اثر پاتولین بر روی برخی از پارامترهای اسپرمی انسان

زهرا سادات رسولی[۱]، سیده فاطمه سیادت[۲*]، میترا حیدری نصرآبادی[۱]، عبدالحسین شاهوردی[۳]

۱- گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۲- گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده رویان، تهران، ایران
* مسئول مکاتبات: fsiadat2003@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۵

چکیده

پاتولین سمی است از خانواده مایکوتوکسین‌ها که توسط چندین گونه از کپک‌ها به‌ویژه آسپرژیلوس، بایسوکلامس و پنیسیلیوم اکسپانسوم تولید می‌گردد. حضور پنی‌سیلیوم اکسپانسوم بر روی سیب‌های فاسد شده و مصرف آب سیب حاصل از این محصولات موجب نگرانی است. پاتولین دارای اثرات ناهنجاری‌زایی در جنین، جهش‌زایی ژنتیکی و سرطان‌زایی است. در این تحقیق سعی شده است تا اثرات این سم روی اسپرم انسان و نقش آن به عنوان فاکتور مردانه در ناباروری بررسی شود. سم پاتولین اثرات مخرب و زیان آوری بر اسپرم انسان بخصوص DNA آن دارد وجود بیشتر از حدمجاز آن در آب میوه‌ها می‌تواند بر اسپرم تأثیرگذار باشد. در مطالعه حاضر ٤٠ نمونه مایع سمن نرمال از بین مراجعین به پژوهشکده رویان تهیه شد. تحرک، pH، مورفولوژی، زنده مانی و فراگمنتاسیون DNA در اسپرم قبل و بعد از اثر پاتولین با ۵ دوز مختلف ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱٦، ۰/۳۳ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شده با محیط کشت Ham'sF10 بررسی گردید. نتایج نشان داد غلظت‌های ۰/۳۳، ۰/۵ و ۰/۰۵ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش معناداری در تحرک اسپرم، PH و زنده مانی اسپرم‌ها شده است. همچنین غلظت‌های ۰/۳۳ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث تخریب معنی‌دار DNA در اسپرم شده است اما بر مورفولوژی آن تأثیری نداشته است.

کلمات کلیدی: پاتولین، اسپرم، باروری، فراگمنتاسیون DNA.

مقدمه

حدود ۲۵ درصد ناباروری در زوجین به علت کیفیت پایین مایع سمن است. در معرض قرار گرفتن مردان با سموم و مواد شیمیایی می‌تواند بر باروری آنها تاثیرگذار باشد. یکی از این سموم پاتولین است. پاتولین یکی از مایکوتوکسین‌هایی است که در میوه‌های کپک زده به خصوص سیب و محصولات حاصل از این سیب‌ها مثل آبمیوه‌ها و کمپوت‌ها یافت می‌شود [۱].

این ماده توسط چندین گونه از کپک‌ها به خصوص آسپرژیلوس (*Aspergillus*)، پنی‌سیلیوم (*Penicillium*) و بایسوکلامیس (*Byssochlamys*) تولید می‌شود. آلودگی غذاها و آبمیوه‌ها با پاتولین یک موضوع مهم ایمنی و سلامت غذا با توجه به مصرف بالای این اقلام در سراسر جهان است [۱].

بررسی‌ها نشان می‌دهد در بسیاری از آب سیب های تولید شده در کارخانجات مقدار این ماده بیش از حد مجاز آن (۵۰ میکروگرم در لیتر) و گاهی تا دو برابر میزان مجاز آن است [۱]. مواجهه با این مایکوتوکسین باعث آسیب‌های ایمونولوژیک بخصوص آسیب به ماکروفاژها [۲۵، ١٤، ۱۲، ٦]، آسیب‌های نورولوژیک مثل تشنج، رعشه و آسیب‌های گوارشی می‌شود [۱۸، ۸، ۷]. پاتولین خاصیت

Archive of SID
www.SID.ir

ژنوتوکسیک نیز دارد و باعث آسیب به DNA می‌شود و همچنین خاصیت سرطان‌زایی آن در موش‌ها و رت‌ها به اثبات رسیده است. اخیراً در مطالعه‌ای معلوم شده است که حتی پاتولین می‌تواند از طریق پوست جذب شود [۱۰].

