

اثرات غلظتهای مختلف آفلاتوکسین B بر بقاء و حرکت اسپرم اپیدیدیمی و انزالی قوچ در شرایط آزمایشگاهی

دکتر پژمان میرشکرایبی^۱ دکتر پرویز تاجیک*^۱ دکتر علیرضا خسروی^۲

دریافت مقاله: ۱۳ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۲۴ مهرماه ۱۳۸۴

Effects of different concentrations of aflatoxin B on ram epididymal and ejaculatory sperm viability and motility in vitro

Mirshokraei, P.,¹ Tajik, P.,¹ Khosravi, A.²

¹Department of Clinical Sciences, ²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, -Iran.

Objective: To study the effects of aflatoxin on ram epididymal and ejaculatory sperm cells.

Design: Interventional study.

Animals and specimens: 10 Chall rams and 25 isolated testicles.

Procedure: Chall ram testicles (n=25) were obtained from slaughter-house, cauda epididymides were incised, sperm samples were isolated and put into media with increasing concentrations of Aflatoxin B. Ejaculates were obtained from 10 healthy Chall rams and the same procedure was assigned. Every hour sperm cells were objected to live-dead staining using eosin - nigrosin procedure and examined under an optic microscope at magnification of $\times 100$, Motility was also assessed in the same time using warm slide glass and magnification of $\times 10-40$.

Statistical analysis: ANOVA and Duncan's multiple range test.

Results: While after one hour incubation viability of ejaculatory and epididymal sperm cells were 81.25 and 83.24% , when aflatoxin was added (7.81, 31.25 and 62.6 ppb) these values drastically reduced back ($p < 0.05$) in a concentration dependent manner for both epididymal (72.92, 71.8 and 66.72%) and ejaculatory (72.48, 69.6 and 63.63%) sperm cells. During 5 h incubation, viability decreased moderately in all groups. However differences among groups remained unchanged. Furthermore, epididymal sperm motility in the 1st h incubation was significantly higher ($p < 0.05$) than those values in treatment with of 31.25 and 62.6 ppb aflatoxin (51.87 and 15.93%). Ejaculatory sperm motility was 93.98% control group (93.98%) was significantly higher than those values in treatment with of 31.25 (52.09%) and 62.6 (18.09%) ppb aflatoxin. In spite of differences among groups, values were more apparent for epididymal sperm.

Conclusion: Aflatoxin has detrimental effects on sperm viability and motility. However, its effect on motility is more severe. *J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:259-264,2005.*

Keywords: Chall ram, sperm, aflatoxin, viability, motility.

Corresponding author's email: ptajik@ut.ac.ir

هدف: بررسی اثر سم آفلاتوکسین B بر ماندگاری و تحرک اسپرم قوچ.

طرح: مطالعه مداخله ای.

حیوانات: ۱۰ راس قوچ شمال ایران و ۲۵ عدد بیضه آن گرفته شده از کشتارگاه.

روش: گرفتن بیضه ۲۵ راس از قوچهای شمال در کشتارگاه برش قسمت دم اپیدیدیم اخذ اسپرم و قرار دادن آن در محیط شستشوی اسپرم حاوی غلظتهای مختلف سم آفلاتوکسین. در مورد اسپرم انزالی اخذ ۲۵ انزال از ۱۰ راس قوچ شمال و قرار دادن آن در محیطهای یاد شده.

تجزیه و تحلیل آماری: استفاده از آزمون آنالیز واریانس و در صورت معنی دار بودن، استفاده از آزمون چند دامنه دانکن برای تعیین گروههای دارای اختلاف.

نتایج: پس از یک ساعت از قرار گرفتن در گرمخانه، میزان ماندگاری اسپرم اپیدیدیمی و انزالی قوچ شمال در گروه کنترل ۸۱/۲۵ و ۸۳/۲۴ درصد بود که با اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بیش از میزان ماندگاری در گروههای حاوی ۷/۸۱، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ قسمت در میلیارد (ppb) آفلاتوکسین بود (۷۲/۹۲، ۷۱/۸ و ۶۶/۷۲ در مقابل ۷۲/۴۸، ۶۹/۶ و ۶۳/۶۳ درصد ماندگاری به ترتیب برای گروههای یاد شده در اسپرم اپیدیدیمی و انزالی). در طول ۵ ساعت قرار گرفتن در محیط، ماندگاری چه در مورد اسپرم انزالی و چه اسپرم اپیدیدیمی در تمام محیطها تقریباً با یک نسبت کاهش پیدا نموده و این اختلاف برقرار ماند. میزان تحرک اسپرم اپیدیدیمی قوچ در محیط کنترل نسبت به اسپرمهای زنده در ساعت اول ۸۲/۸۹ درصد بود که به طور معنی داری بیش از تحرک در گروههای حاوی ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ppb بود (۵۱/۸۷ و ۱۵/۹۳ درصد تحرک به ترتیب برای گروههای یاد شده). در ساعات بعد این اختلاف بیشتر شده به طوری که در ساعت ۵ آزمایش بین گروه کنترل و تمام گروهها اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$) به طوری که در گروه کنترل ۸۲/۱۶ درصد تحرک دیده شد حال آنکه در محیطهای حاوی ۱/۹۶، ۷/۸۱، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ آفلاتوکسین به ترتیب ۶۶/۵۲، ۳۹/۰۱ و ۲/۷ درصد تحرک مشاهده شد. میزان تحرک اسپرم انزالی در محیط کنترل نسبت به اسپرمهای زنده در ساعت اول ۹۳/۹۸ درصد بود که به طور معنی داری بیش از تحرک در گروههای حاوی ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ppb بود (۵۲/۰۹ و ۱۸/۰۹ درصد تحرک به ترتیب برای گروههای یاد شده). در ساعات بعد این اختلاف بیشتر شده به طوری که در ساعت ۵ آزمایش بین گروه کنترل و تمام گروهها اختلاف معنی دار همانند آنچه در مورد اسپرم اپیدیدیمی مشاهده شد.

نتیجه گیری: در پایان می توان چنین نتیجه گیری نمود که سم آفلاتوکسین B بر بقاء و به ویژه تحرک اسپرم شدیداً موثر می باشد و باعث کاهش چشمگیر در میزان تحرک اسپرم انزالی و اپیدیدیمی می گردد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۶۴-۲۵۹.

