول (1M Tris-HCl/10mM EDTA 0.5% Triton X100, pH 8.0)

لازیس هضم گردید و پس از سانتریفوژ کوتاه (دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد)، تیوب‌های محتوی نمونه به وسیله بافر فنلی، کلروفرم و ایزوآمیل الکل (25:24:1, v/v/v)

انکوبه شدند. به دنبال سانتریفوژ (دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد)، مایع رویی به منظور جداسازی ترکیبات پروتئین و چربی با کلروفرم - ایزوآمیل الکل (49:1, v/v) انکوبه

شد. همچنین به منظور رسوب DNA، محلول به دست آمده با اتانول ۱۰۰٪ (سردشده) و سدیم استات (۳/۵M، PH:۴/۰) مخلوط شد.

در ادامه، نمونه‌های DNA با اتانول (۶۶٪) شست‌وشو داده شدند و در محلول Tris-Hcl (۰/۱ مول و ۲۰ میلی‌مول) حل گردید. در

نهایت، نمونه‌های DNA به دست آمده، به منظور ارزیابی شکست DNA، بر روی ژل آگارز (۱/۵٪) محتوی اتیدیوم بروماید انتقال

داده شدند و شکست DNA به وسیله دستگاه ارزیابی ژل

Arash Pishroo Teb، مورد ارزیابی قرار گرفت.

تمامی داده‌ها براساس Mean±SD بیان گردید. داده‌های مطالعات بافت‌شناختی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های واریانس یک‌طرفه، همچنین تست Bonfferoni (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.

یافته‌ها

در مشاهدات بافت‌شناسی، در گروه کنترل، مقاطع عرضی میکروسکوپی حاصله از بافت بیضه پس از روزهای ۷، ۱۵ و ۳۵ تمامی رده‌های سلولی اسپرماتوژنز (شامل: اسپرماتوگونو، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتید و

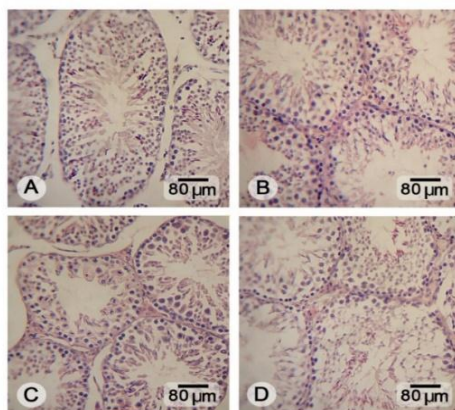
قالب‌های پارافینی به وسیله میکروتوم دوار (مدل MICROM. Germany, Serial: 21074) با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. همراه با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین؛ ضرایب جایگزینی، تمایز لوله‌ای، اسپرمیوژنز، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه ضرایب مذکور در قالب درصد بیان شد و در بین گروه‌ها مقایسه گردید.

در ادامه، لوله‌هایی با نسبت بیشتر اسپرماتوگونو B به اسپرماتوگونو A، به‌عنوان لوله اسپرم‌ساز با ضریب جایگزینی مثبت در نظر گرفته شدند. برای این منظور نسبت اسپرماتوگونوهای A (نوع غیرفعال) به اسپرماتوگونوهای B (نوع فعال) در ۲۰ مقطع عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز برای هر مقطع عرضی از بافت بیضه ارزیابی شد. به منظور بررسی دقیق‌تر، از هر نمونه بافتی بیضه، ۶ لام نیمه‌سریال تهیه گردید. سپس لوله‌های اسپرم‌ساز با بیش از ۳-۴ ردیف سلول‌های ژرمینال، به‌عنوان لوله‌هایی با ضریب تمایز مثبت ارزیابی شدند. برای این منظور، درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب تمایز لوله‌ای منفی، در ۲۰ مقطع عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز برای هر مقطع عرضی از بافت بیضه مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین جهت بررسی دقیق‌تر، از هر نمونه بافتی بیضه، ۶ لام نیمه‌سریال تهیه گردید.