برخی از مطالعات نشان داده‌اند که پاتولین باعث آسیب به سنتز DNA می‌شود این اثرات ژنوتوکسیک ممکن است با توانایی واکنش با گروه‌های سولفیدریل و القای آسیب اکسیداتیو مرتبط باشد [۱۹، ۱۳]. همچنین اثرات این سم روی تیروئید و بیضه و میزان هورمون‌ها در رشد رت‌های نر بررسی شده است [۲۱، ۲۰].

ناهنجاری‌های کروموزومی بوسیله‌ی پاتولین در سلول‌های پستانداران نیز به اثبات رسیده است [۲۳، ۲۲، ٤].

در مورد تاثیر این سم بر اسپرم انسان تا کنون مطالعه‌ای در دست نیست بنابراین در این پژوهش سعی شد برای اولین بار تاثیر این سم در محیط آزمایشگاه بر روی سلول‌های اسپرم انسان بخصوص بر DNA آن مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

نمونه مورد آزمایش: نمونه‌های مایع سمن افراد مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری پژوهشکده رویان (تهران، رسالت، انتهای بنی هاشم) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از زمان مایع‌شدگی (Liquefaction) به مدت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها طبق استانداردهای WHO (۲۰۱۰) شمارش شدند و نمونه‌هایی با تعداد ۷۵ تا ۱۱۰ میلیون در میلی‌لیتر انتخاب شدند.

تهیه غلظت‌ها: به منظور بررسی تأثیر پاتولین با غلظت‌های مختلف یک محلول استوک از پاتولین با غلظت ۱ppm (آماده شده با محیط کشت Ham'sF10) تهیه گردید. این محلول استوک به طور سریالی با محیط Ham'sF10 رقیق شدند و به هرکدام ۱۰۰mL مایع سمن اضافه شد تا غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۰۱٦، ۰/۳۳ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مرحله بعد هر نمونه از نظر تحرک، زنده‌مانی، فرگمنتاسیون DNA و مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای اسپرم برای حداقل ۳۰ نمونه قبل و بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف پاتولین اندازه‌گیری شدند. به گروه کنترل (n=۳۰) تنها محیط Ham'sF10 اضافه شد.

زنده‌مانی: به منظور بررسی میزان زنده مانی اسپرم‌ها به نسبت مساوی از تریپان بلو و مایع سمن با هم مخلوط شدند و بعد از ۵-۳ دقیقه نسبت اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) به اسپرم‌های مرده (آبی) در ۱۰۰ اسپرم شمارش شده محاسبه گردید.

تخریب DNA: جهت بررسی میزان تخریب DNA از تست SCD (Sperm Chromatin Dispertion) و رنگ آمیزی Wright (بر طبق پروتوکل اجرایی در پژوهشگاه رویان) استفاده گردید. برای محاسبه‌ی درصد فراگمنتاسیون DNA لام‌های SCD زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰× مشاهده شدند.

رنگ‌آمیزی پاپانیکولا (Dif-quick): به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم‌ها قبل و بعد از اضافه کردن سم پاتولین به نمونه‌ها به کمک رنگ‌آمیزی پاپانیکولا انواع مورفولوژی اسپرم بررسی و درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی خاص محاسبه گردید.

تحرک اسپرم: قبل و بعد از اضافه کردن سم میزان تحرک اسپرم (motility) بررسی شد و اسپرم‌ها از نظر تحرک به چهار گروه زیر تقسیم شدند:

گروه A: حرکت پیش رونده به جلو. گروه B: گروهی که به جلو رفته برگشت می‌کنند. گروه C: گروه با حرکت در جا. گروه D: بی‌حرکت.

درصد تحرک در هر گروه از ۱۰۰ اسپرم شمارش شده محاسبه گردید.

آنالیز آماری: مطالعات آماری با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و t-test انجام گردید و مقایسه داده ها به صورت میانگین± SE بیان شدند و سطح معنی دار ۰/۰۵ به عنوان

www.SID.ir

سطح معنی دار در نظر گرفته شد. درصد تحرک و زنده مانی برطبق استانداردهای WHO تعیین شد.