واژه های کلیدی: قوچ شمال، اسپرم اپیدیدیمی، اسپرم انزالی، آفلاتوکسین، بقاء، تحرک اسپرم.

(۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه فارغ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

* نویسنده مسؤول: ptajik@ut.ac.ir



معنی داری میزان باروری در این حیوانات کاهش یافته است (۱۱). در همین سال با تحقیقی بر روی خوک حضور آفلاتوکسین B1 در انزال اثبات شد (۲۴). همچنین طی تحقیقی مشخص گشته که مایکوتوکسینی به نام Ocharotoxin در صورت بلع می تواند وارد پلاسمای منی گردد (۳۰). در سالهای ۱۹۹۰ و ۱۹۹۲ محققین به نام Sinha بر روی مورفولوژی سراسپرم، تعداد اسپرم و اثرات میتوتیک آفلاتوکسین در موش بررسی هایی را انجام داد (۲۸، ۲۹). Ibeh و همکاران در سال ۱۹۹۴ به ارزیابی ارتباط بین آفلاتوکسین موجود در سرم خون انسانها و ناباروری پرداختند (۱۵). Ibeh و Saxena در سال ۱۹۹۸ اثرات آفلاتوکسین B1 را بر روی هیستوپاتولوژی و برخی آنزیمهای بافت بیضه در موش ارزیابی نمودند (۱۳). در تحقیقی بر روی خرگوشهای سفید کاهش معنی داری در کیفیت منی، حرکت و غلظت اسپرم و عدم تغییرات pH و فروکتوز تحت اثر آفلاتوکسین مشاهده گردید (۱۰). در سال ۲۰۰۱ در مطالعه ای تغییرات میزان تستسترون پلاسمای، حجم انزال، غلظت و حرکت اسپرم به همراه میزان فروکتوز منی خرگوشهای تحت تاثیر آفلاتوکسین معنی دار بود (۲۶). همچنین بررسی در سال ۲۰۰۲ کاهش تولید تستسترون در مسمومیت مزمن با آفلاتوکسین را در موش نشان داد (۳۲). در سال ۲۰۰۳ نیز تاثیرات توکسین بر تعداد اسپرم، حرکت اسپرم و تعداد اسپرمهای غیر طبیعی در اپیدیدیم مورد مطالعه قرار گرفت (۱). بر روی نشخوارکنندگان به جز در تحقیقی در سال ۱۹۸۲ بر روی بوفالو که کاهش تعداد اسپرم زنده و افزایش اسپرمهای غیر طبیعی را پس از ۲ هفته مصرف غذای آلوده به توکسین نشان داد (۱۲) و یک گزارش مبنی بر کاهش میزان حرکت اسپرم و افزایش تعداد اسپرمهای غیر طبیعی در ۸۰ راس گاونریک مرکز اسپرم گیری پس از مصرف غذای آلوده به کپک، مطالعه دیگری صورت نگرفته است (۱۹). در یک بررسی اثرات سم بر روی اسپرم و تخمک موش در محیط IIVF ارزیابی گشت که نتایج آن نشان دهنده کاهش حرکت اسپرم و کاهش تعداد تخمکهای بارور بود (۱۴).

در هیچ یک از مطالعات فوق، بر روی گوسفند تحقیقی صورت نگرفته است، همچنین اکثر تحقیقات بر روی تاثیرات مزمن آفلاتوکسین بر اسپرم انجام شده است ولی تاثیرات سریع آن بر اسپرم مشخص نمی باشد. همچنین با توجه به اهمیت استفاده از اسپرم اپیدیدیمی حیوانات مختلف (۳۳، ۲۳، ۱۷، ۱۶، ۳) که تا به آنجا رسیده است تا انجماد آنرا نیز مطرح سازد (۲۲)، به نظر می رسد که بررسی تاثیر این سم بر اسپرم اپیدیدیمی نیز موثر باشد. در این بررسی سعی گردید اثرات غلظت توکسیک آفلاتوکسین B بر اسپرم قوچ در محیط آزمایشگاه مشخص گردد.

مواد و روش کار

مواد مورد مصرف: به منظور دقیق سازی اسپرم و حل نمودن سم از محیط BO (مراجعه شود به مرجع شماره ۴) استفاده شده است که شامل مواد زیر بود:

نمونه: بیست و پنج عدد بیضه به همراه بند بیضه گوسفند از کشتارگاه جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه IVF بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. در آزمایشگاه با ایجاد شکاف بر روی قسمت فاقد عروق دم اپیدیدیم چند قطره از محتویات دم اپیدیدیم در محیط BO قرار داده می شد (جدول ۱).

همچنین ۲۵ انزال از ۱۰ راس قوچ نژاد شال توسط الکترواوجکولیتور در محل

ساختار دامپروری ایران در قدیم به صورت معیشتی و سنتی بوده و در جهت تکمیل بخش زراعت و تامین محصولات مورد نیاز جامعه روستایی و نهایتاً شهرهای همجوار ساماندهی می شد. امروزه همراه با تحولات اقتصادی و اجتماعی در کشور و به تبعیت از نظام بازار، دامداری به تدریج از حالت سنتی تغییر کرده و متناسب با شرایط دامپروریهای تجاری و صنعتی و با مدیریت نوین علمی پرورش در حال گسترش می باشد. همچنین با توجه به محدودیت منابع مرتعی و ضعیف شدن پوشش گیاهی مراتع به علت عدم مدیریت صحیح در گذشته و تبدیل تدریجی مراتع به اراضی زراعی نیاز به پرورش متمرکز و صنعتی گوسفند و بز بیشتر مشاهده می شود.

در مراکز صنعتی و در مورد دامهایی که به صورت دستی با علوفه و مواد دانه ای انبار شده تغذیه می شوند، همیشه معضل کپکها و سموم تولیدی آنها مطرح است. در این میان متاسفانه اغلب کم کیفیت ترین مواد غذایی به دامهای نر که به ظاهر دارای تولید خاصی نمی باشند و مقاومتر هستند داده می شود.