در مرحله بعد، درصد لوله‌های اسپرم‌ساز که در آنها روند اسپرمیوژنز صورت گرفته بود، به‌عنوان لوله‌هایی با ضریب اسپرمیوژنز مثبت در نظر گرفته شدند. قابل ذکر است درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب جایگزینی منفی در ۲۰ مقطع عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز برای هر مقطع عرضی از بافت بیضه ارزیابی شد. همچنین جهت بررسی دقیق‌تر، از هر نمونه بافتی بیضه، ۶ لام نیمه‌سریال تهیه گردید. بعد از تهیه برش از بافت‌ها و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین؛ قطر توبول‌ها با استفاده از روش Soudamani و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۵). ۲۰ توبول به‌طور تصادفی در هر مقطع عرضی بیضه، انتخاب و میانگین قطر لوله‌ها و اپی‌تلیوم آنها با استفاده از عدسی چشمی مدرج (با بزرگنمایی ۴۰) محاسبه گردید (عدسی مدرج به ۱۰ واحد کوچک تقسیم می‌شود که هر یک از این واحدها خود به ۱۰ واحد کوچکتر تقسیم می‌شوند).

دریافت کرده‌اند به شکل وابسته به زمان، افزایش یافته است. همچنین درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب تمایزی منفی در گروه‌های دریافت‌کننده AFB1 در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی‌داری ($p < 0/05$)، افزایش نشان داد. این در حالی است که در مقایسه بین گروه‌های آزمایشی با یکدیگر، متعاقب ۳۵ روز از دریافت AFB1، بیشترین درصد لوله‌های با ضریب تمایزی منفی قابل مشاهده بود. در بررسی‌های بیشتر، به منظور ارزیابی میزان اسپرمیونژن لوله‌های اسپرم‌ساز متعاقب دریافت AFB1، مشخص گردید AFB1 به صورت معنی‌داری ($p < 0/05$) با گذشت زمان، درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضریب اسپرمیونژن منفی را در بافت بیضه افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی‌های هیستومورفومتريک در جدول‌های شماره ۱ و ۲ آورده شده است.

اسپرماتوزوئید) به خوبی مشخص بود. فاصله توپول‌های اسپرم‌ساز از همدیگر نرمال بود و هیچ گونه ادمی در بین لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده نشد. این در حالی است که AFB1 به صورت وابسته به زمان باعث آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز گردید (شکل شماره ۱)؛ بدین ترتیب که در موش‌های گروه دریافت‌کننده AFB1 متعاقب ۳۵ روز در مقایسه با سایر گروه‌ها، درصد بیشتری از لوله‌های اسپرم‌ساز فنوتیپ آتروفی را نشان دادند و ادم قابل ملاحظه در بافت بینابینی دیده شد. طبق بررسی‌های میکروسکوپ نوری، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم ژرمینال در گروه‌هایی که AFB1 را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش یافته بود. بررسی‌های بیشتر نشان داد درصد لوله‌های با ضریب جایگزینی منفی در بافت بیضه موش‌هایی که AFB1 را



شکل شماره ۱: برش عرضی از بافت بیضه.

(A) گروه کنترل؛ (B) گروه دریافت‌کننده AFB1 متعاقب ۷ روز؛ (C) گروه دریافت‌کننده AFB1 متعاقب ۱۵ روز و (D) گروه دریافت‌کننده AFB1 متعاقب ۳۵ روز. AFB1 با گذشت زمان موجب کاهش تعداد لایه‌های سلول‌های زا (شکل C) ریزش سلولی به همراه ایست اسپرماتوزوئی (شکل D) شده است. رنگ آمیزی H&E.