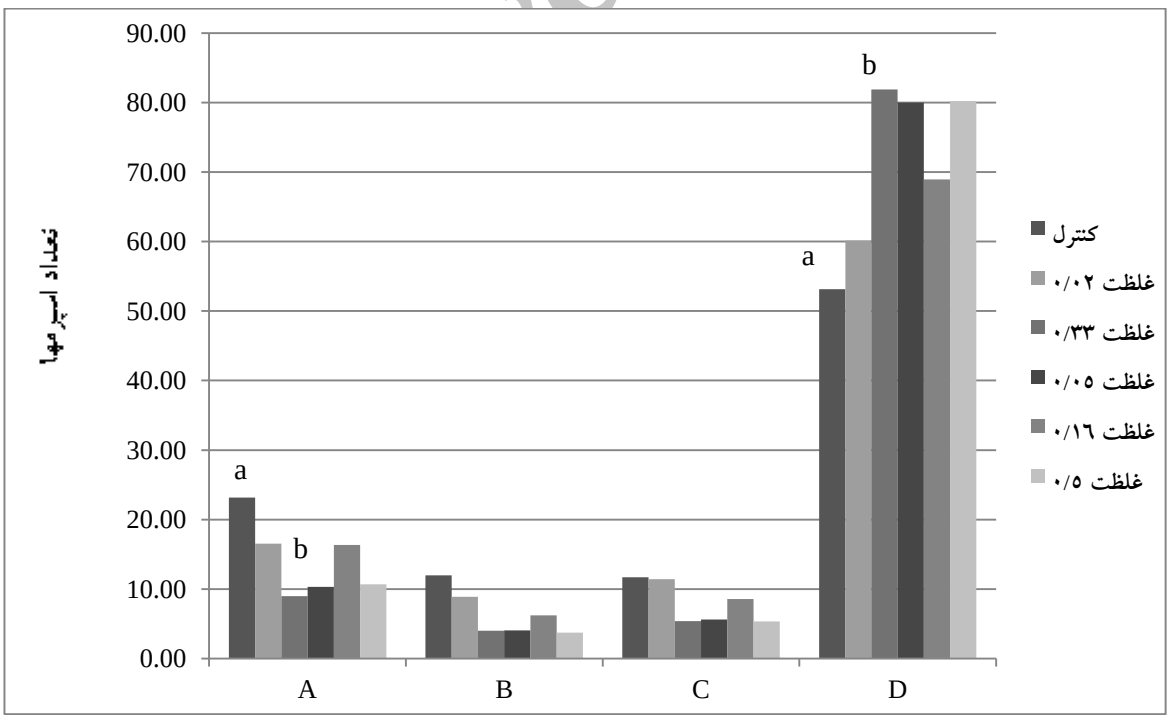
نتایج

اثرات پاتولین روی نمونه‌های مایع منی نرمال که از پژوهشکده رویان جمع‌آوری شده بود بررسی شد و پارامترهای تحرک اسپرم، زنده مانی اسپرم و آسیب DNA و مورفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تحرک اسپرم: تحرک اسپرم قبل و بعد از اضافه کردن پاتولین به نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمونه های نرمال مقایسه شد. نتایج نشان داد در همه غلظت‌ها بعد از اضافه کردن پاتولین به نمونه سمن، همه انواع حرکات A، B و C در اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش دارند. همچنین بعد از اضافه کردن سم پاتولین در غلظت‌های بالاتر میزان اسپرم‌های بی‌تحرک افزایش می‌یابد. در غلظت ۰/۵ این افزایش کاملاً معنی‌دار است (نمودار ۱).

زنده‌مانی اسپرم‌ها (Viability): میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها نیز به طور مشابهی قبل و بعد از این که نمونه های سمن در معرض غلظت‌های مختلف پاتولین قرار گرفتند در محیط آزمایشگاهی بررسی شد. در همه‌ی غلظت‌ها بعد از اضافه کردن سم پاتولین به نمونه های سمن میزان زنده مانی اسپرم‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). این میزان در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۳۳ اختلاف بیشتری با گروه کنترل داشت (نمودار ۲).