مایکوتوکسینها متابولیت های ثانویه قارچها می باشند که برای حیوانات و انسان سمی هستند (۶). این مواد به فراوانی در اجزای غذای دام یافت می شوند و در صورت بلع، اثرات سریع و یا بلند مدت گوناگونی در اعضای مختلف بدن ایجاد می نمایند. در مورد اثرات مختلف مایکوتوکسینها بر دستگاه تناسلی حیوانات نشخوارکننده تا کنون تحقیقات محدودی صورت گرفته است.

یکی از توکسین های مورد مطالعه در ارتباط با مسائل تولید مثلی سم Zeralenone مترشح از قارچهای خانواده Fusarium می باشد، زیرا مشخص شده است که این سم دارای خواص استروژنیک است. در تحقیقی بر روی خوک ماده مشخص شد Zeralenone موجب تغییرات سیکل فحلی، کاهش آبستنی، پرولاپس واژن و آبستنی کاذب می گردد (۲۰) و همچنین در مطالعه ای اثرات این سم بر بلوغ تخمک گاو و تداخل آن با استرادیول ۱۷b در رشد سلولهای گرانولوزا بررسی شد (۲۱).

مایکوتوکسین مهلک دیگری که در کشور مادر مواد غذایی دامی بیشتر ردیابی شده است سم آفلاتوکسین می باشد. این سم متابولیت برخی قارچهای گونه آسپرژیلوس مانند (A. pominus, A. parasiticus, A. flavus) می باشد. آفلاتوکسین در اکثر گونه های پستانداران شدیداً توکسیک، کارسینوژنیک، تراژوژنیک، موتاژنیک و سرکوبگر ایمنی است (۲۵). این سم در شیر حیواناتی که آن را بلع کرده اند ردیابی شده است (۶) و از طریق مواد خوراکی با منشأ دامی و گیاهی قابل انتقال به انسان می باشد. ورود سم به داخل بدن انسان می تواند تاثیر سوء بر تولید مثل داشته باشد (۳۱).

اکثر تحقیقات موجود در زمینه آفلاتوکسین و مسائل تولید مثلی بر روی انواع موش و خرگوش انجام شده است. Egbunike طی سالهای ۸۵-۱۹۸۰ اثرات سوء مسمومیت حاد با آفلاتوکسین بر روی تولید استروئیدها، تولید و بلوغ اسپرم و همچنین اثرات مسمومیت مزمن بر میزان تولید مورفولوژی آن را مورد ارزیابی قرار داد (۷، ۸، ۹).

Hafez و همکاران در سال ۱۹۸۳ با بررسی میزان باروری خرگوشهای نروماده ای که ۷ روز جیره آلوده به آفلاتوکسین دریافت کرده بودند نشان داد که به طور



جدول ۱- مواد و میزان تشکیل دهنده محیط B₀.

غلظت مواد	مواد مورد استفاده
۱۱۲ میلی مول	NaCl
۴/۰۲ میلی مول	KCl
۲/۲۵ میلی مول	CaCl ₂
۰/۸۳ میلی مول	NaH ₂ PO ₄
۰/۲۵ میلی مول	MgCl ₂
۳۷ میلی مول	NaHCO ₃
۱۴/۹ میلی مول	گلوکز
۱/۲۵ میلی مول	پیرووات سدیم
۳۱ میکروگرم در میلی لیتر	پنی سیلین پتاسیم G.

صورت گرفته و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. انزالها به فاصله سه روز بوده در حالی که گزارش شده است که حتی گرفتن انزال هر روزه قوچها تغییری در میزان تحرک آنها ایجاد نکرده است (۱۸). در تمامی موارد پس از شمارش اسپرمها توسط لام هموسیستمتر و میکروسکوپ نوری غلظت نمونه‌ها با محیط B₀ به ۸-۴ میلیون اسپرم در میلی لیتر رسانده شد و سپس ۱۰۰ میکرون از این مخلوط داخل میکروتیوب‌های حاوی ۱۰۰ میکرون سم ریخته شد و در گرم خانه ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO₂ قرار گرفت.

پنج رقت مختلف سم (۰، ۱/۹۶، ۷/۸۱، ۳۱/۲۵، ۶۲/۶ ppb) در نظر گرفته شده بود. به ازاء هر رقت سم ۵ میکروتیوب آماده گردیده بود تا خارج نمودن از محیط گرم خانه و ارزیابی متوالی تا ۵ ساعت متوالی موجب اختلال در کیفیت نمونه‌های ساعات بعد نگردد. قبل از اضافه نمودن سم و هر یک ساعت یکبار تا ۵ ساعت بعد از اضافه کردن سم نمونه‌ها با بزرگنمایی ۲۰۰ در زیر میکروسکوپ اینورت دارای صفحه گرم مشاهده شده و با ارزیابی حداقل ۱۰ میدان دید متفاوت میزان درصد حرکت رو به جلو مشخص می‌گردید. همچنین یک لام رنگ آمیزی شده از هر نمونه برای شمارش اسپرمهای زنده با بزرگنمایی ۱۰۰۰ میکروسکوپ نوری تهیه شد. به منظور تعیین تعداد اسپرمهای زنده، حداقل ۲۰۰ اسپرم ارزیابی و درصد موارد زنده گزارش می‌گردید.

آزمون آماری: به منظور مقایسه میزان حرکت بین گروهها از آزمون آنالیز واریانس استفاده گردید و در صورت معنی دار بودن از آزمون چند دامنه دانکن برای