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین قطر لوله اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال در گروه‌های متأثر از AFB1 و گروه کنترل

گروه شاخص	M±SD	قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (میکرومتر)	ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال (میکرومتر)
کنترل	۱۸۵/۴±۶/۳	۶۰/۱±۲/۰	
۷ روزه (۲۰ میکروگرم)	۱۶۶/۱±۱۷/۳*	۴۶/۸±۴/۳*	
۱۵ روزه (۲۰ میکروگرم)	۱۵۸/۴±۱۰/۸*	۴۵/۷±۷/۶*	
۳۵ روزه (۲۰ میکروگرم)	۱۴۵/۲±۱۱/۸*	۳۸/۸±۶/۰*	

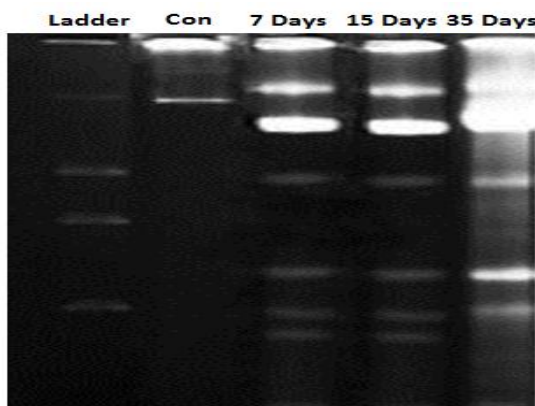
جدول شماره ۲: مقایسه میانگین درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با ضرایب تمایزی، جایگزینی لوله‌ای و اسپرمیونژن منفی در گروه‌های متأثر از AFB1 و گروه کنترل

گروه شاخص	M±SD	ضریب جایگزینی	ضریب تمایز لوله‌ای	ضریب اسپرمیونژن
کنترل	۵/۳±۲/۰	۱۰/۵±۱/۲	۲/۱±۱/۶	
۷ روزه (۲۰ میکروگرم)	۲۰/۳±۵/۰*	۲۳/۶±۳/۳*	۲۰/۸±۱/۹*	
۱۵ روزه (۲۰ میکروگرم)	۴۲/۶±۱۱/۲*	۴۴/۱±۶/۸*	۳۳/۱±۳/۳*	
۳۵ روزه (۲۰ میکروگرم)	۵۵±۳/۷*	۵۱/۶±۴/۱*	۴۱/۵±۱/۳*	

* مقادیر از نظر آماری معنی‌دار هستند ($p < 0/05$). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.

مقایسه باند موجود در گروه کنترل با وزن مولکولی بالا با سایر گروه‌های آزمایشی نشان داد که هیچ شکست DNA در گروه کنترل وجود ندارد. این درحالی است که میزان شکست با گذشت زمان در گروه‌های آزمایشی افزایش نشان داد (شکل شماره ۲).

به منظور ارزیابی میزان شکست DNA، از روش DNA Ladder بر روی ژل الکتروفورز استفاده گردید. بررسی‌ها نشان داد AFB1 متعاقب ۳۵ روز، به شدت میزان دگرادیانس DNA را افزایش می‌دهد که در قالب اسمیر در ژل الکتروفورز رؤیت گردید.



شکل شماره ۲: DNA Ladder؛ مقایسه باند موجود بر روی ژل الکتروفورز در گروه کنترل با وزن مولکولی بالا با گروه‌های آزمایشی متأثر از AFB1. باندهای مربوط در شکل از چپ به راست شامل Ladder، گروه کنترل (۷ روز متعاقب دریافت AFB1)، ۱۵ روز متعاقب دریافت AFB1 و ۳۵ روز متعاقب دریافت AFB1 می‌باشد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد AFB1 به شکل وابسته به زمان، روند اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز را دچار اختلال می‌کند؛ بدین ترتیب که طبق مطالعات میکروسکوپ نوری متعاقب تجویز AFB1، درصد لوله‌های با ضرایب تمایزی و اسپرمیوژنز منفی در مقایسه با موش‌های گروه کنترل افزایش می‌یابد. از طرفی، بررسی‌های بیشتر به منظور تعیین مکانیسم عملکردی AFB1، افزایش آسیب DNA را در طی زمان آشکار ساخت.