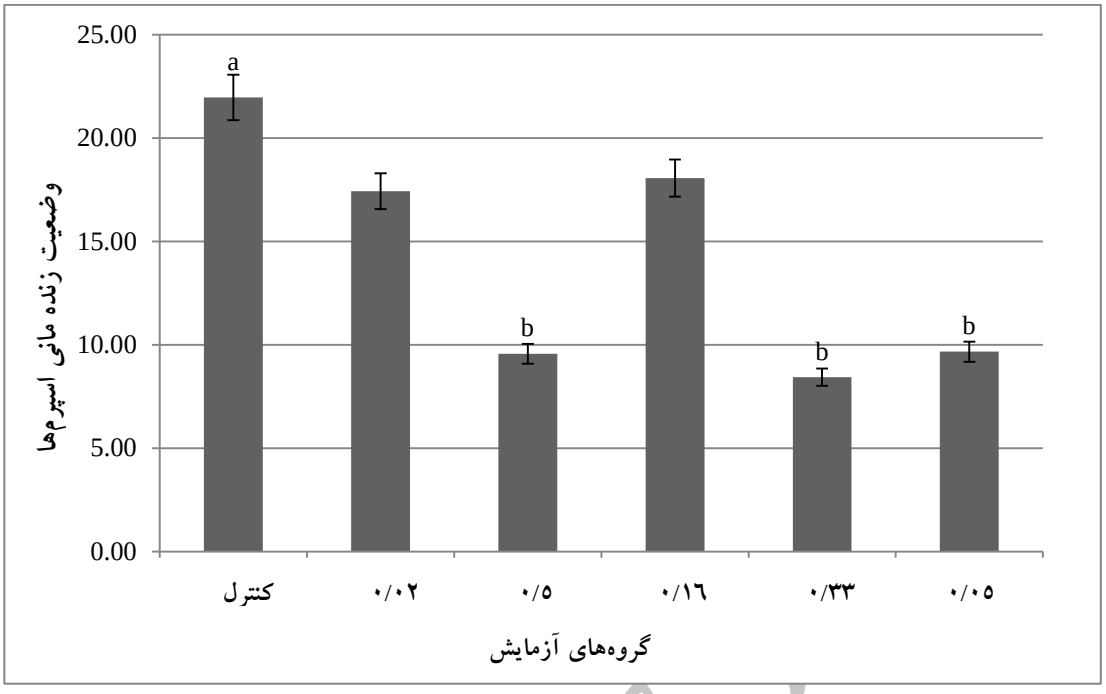
تخریب DNA (تست SCD): تخریب DNA تنها در سه غلظت ۰/۵، ۰/۳۳ و ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت در هر غلظت تعداد ۳ نمونه سمن مورد بررسی و سنجش قرار گرفت (n =۳). در ۲ غلظت ۰/۵ و ۰/۳۳ میزان تخریب DNA اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت بیشترین تخریب با افزایش غلظت (۰/۵) مشاهده شد (شکل ۱، نمودار ۳).



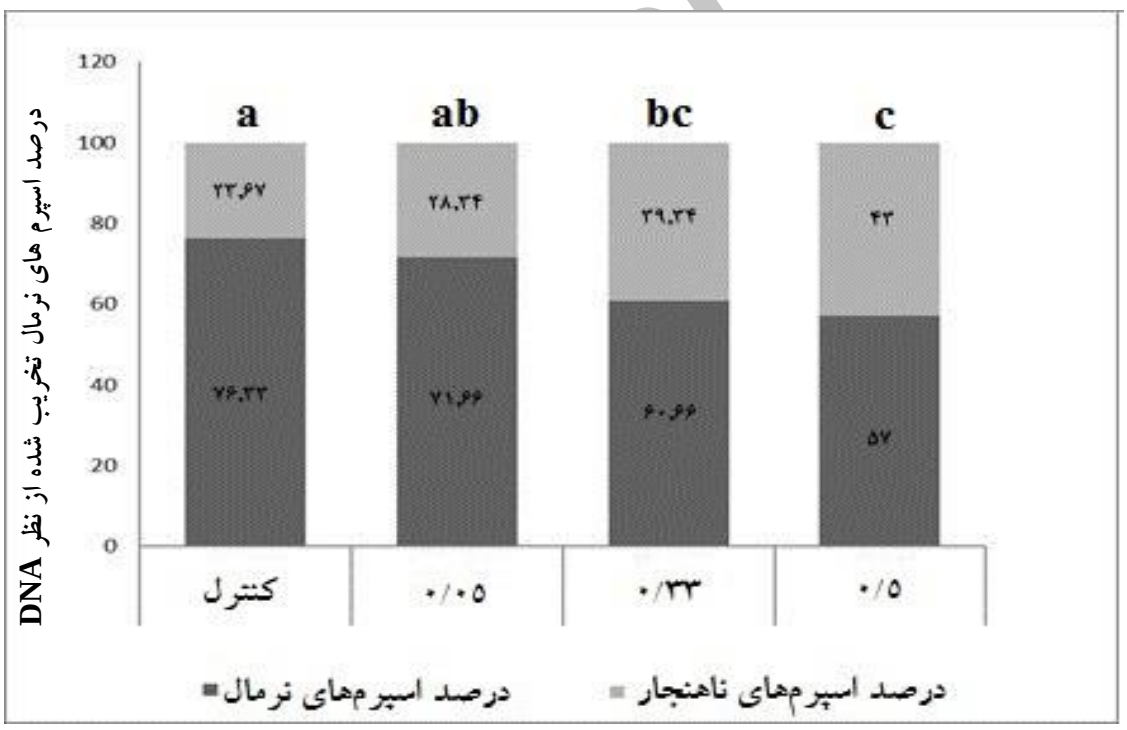
نمودار ۱- مقایسه انواع حرکات اسپرم در غلظت‌های متفاوت با گروه کنترل.