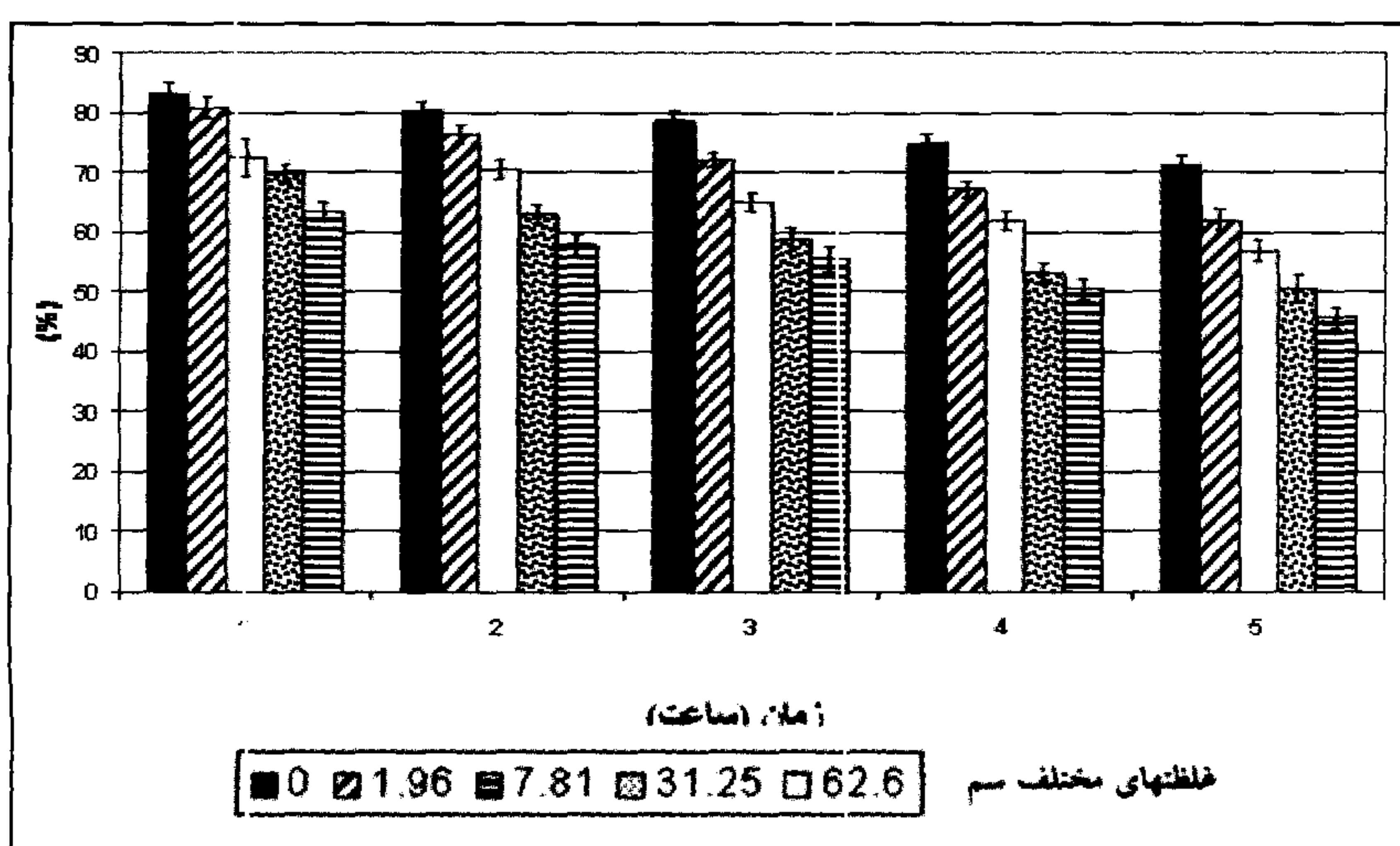
تعیین گروههای دارای اختلاف استفاده شد.

نتایج

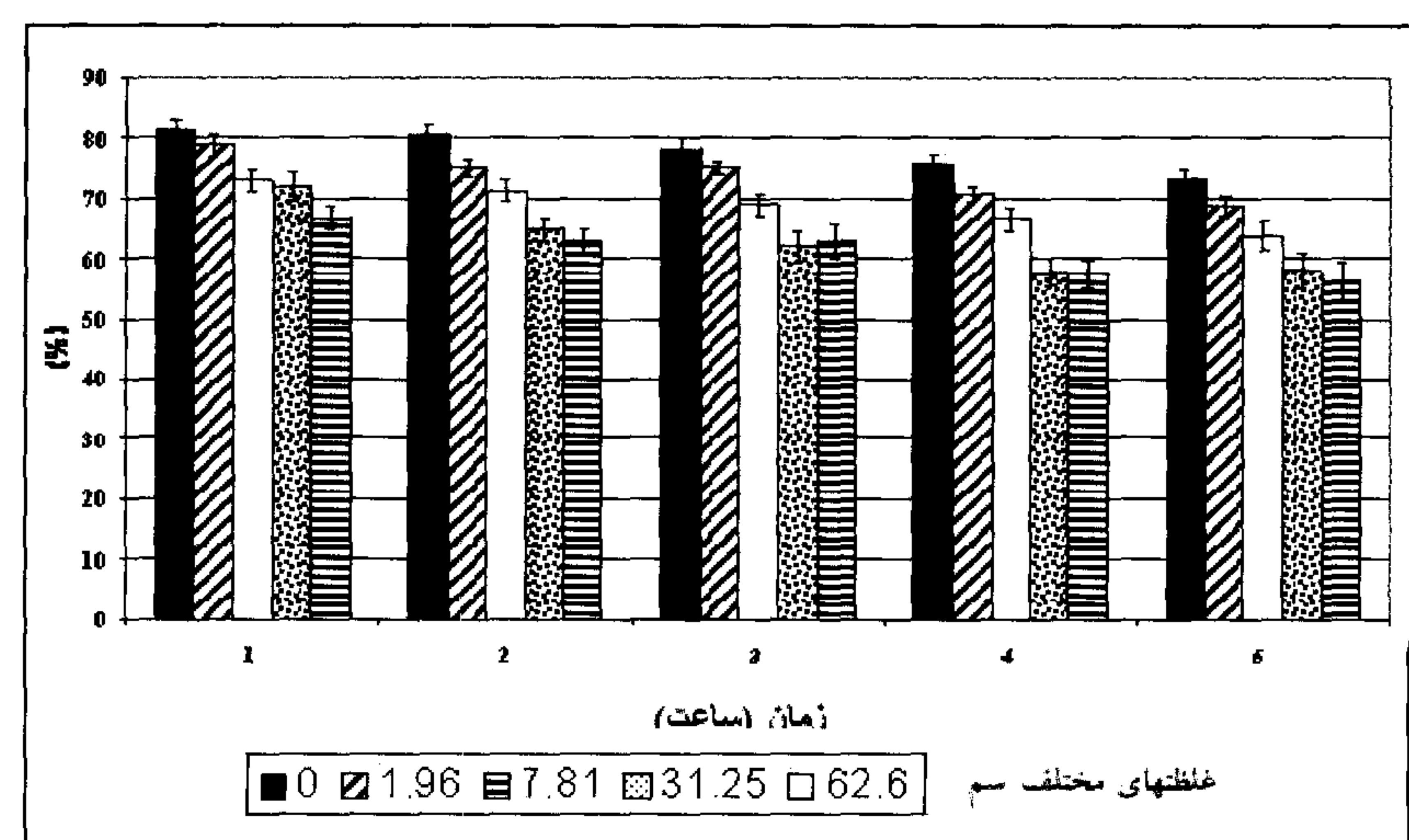
تغییرات میزان بقاء اسپرم اپیدیدیمی در نمودار ۱ نشان داده شده است. در گروه کنترل ۱ ساعت پس از قرار گرفتن در گرمخانه ۸۱/۲ درصد اسپرمها زنده بودند که این میزان به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از درصد اسپرمهای زنده در گروههای حاوی ۷/۸۱، ۳۱/۲۵، ۶۲/۶ و ۶۲/۶ ppb سم می‌باشد (به ترتیب ۷۱/۸، ۷۲/۹۲ و ۶۶/۷۲ درصد)، اما تغییر معنی داری با گروه حاوی ۱/۹۶ ppb آفلاتوکسین نداشت و میزان اسپرم زنده در این گروه ۷۸/۸۴ درصد بود. در طی ساعات دوم و سوم در گرمخانه هر چند درصد اسپرمهای زنده تغییر نکرد اما بسته به میزان سم در سایر گروهها دچار کاهش گردیده و همین اختلاف معنی دار بین گروهها باقی ماند به طوری که در ساعت ۵ آزمایش میزان ماندگاری اسپرم اپیدیدیمی قوچ در محیط کنترل ۷۳/۲ درصد و در محیطهای حاوی ۱/۹۶، ۷/۸۱، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ماندگاری به ترتیب ۶۸/۶، ۶۳/۶۴، ۵۸/۰۵ و ۵۶/۲۸ درصد بود.