میکوتوکسین‌ها، متابولیت‌های ثانویه سمی و سرطان‌زای تولیدشده به وسیله قارچ‌هایی نظیر *آسپرژیلوس فلاووس* هستند. حضور میکوتوکسین‌ها در مواد غذایی به عوامل مختلفی از قبیل قارچ ایجادکننده سم، محصولات غذایی آلوده و عوامل محیطی مختلف وابسته است. مطالعات پیشین، اثرات منفی و آسیب‌زای انواع آفلاتوکسین‌ها را در سطح اسپرماتوزوآ از قبیل کاهش تحرک اسپرم‌ها و آنامولی‌های اسپرمی نشان داده‌اند. از سوی دیگر، ناباروری در مردان را از عوارض دیگر آفلاتوکسین‌ها بیان می‌کنند (۱۷، ۱۸). این درحالی است که بررسی‌های بیشتر در مطالعه حاضر نشان داد آفلاتوکسین با اثر بر روند اسپرماتوژنز، سیستم تمایزی اپی‌تلیوم ژرمینال را دچار اختلال می‌کند.

بدین صورت که با گذشت زمان، درصد بیشتری از لوله‌های اسپرم‌ساز، ضریب تمایزی منفی را نشان می‌دهند. این نکته به خوبی مشخص شده است که با ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز، در ادامه، روند اسپرمیوژنز نیز دچار اختلال می‌شود که به نوبه خود می‌تواند تولید اسپرم را کاهش دهد. در حقیقت، مطالعات پیشین نشان داده‌اند AFB1، در سطح قابل‌ملاحظه‌ای ارتفاع سلول‌های زایا را کاهش، همچنین میزان آسیب‌ها را در سطح اسپرم‌ها (از لحاظ کیفیت اسپرمی) افزایش می‌دهد (۵). نتایج مورفومتريک مطالعه حاضر با گزارش‌های پیشین همخوانی داشت؛ بدین ترتیب که با گذشت زمان، ارتفاع اپی‌تلیوم ژرمینال و قطر لوله‌های منی‌ساز در موش‌هایی که آفلاتوکسین را دریافت کردند، در سطح معنی‌داری کاهش نشان داد. برای درک بهتر این نکته که AFB1، روند اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز را دچار اختلال می‌کند، این نکته بایستی در نظر گرفته شود که AFB1 با تأثیر بر روی توان آندوکرینی محور هیپوفیزی-گنادی، پتانسیل هورمونی را کاهش می‌دهد؛ بدین صورت که تجویز ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ ppm از AFB1 در سطح معنی‌داری، میزان سرمی هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و در نهایت استرادیول را کاهش می‌دهد (۱۱).

لوله‌های اسپرم‌ساز با ضريب جايگزينی، اسپرميوژنز و تمايزی منفی را نیز افزایش داده است

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تجویز AFB1 با افزایش آسیب‌های وارده به DNA، آپوپتوز سلولی را در بافت بيضه افزایش می‌دهد که به‌نوبه خود باعث کاهش اسپرماتوژنز و تغییر معنی‌داری در قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ضخامت اپی‌تلیوم، ضريب جايگزينی، ضريب تمايز لوله‌ای و ضريب اسپرميوژنز بافت بيضه موش‌ها می‌شود. مضاف بر اینکه، این تغییرات با گذشت زمان به شکل فاحشی در گروه‌های آزمایشی، متأثر از AFB1 افزایش می‌یابد. همچنین در مراحل بعدی تحقیق می‌توان این تغییرات هیستومورفومتريک را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی و تفسیر کرد.