A: مستقیم به سمت جلو، B: حرکت به جلو و بعد تغییر جهت، C: حرکت درجا، D: بی‌حرکت

www.SID.ir

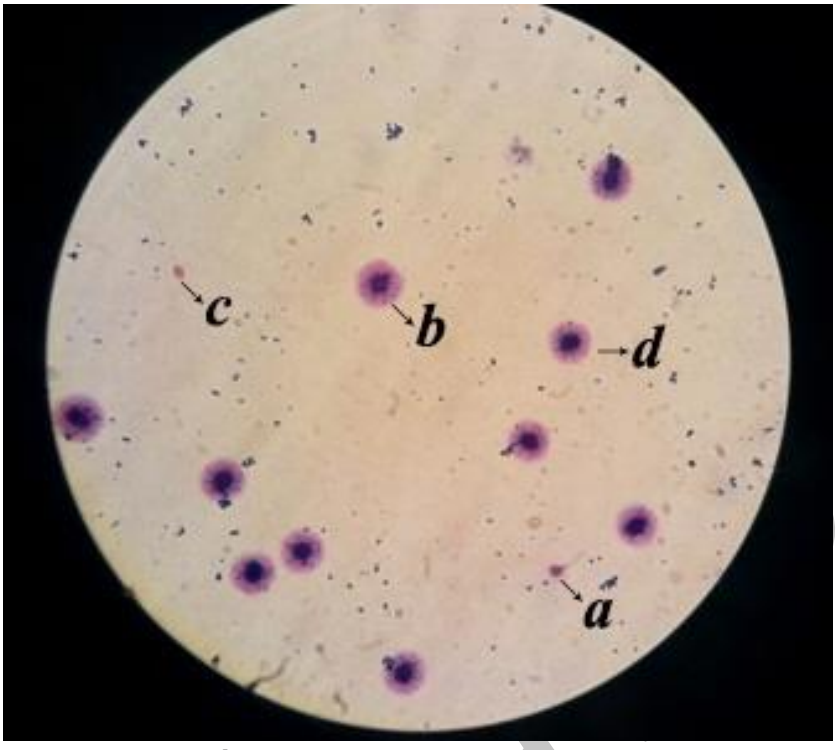


نمودار ۲- مقایسه وضعیت زنده‌مانی اسپرم‌ها در غلظت‌های مختلف با گروه کنترل.



نمودار ۳- مقایسه وضعیت تخریب DNA در سه غلظت ۰/۰۵، ۰/۳۳ و ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل همانطور که ملاحظه می‌شود در دو غلظت ۰/۳۳ و ۰/۵ تخریب DNA با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری و در این دو غلظت درصد اسپرم‌های abnormal بیشتر است.

www.SID.ir



شکل ۱- فراگمنتاسیون DNA. a: اسپرم بدون هاله (اسپرم با فراگمنتاسیون DNA). b: هاله بزرگ در اطراف سر اسپرم (سالم بودن DNA). c: اسپرم با DNA تجزیه شده (سر اسپرم صورتی دیده می‌شود). d: اسپرم با هاله متوسط (سالم بودن DNA)

بحث

پاتولین یکی از مایکوتوکسین‌هایی است که به وسیله‌ی کپک‌های موجود در میوه‌های فاسد شده بخصوص سیب و آبمیوه‌های حاصل از آنها تولید می‌شود. از آنجا که این ترکیب سرطان‌زا، موتاژن و تراتوژن است و باعث تضعیف سیستم ایمنی و عوارض گوارشی می‌شود می‌تواند روی DNA اسپرم نیز تأثیرگذار باشد [۱۱].