نمودار ۲ نمایشگر تغییرات درصد اسپرمهای زنده انزالی در غلظتهای گوناگون سم می‌باشد. در گروه کنترل ۱ ساعت پس از انکوباسیون ۸۳/۲۴ درصد اسپرمها زنده بودند که این میزان به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از درصد اسپرمهای زنده در گروههای حاوی ۷/۸۱، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ppb سم می‌باشد (به ترتیب ۷۲/۴۸، ۶۹/۶ و ۶۳/۶۳ درصد)، اما تغییر معنی داری با گروه حاوی ۱/۹۶ ppb (۸۰/۸۴ درصد) آفلاتوکسین نداشت. در ساعت دوم نیز بالاترین درصد اسپرمهای زنده متعلق به گروه کنترل بود (۸۰/۴۴ درصد) هر چند که با گروه حاوی ۱/۹۶ ppb (۷۶/۳۶ درصد) اختلاف معنی داری نداشت. در گروه کنترل ظرف ۳ ساعت اول اختلاف معنی داری در درصد اسپرمهای زنده مشاهده نشد.

نمودار ۳ نشاندهنده نسبت اسپرمهای متحرک اپیدیدیمی به اسپرمهای زنده می‌باشد. یک ساعت پس از انکوباسیون در محیط فاقد آفلاتوکسین ۸۲/۸۹ درصد اسپرمها متحرک بودند که این میزان به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از میزان حرکت در محیطهای حاوی ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ppb (۵۱/۸۷ و ۱۵/۹۲ درصد) ترتیب برای محیط اول و دوم) بوده، اما اختلاف معنی داری با محیطهای حاوی ۱/۹۶ و ۷/۸۱ ppb آفلاتوکسین نداشت در این گروهها میزان حرکت به ترتیب ۸۰/۰۳ و ۷۷/۸۳ درصد بود. در ارزیابی ساعت دوم در گروه کنترل و گروه حاوی ۱/۹۶ ppb