بنابراین، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که AFB1 با کاهش میزان تستوسترون، فعالیت فیزیولوژیک سلول‌های سرتولی و متعاقب آن روند اسپرماتوژنز را دچار اختلال می‌کند. در کنار این موضوع، در مطالعه حاضر آسیب‌های ناشی از AFB1 به شکل وابسته به زمان افزایش یافت. همچنین در این مطالعه، بررسی تأثیر AFB1 بر شکست DNA به‌عنوان یک یافته جدید نشان داد AFB1 علاوه بر تأثیر بر سیستم آندوکرینی بافت بيضه و محور هیپوفیزی - گنادی می‌تواند با القای آسیب در سطح DNA و متعاقب آن آپوپتوز در سلول‌های ژرمینال؛ روند اسپرماتوژنز را دچار اختلال کند. این نکته به‌خوبی مشخص است که با شکست DNA در سطح سلول‌های ژرمینال، روند تقسیم سلولی در این رده از سلول‌ها دچار اختلال می‌شود. با در نظر گرفتن این نکته می‌توان نتیجه گرفت که AFB1 با القای آپوپتوز، البته به شکل وابسته به زمان؛ روند تقسیم سلولی را در موش‌های گروه‌های آزمایشی دچار اختلال کرده که به‌نوبه خود درصد

References:

1. Nudell DM, Monoski MM, Lipshultz LI. Common medications and drugs: How they affect male fertility. *Urol Clin North Am* 2002;29(4):965-73.
2. Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: Damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34(12):7-12.
3. Holm NW, Berry RJ. Manual on radiation dosimetry. *Am J Phys Med Rehabil* 1971;50(2):101.
4. Sharlin J, Howarth B, Thompson F, Wyatt R. Decreased reproductive potential and reduced feed consumption in mature white leghorn males fed aflatoxin. *Poult Sci* 1981;60(12):2701-8.
5. Ortatatli M, Ciftci M, Tuzcu M, Kaya A. The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. *Res Vet Sci* 2002;72(1):29-36.
6. Picha J, Cerovský J, Pichova D. Fluctuation in the concentration of sex steroids and aflatoxin B1 in the seminal plasma of boars and its relation to sperm production. *Vet Med (Praha)* 1986;31(6):347-57.
7. Egbunike G, Emerole G, Aire T, Ikegwonu F. Sperm production rates, sperm physiology and fertility in rats chronically treated with sublethal doses of aflatoxin B1. *Andrologia* 1980;12(5):467-75.
8. Faridha A, Faisal K, Akbarsha MA. Aflatoxin treatment brings about generation of multinucleate giant spermatids (symplasts) through opening of cytoplasmic bridges: Light and transmission electron microscopic study in Swiss mouse. *Reprod Toxicol* 2007;24(3-4):403-8.
9. Eaton DL, Groopman JD. The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance. New York: Academic Press; 1993.
10. Barraud L, Douki T, Guerret S, Chevallier M, Jamard C, Trepo C, et al. The role of duck hepatitis B virus and aflatoxin B1 in the induction of oxidative stress in the liver. *Cancer Detect Prev* 2001;25(2):192-201.

11. Hasanzadeh S, Rezazadeh L. Effects of aflatoxin B1 on the growth processes of spermatogenic cell series in adult male rats. *Comp Clin Pathol* 2013;22(4):555-62.
12. Faisal K, Faridha A, Akbarsha MA. Induction of meiotic micronuclei in spermatocytes in vivo by aflatoxin B1: Light and transmission electron microscopic study in Swiss mouse. *Reprod Toxicol* 2008;26(3-4):303-9.
13. Yang Z-W, Guo Y, Lin L, Wang XH, Tong JS, Zhang GY. Quantitative (stereological) study of incomplete spermatogenic suppression induced by testosterone undecanoate injection in rats. *Asian J Androl* 2004;6(4):291-7.
14. Osinubi A, Noronha C, Okanlawon A. Morphometric and stereological assessment of the effects of long-term administration of quinine on the morphology of rat testis. *West Afr J Med* 2005;24(3):200-5.
15. Soudamani S, Malini T, Balasubramanian K. Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: Histological and histomorphometric studies. *Endocr Res* 2005;31(2):81-98.
16. Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, et al. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202(3):1315-21.
17. Ibeh IN, Saxena DK, Uraih N. Toxicity of aflatoxin: Effects on spermatozoa, oocytes, and in vitro fertilization. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000;19(4):357-61.
18. Ibeh I, Saxena D. Aflatoxin B1 and Reproduction: II. Gametotoxicity in female rats. *Afr J Reprod Health* 1997;1(2): 85-9.