افزایش میزان ناباروری در مردان امروزه مورد توجه قرار گرفته است. در بسیاری از کارخانجات تولید آب سیب متأسفانه کنترل دقیقی بر میزان استاندارد این ماده در آب سیب وجود ندارد بنابراین مصرف زیاد این فراورده‌ها می‌تواند تخریب DNA و در نتیجه ایجاد اسپرم‌های غیرطبیعی و در نتیجه کاهش باروری را در پی داشته باشد. میزان مجاز پاتولین در آب سیب تولید شده در کارخانجات ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (برگرفته استاندارد ملی ایران ۵۹۲۵ سال ۱۳۸۰) و یا طبق WHO، ۵۰ میکروگرم در لیتر یا همان ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر است.

معمولاً مقدار این ماده در برخی آب سیب‌های حاصل از کارخانجات ایران بیش از مقدار مجاز آن یعنی ۷۶/۴۵ و ۸۸/۳۶ و حتی ۱۱۵/۲۵ میکروگرم در لیتر تعیین شده است [۱] یعنی حدوداً ۲ برابر مقدار مجاز آن است. بنابراین مصرف زیاد این آب میوه‌ها می‌تواند بر سلامت باروری افراد تأثیر سوء داشته باشد.

معلوم شده است که پاتولین کششی بسیار قوی با گروه‌های سولفیدریل دارد. به همین علت می‌تواند بسیاری از آنزیم‌ها را متوقف کند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که پاتولین باعث آسیب به سنتز DNA می‌شود. این اثرات ژنوتوکسیک ممکن است با توانایی واکنش با گروه‌های سولفیدریل و آلفای آسیب اکسیداتیو مرتبط باشد [۱۹، ۱۳] با این وجود تاکنون WHO به این نتیجه نرسیده است که پاتولین خاصیت ژنوتوکسیک دارد.

در مورد تأثیر عناصر مختلف مثل مس [۱۵] روی [۵] کبالت و کرومیوم [۱۶] و یا سموم مختلف مثل پیریدابن

www.SID.ir

[۳] هینازون و دیازینون [۲] Phenel-hydrogainone [۲٦] و Aflatoxin B_1 [۱۷] بر پارامترهای اسپرم مطالعات مختلفی صورت گرفته است.

اما تأثیر پاتولین بر باروری تنها در رت‌ها و موش‌ها بررسی شده است و مشخص شده که این سم باعث کاهش اسپرم [۲٤] و تأثیر بر روی سلول‌های گرانولوزا [۹] می‌شود. همچنین بر غشاء سلولی اثرات مستقیمی دارد اما تاکنون تأثیر مستقیم این سم بر روی سلول های اسپرم انسان در محیط آزمایشگاهی گزارشی در دسترس نیست بنابراین در این مقاله سعی شد تا تأثیر پاتولین بر پارامترهای اسپرم و بخصوص فراگمنتاسیون اسپرم مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که این سم می‌تواند باعث تخریب DNA اسپرم شود و همچنین تحرک اسپرم و میزان زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد بنابراین می‌تواند بر باروری مردان تأثیرگذار باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشکده محترم رویان، جهت در اختیار قرار دادن نمونه‌ها و سرکار خانم دکتر افتخاری استاد برجسته این پژوهشکده کمال تشکر و قدردانی اعلام می-گردد.

منابع

۱. حاج‌حسینی‌بابایی، ا.، پرویز، م.، رحمانی، ک.، قحربیگی، پ. ۱۳۹۱. چکیده مقالات اولین همایش ملی بهداشت کشاورزی ۸-۷ آذر ماه، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۲. جورسرایی، س.غ.، بیگی، ع.ا.، نیاپاشا، ی.ر.، علیزاده نوایی، ر. ۱۳۸٤. تأثیر سموم هینازون و دیازینون بر پارامترهای اسپرم انسان در حالت In vivo. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال هفتم، شماره ۲، صفحات ۳٤-۳۰.

۳. عبادی‌مناس، ق.، حسن‌زاده، ش.، نجفی، غ.، پریور، ک.، یغمایی، پ. ۱۳۹۲. اثر سم پیریداین بر روی انسجام DNA اسپرم و عملکرد تولیدمثلی موش‌های کوچک نر سفید آزمایشگاهی. فصلنامه طب تولیدمثل ایران، دوره یازدهم، شماره ۸، صفحات ٦۱۰-٦۰۵.