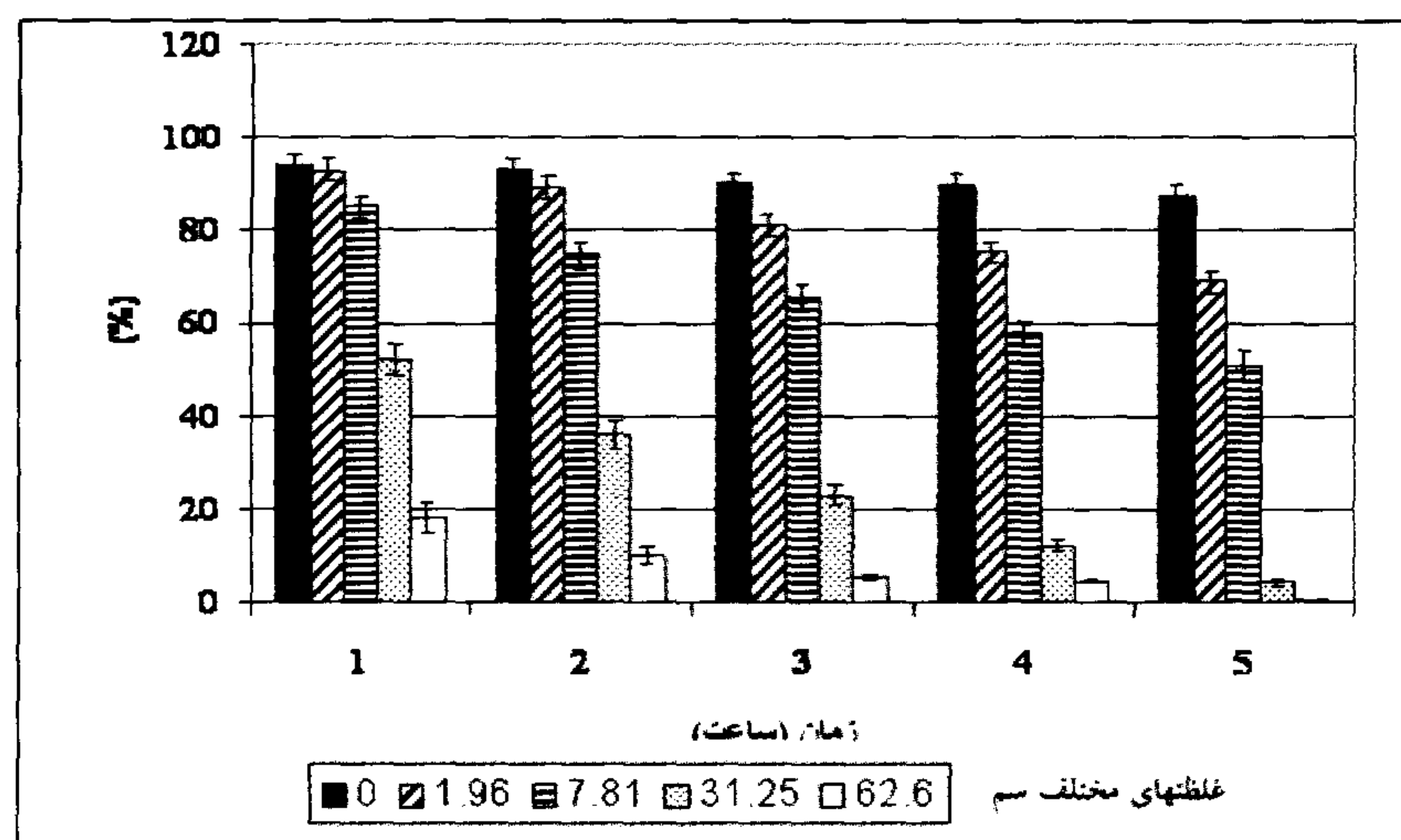


نمودار ۲- ماندگاری اسپرم انزالی قوچ در غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین.

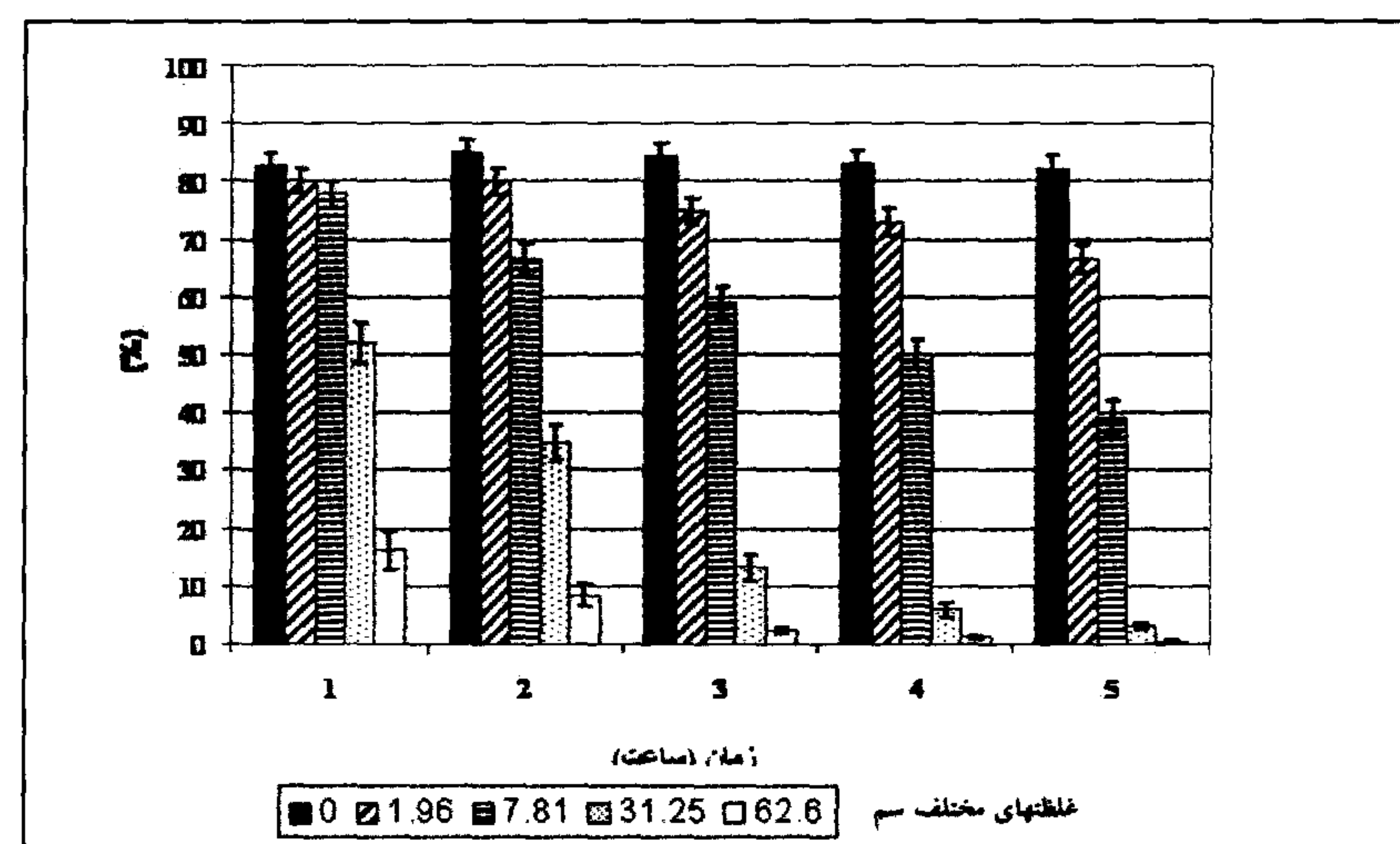


نمودار ۱- ماندگاری اسپرم اپیدیدیمی قوچ در غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین.





نمودار ۴ - تحرک اسپرم انزالی قوچ در غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین.



نمودار ۳ - تحرک اسپرم اپیدیدیمی قوچ در غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین.