4. Alves I., Oliveira N.G., Laires A., Rodrigues A.S., Rueff J. (2000), Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis*, 15: 229-234.

5. Admidu N., owiredu W.K.B.A., Bekoe M.A.T., Quaye I. (2010), The impact of seminal Zinc and fructose concentration on human sperm characteristic. *Journal of Medical and Biomedical Sciences*, 1(1): 14-20.

6. Bourdiol D., Escoula L., salvayre R. (1990), Effect of Patulin on Microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 88: 29-33.

7. Bouhet S., Oswald I.P. (2005), The effects of Mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immuneresponse. Veterinary *Immunology and Immunopathology*, 108: 199-209.

8. Bouhet S., Hourcade E., Loiseau N., Fikry A., Martinez S., Roselli M., Galtier P., Mengheri E., Oswald I.P. (2004), The mycotoxin funonisin B1 altes the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 77: 165-171.

9. Burghardt R.C., Barhoumi R., Lewis E.H. (1992), Patulin-induced cellular toxicity avital fluotal fluorescence study *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112(2): 235-244.

10. Guo X., Dong Y., Yin S., Zhao C., Huo Y., Fan L., Hu H. (2013), Patulin induces pro-survival functions via autophagy in hibition and P62 accumulation. *Cell Death and Disease*, 4(10): e822.

Archive of SID

www.SID.ir

A.P., Kolf-Clauw M., Oswald I.P. (2009), The food contaminant deoxyinvalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237: 41-48.

19. Riley R.T., Showker J.L. (1991), the mechanism of Patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 109(1), 108-126.

20. Selmanoglu G., Kochoya EA. (2004), Investigation of the effects of Patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 42(5): 721-727.

21. Selmanoglu G. (2006), Evaluation of the reproductive toxicity of Patulin in growin male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12): 2019-2024.

22. Schumacher D.M., Metzler M., Lehmann L. (2005), Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Archives of Toxicology*, 79(2): 110-121.

23. Schumacher D.M., Wagner J., Metzler M., Lehmann L. (2005), Influence of decreased intracellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Mycotoxin Research*, 21: 150–152.

24. Selmanoglu G. (2007), Evaluation of the reproductive toxicity of Patulin in growing male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(12): 201-224.

25. Wichmann G., Herbarth O., Lehmann I. (2002), The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environmental Toxicology*, 17(3): 211-218.

26. Wang Z., Chen Z., Zuo Q. (2013), Reproductive toxicity in adult Malerats following intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles. *Journal of Orthopedic Science*, 18(6): 1020-1026.

11.Kumosani Ta., Elshl MF., Al-Jonaid AA., Abduljabar Hs. (2008), The influence of smoking semen quality seminal Mocroelements and Ca^{2+}-AT_{Pas} activity among in fertile and fertile men. *Clinical Biochemistry*, 41: 1199-1203.

12. Luft P., Oostingh GJ., Gruijthuijsen Y., Horejs-Hoeck J., Lehmann I., Duschl A. (2008), Patulin Influences the Expression of Th1/Th2 cytokines by Activated Peripheral Blood Mononuclear cells and T cells through Depletion of Intracellular Glutathione. *Environmental Toxicology*, 23(1): 84-95.

13. Liu B.H., Wu T.S., Yu F.Y., Su C.C. (2007), Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicological Sciences*, 95(2): 340-347.

14. Maresca M., Yahi N., Younes-sakr L., Boyron M., Caporiccio B., Fantini J. (2008), Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathologenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin- 1 beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228(1): 84-92.

15. Misro M.M., Chaki S.P., Chanpra M. (2008), Release of Copper from cut3 & OAco-incu bat with human semen and its effect on sperm function in vitro. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 52(3): 267-273.

16. Mandani P., Desai K., Highland H. (2013), Cytotoxic effect of Benzene Metabolities on human sperm function, An In vitro study. *Toxicology*, Article ID 397524, 6 pages

17. Murad AF., Ahmed Sh., Abead sh. (2015), Toxicity effect of Aflatoxin B1 on Reproductive system of Albino Male Rats. *Pakistan Journal of Biological sciences*, 18: 107-114.

18. Pinton P., Nougayrede J.P., Del Rio J.C., Moreno C., Marin D.E., Ferrier L., Bracarense

Archive of SID

www.SID.ir