آنرا برای اسپرماتوژنز توکسیک گزارش نمودند. متأسفانه گزارشی در مورد درصد اسپرم‌های زنده در آزمایش ایشان وجود ندارد. Salem و همکاران در سال ۲۰۰۱ میزان اسپرم‌های مرده خرگوش را محاسبه نمودند و اظهار داشتند که میزان مرگ و میر وابسته به میزان سم می‌باشد. ولی ایشان تاثیر مستقیم سم را روی ماندگاری اسپرم نشان نداده‌اند (۲۶). در آزمایش حاضر نقش مستقیم آفلاتوکسین روی ماندگاری اسپرم انزالی و اپیدیدیمی گوسفند نژاد شمال نشان داده شده است. Ibeh و همکاران اسپرم اپیدیدیمی رات را با غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶ ppb آفلاتوکسین B1 در محیط IVF قرار دادند. آنها مشاهده نمودند که مجاورت اسپرم با آفلاتوکسین میزان باروری را حتی در کمترین مقدار سم کاهش داد (۱۴). آنها همچنین متوجه کاهش تحرک اسپرم‌های قرار گرفته در مجاورت سم شدند. Briot و همکاران (۲۰۰۳) دریافتند که تحرک اسپرم انزالی خوک در مجاورت آفلاتوکسین کاهش پیدا می‌کند (۵). در هیچیک از مطالعات انجام شده تاثیر آفلاتوکسین بر اسپرم قوچ مورد مطالعه قرار نگرفته است. همچنین تاثیر عامل زمان نیز مطالعه نشده است. در مطالعه حاضر تحرک اسپرم اپیدیدیمی در غلظت‌های بالاتر از ۲ ppb آفلاتوکسین تنها پس از ۲ ساعت مشاهده گردید در صورتیکه پس از یک ساعت مجاورت اختلافی بین گروه کنترل با غلظت‌های ۱/۹۶ و ۷/۸۱ ppb آفلاتوکسین وجود نداشت. در اسپرم انزالی بهر حال تاثیر آفلاتوکسین زودتر نمایان شد. اینکه چه تفاوتی بین اسپرم انزالی و اپیدیدیمی از این لحاظ وجود دارد مشخص نیست و باید در آزمایش‌های آینده به آن پرداخت. اما ظواهر امر نشان می‌دهند که بهر حال اسپرم اپیدیدیمی در مقایسه با اسپرم انزالی از مقاومت بیشتری برخوردار است. این امر تشویقی است برای استفاده بیشتر از اسپرم اپیدیدیمی.

در پایان یافته‌های آزمایش حاضر نشان می‌دهند که آفلاتوکسین دارای اثر مخرب روی اسپرم انزالی و اپیدیدیمی گوسفند می‌باشد.

تغییر معنی داری مشاهده نشد، هر چند در سایر گروه‌ها درصد حرکت به طور معنی داری کاهش یافت (۶۶/۶۶، ۶۴/۶۳ و ۲۷/۸ درصد تحرک برای اسپرم‌های موجود در محیط‌های حاوی ۳۱/۲۵، ۷/۸۱ و ۶۲/۶ ppb آفلاتوکسین). در ساعت سوم تقریباً تمامی اسپرم‌ها در محیط حاوی ۶۲/۶ ppb سم غیر متحرک گردید (۲/۱۵ درصد) که این میزان به طور معنی داری کمتر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0/05$). تا ساعت ۵ آزمایش تحرک در محیط کنترل تقریباً ثابت ماند و اختلاف آن با سایر گروه‌ها معنی دار بود. در این زمان همچنین اختلاف بین گروه ۱/۹۶ و ۷/۸۱ با خودشان و با گروه‌های ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ معنی دار بود در حالیکه اختلاف بین دو گروه ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ معنی دار نبوده و تقریباً تحرک در هر دو گروه به صفر رسیده بود.

نمودار ۴ بیانگر نسبت اسپرم‌های متحرک انزالی به اسپرم‌های زنده می‌باشد. یک ساعت پس از قرار گرفتن در گرمخانه، در گروه کنترل ۹۳/۹۸ درصد اسپرم‌ها متحرک بودند که این میزان به طور معنی داری ($P < 0/05$) بیشتر از میزان حرکت در محیط‌های دارای ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ppb (به ترتیب ۵۲/۰۹ و ۱۸/۰۹ درصد برای دو گروه) اما اختلاف معنی داری با محیط‌های حاوی ۱/۹۶ و ۷/۸۱ ppb آفلاتوکسین نداشت. در این گروه‌ها میزان حرکت به ترتیب ۸۹/۷۶ و ۸۵/۰۴ درصد بود. دو ساعت پس از قرار گرفتن در گرمخانه در گروه کنترل و گروه حاوی ۱/۹۶ ppb تغییر معنی داری مشاهده نشد، هر چند بالاترین مقدار مربوط به گروه کنترل بود (۹۲/۹۳ درصد). در ساعت سوم هر چند درصد اسپرم‌های متحرک گروه کنترل تغییر معنی داری نداشتند، اما بسته به میزان سم در سایر گروه‌ها اختلافات معنی دار مشاهده گردید و این اختلاف تا پایان ۵ ساعت آزمایش باقی ماند ($P < 0/05$) که در این مورد تحرک اسپرم‌های گروه کنترل ۸۷/۳۳ درصد و در گروه‌های حاوی ۱/۹۶، ۷/۸۱، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۶ ppb آفلاتوکسین، میزان تحرک به ترتیب ۶۹/۸۱، ۴۰/۲۳ و ۵۳/۰ درصد بود.

بحث

گفته شده است که تحرک اسپرم برای نفوذ آن به داخل تخمک مورد نیاز است (۲۷). بهر حال زمانی که تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم انجام می‌شود این نیاز منتفی است (۲). در سال ۲۰۰۳ اثر آفلاتوکسین B1 بر روی غلظت اسپرم اپیدیدیمی موش سفید گزارش شده است (۱). این محققان با توجه به رخداد سلول‌های مرده در سوسپانسیون اسپرم موش‌هایی که ۳۵ و ۴۵ روز در معرض آن سم قرار گرفته بودند،

References

1. Agnes, V. F., Akbarsha, M.A. (2003): Spermatotoxic effect of aflatoxin B1 in the albino mouse. Food Chem Toxicol, 41(1): 119-130.
2. Ben Rhouma, K., Ben Miled, E., Attallah, K.,



- Marrakchi, H., Khouja, H. and Sakly M. (2003): Successful pregnancies after using immotile spermatozoa from ejaculate, epididymis and testis. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.*, 108:182-185.
3. Blash, S., Melican, D. and Gavin, V. (2000): Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, 54:899-905
 4. Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 17:260-274.
 5. Brio, K., Barna-Vetro, I., Pecs, T., Szabo, E., Winkler, G., Fink-Germmels, J. and Solti, L. (2003): Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A -challenged boars. *Theriogenology*, 60:199-207.
 6. D`Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1997): Mycotoxins. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 69:155-166.
 7. Egbunike, G.N. (1982): Esteroidogenic and spermatogenic potentials of the male rat after acute treatment with aflatoxin B1. *Andrologia*, 14(5): 440-6.
 8. Egbunike, G.N. (1985): Sperm maturation and storage in the male rat after acute treatment with aflatoxin B1. *Andrologia*, 17(4): 379-82.
 9. Egbunike, G.N., Emerole, G.O., Aire, T.A. and Ikegwonu, F.I. (1980): Sperm production rates, sperm physiology and fertility in rats chronically treated with sub lethal doses of aflatoxin B1. *Andrologia*, 12(5): 467-75.
 10. ElZahar, H., Tharwat, E.E., ElAal, W.A., ElAshry, M.A., Saad, M.M. and Amin, S.O. (1996): Rabbit and aflatoxins. 2. Reproductive performance of mature New Zealand white rabbit bucks treated orally with aflatoxins. *Egypt. J. Rabbit Sci.* 6:67-78.
 11. Hafez, A.H., Gomma, A., Mousa, S.A. and Megalla, S.E. (1983): Aflatoxin and aflatoxicosis. IV. The effect of dietary aflatoxins on adult fertile male and female rabbits at various reproductive conditions. *Mycopathologia*, 83:183-186.
 12. Hafez, A.H., Megalla, S.E. and Mahmed, A.A. (1982): Aflatoxin and aflatoxicosis. III. Effect of dietary aflatoxin on the morphology of buffalo bull spermatozoa. *Mycopathologia*, 77:141-144.
 13. Ibeh, I. N., Saxena, D.K. (1998): Effect of alpha-tocopherol supplementation on the impact of aflatoxin B1 on the testes of rats. *Exp Toxicol Pathol.* 50(3): 221-224.
 14. Ibeh, I.N., Saxena, D.K. and Uriah, N. (2000): Toxicology of aflatoxin: effects on spermatozoa, oocytes, and in vitro fertilization. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19:357-361.
 15. Ibeh, I.N., Uraih, N. and Ogonar, J.I. (1994): Dietary exposure to aflatoxin in human male infertility in Benin City, Nigeria. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.*, 39(4): 208-214.
 16. James, A.N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A.M., Paccamonti, D. and Godke, R.A. (2002): Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, 58: 401-404
 17. Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraiez, P. and Anal, L. (2003): Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, 60:1249-1259.
 18. Kaya, A., Aksoy, M. and Tekeli, T. (2002): Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Rumin., Res.* 44:153-158.
 19. Lange, A., Fehrn, S-von, Klocke, P., Glatzel, P. and Von-Fehrn, S. (1998): A study on the sudden, temporary depression in semen quality of 80 bulls at an artificial insemination station. *Tierarztl Umschau*, 53:242-250.
 20. Minervini, F., Dell`Aquila, M.E., Maritato, F., Minoia, P. and Visconti-A. (2001): Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol in Vitro*, 15:489-495.
 21. Osweiler, G.D. (1986): Occurrence and clinical manifestation of trichothecene toxicose and zearalenone toxicosis. In: Richard, J. L. Thurston, J. R. (Eds.) *Diagnosis of Mycotoxicosis*. Martinus Nijhoff, Dordrecht PP:31-50.
 22. Patrizio, P. (2000): Cryopreservation of epididymal



- sperm. *Mol. Cell Endocrinol*, 169: 11-14.
23. De Pauw, I.M.C., Van Soom, A., Mintiens, K., Verberckmoes, S. and de Kruif, A. (2003): In vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. *Theriogenology*, 59:1093-1107.
24. Picha, J., Cerovsky, J. and Pichova, D. (1986): 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)* .31(6):347-57.
25. Puschner, B. (2002); *Mycotoxins The Vet Clin N Am-Small*, 32:409-419.
26. Salem, M.H., Kamel, K.I., Yousef, M.I., Hassan, G.A. and EL-Nouty F.D. (2001): Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B (1). *Toxicology*, 162(3): 209-18.
27. Saling, P.M. (1990): Sperm maturation. In: Bavister, B., Cummins, J., Roldan, E. R. S. (Eds.). *Fertilization In Mammals*. Sereno Symposia, USA, Norwell, Massachusetts 1990. p. 49.
28. Sinha, S.P., Bose, S. (1992): Effect of dietary concentration of aflatoxin B1 and vitamin C on meiotic chromosomes, sperm head morphology and sperm count in mice, *Mus musculus*. *Cytologia*, 57:75-80.
29. Sinha, S.P., Veena-Prasad, Prasad, V. (1990): Effect of dietary concentration of crude aflatoxin on meiotic chromosomes, sperm morphology and sperm count in mice, *Mus musculus*. *Proceedings of the Indian National Science Academy, Part-B, Biological Sciences*, 56:269-275.
30. Solti, A., Pecs, T., Vetro, I.B., Szasz, F., Biro, K. and Szabo, E. (1999): Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Anim Reprod Sci*, 56:123-132
31. Uriah, N., Ibeh, I.N., and Oluwafemi, F. (2001): A study on the impact of aflatoxin on human reproduction. *Afric. J. Reprod. Health*, 5:106-110.
32. Verma, R.J., Natr, A. (2002): Effect of aflatoxins on testicular esteroidogenesis and amelioration by vitamin E. *Food Chem Toxicol*, 40: 669-672.
33. Yu, I., Leibo, S.P. (2002): Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. *Theriogenology*, 57: 1179-1190.

