Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ۵، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۳، ٤۰۰-۳۹۳

تاثیر نانو ذرات نقره بر پارامترهای اسپرم، گونه‌های فعال اکسیژن سرم و مایع سمینال موش

عاطفه رضی M.Sc.[۱]، علیرضا طالبی Ph.D.[۲*]، فاطمه پوررجب Ph.D.[۳]، سعید رضایی زارچی Ph.D.[۱]،
سیّد علیرضا رضوی ششده Ph.D. Student[۴]، حمید رضا شاهمرادی رضی M.Sc.[۳]

۱- دانشگاه پیام نور تفت، یزد ، ایران
۲- داشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، گروه بیولوژی و علوم تشریحی و مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، یزد، ایران
۳- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، گروه بیوشیمی، یزد، ایران
۴- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Prof_talebi@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

چکیده

هدف: با توجه به نقش نانوذرات نقره در افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و حساسیت بیش از حد سلول‌های اسپرم نسبت به آن‌ها، احتمال می‌رود که نانو ذرات نقره سبب کاهش کیفیت و توانایی بارورسازی اسپرم گردند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمی نانو ذرات نقره بر پارامترهای اسپرم و غلظت رادیکال‌های آزاد سرم ومایع سمینال موش نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش نر بالغ به‌صورت تصادفی به سه گروه تجربی ویک گروه کنترل تقسیم گردیدند. نانو ذره نقره به ابعاد ۴۰ نانومتر با مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر به ترتیب به گروه اول تا سوم مورد مطالعه به‌صورت دهانی به‌مدت پنج هفته داده شد. پس از خون‌گیری از قلب، سرم حاصل برای بررسی غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد آماده‌سازی قرار گرفت. برای آنالیز پارامترهای اسپرمی، پس از جداسازی دم اپی‌دیدیم، اسپرم‌های به‌دست آمده مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: گروه سوم تجربی (دوز بالا) دارای کمترین میانگین تعداد اسپرم (۲/۶ ± ۱۶/۰۰)، کمترین درصد اسپرم‌های با حرکت پیش رونده سریع (۵/۴۵ ± ۱۸/۱۶)، بیشترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (۴/۴۰ ± ۳۵/۸۳) و بیشترین میزان غلظت MDA در سرم و مایع سمینال در مقایسه با سایر گروه‌ها بودند.

نتیجه گیری: نانوذرات نقره به‌عنوان یکی از عوامل تشدید کننده اثرات رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن در سرم و مایع سمینال، سبب کاهش پارامترهای اسپرم همراه می گردند.

واژگان کلیدی: نانو ذرات، نقره، اسپرم، گونه‌های فعال اکسیژن، مایع سمینال، موش

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نانو تکنولوژی به فناوری موادی اطلاق می‌شود که ابعادی در حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر دارند (۱). نانوذرات دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند، به‌طوری‌که حتی این خصوصیات در موادی که از آن‌ها مشتق می‌شوند، دیده نمی‌شود. اندازه کوچک و مساحت سطحی بالای نانوذرات، سبب افزایش فعالیت شیمیایی آن‌ها گردیده و به آن‌ها اجازه می‌دهد که به‌عنوان یک کاتالیست با کارایی بالا عمل نمایند (۲ و ۳). این افزایش در فعالیت شیمیایی و فیزیکی، در بسیاری از نانوذرات منجر به کاربردهای گسترده آن‌ها در فرآیندهایی نظیر انتقال داروها، واکسن، تشخیص یا درمان انواعی از بیماری‌ها گردیده است (۴). نانوذرات نقره یکی از محصولات با ارزش تکنولوژی نانو می‌باشند که امروزه کاربردهای گسترده‌ای در علوم مختلف، به‌ویژه بیولوژی و پزشکی پیدا نموده‌اند. به‌عنوان مثال در زمینه پزشکی، از نانوذرات نقره به‌عنوان پوششی برای ترمیم زخم‌ها، تهیه ابزارهای جراحی و پروتزهای استخوانی و دندانپزشکی استفاده می‌شود. همچنین به‌علت خاصیت ضد میکروبی، می‌توان از این پوشش در صنایع بسته بندی مواد غذایی استفاده کرد (۵). دلیل اصلی برای کاربردهای گسترده نانوذرات نقره خاصیت ضد میکروبی آن می‌باشد. نانوذرات نقره دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی و ضد تک‌یاخته‌ها هستند، به‌طوری‌که با افزودن مقدار اندکی از این نانوذرات در پوشش‌ها می‌توان سطوح ضد میکروبی ایجاد کرد و آلودگی‌ها را برطرف نمود (۵، ۶ و۷). با افزایش کاربردهای نانوذرات نقره، احتمال در معرض قرار گرفتن انسان توسط این مواد نیز افزایش می‌یابد (۸ و ۹). تا کنون اثرات سمی برخی از نانو مواد تا حدودی ثابت شده و همین مسئله استفاده از آن‌ها را تا حدودی محدود کرده است (۱۰). نانو ذرات ممکن است از مسیرهای متفاوت وارد بدن شوند و این موضوع تعیین خطرات مربوط به هر ماده را با دشواری روبرو می کند. گزارش شده است که نانوذرات نقره هنگامی‌که از راه دهانی، تنفسی یا زیر پوستی مصرف شوند، به جریان خون وارد شده و در بعضی از اندام‌های بدن انباشته می‌شوند که موجب مسمومیت کبدی یا کلیوی و یا سلول‌های خونی می‌شود (۱۱- ۱۵).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، واسطه‌های شیمیایی با نیمه عمر پائینی هستند که در مسیرهای متابولیکی همه سلول‌های هوازی از اکسیژن مشتق می‌شوند. رادیکال‌های آزاد به‌خاطر داشتن الکترون جفت نشده بسیار واکنش‌پذیر بوده و قادرند برای جبران کمبود اکسیژن خود، ماکرومولکول‌های زیستی نظیر آمینواسیدها یا پروتئین‌ها، قندها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئوئیک را مورد حمله قرار داده و با آسیب شدید ساختار و عمل‌کرد سلولی نهایتا سبب مرگ زودرس سلولی می‌گردند (۱۶ و ۱۷). بدن انسان دارای یک سیستم دفاعی جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد موسوم به سیستم آنتی‌اکسیدانت است. عدم تعادل بین میزان رادیکال آزاد تولید شده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی باعث استرس اکسیداتیو می گردد (۱۷ و ۱۸). هم اکنون استرس اکسیداتیو القا شده با رادیکال‌های آزاد اکسیژن، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل پاتولوژی در بسیاری از بیماری‌ها محسوب می‌شود (۱۸ و ۱۹). با توجه به اینکه سلول‌های اسپرم همانند هر سلول هوازی دیگری در طی مسیرهای متابولیکی قادر به تولید ROS می‌باشند، شدیدا مستعد آسیب‌های اکسیداتیوی و نهایتا از دست دادن عمل‌کرد طبیعی خود هستند (۱۷). زمانی‌که غلظت این رادیکال‌های آزاد بیشتر از حد فیزیولوژیک خود گردد، منجر به اثرات اکسیداتیوی جبران ناپذیری نظیر اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، آسیب پروتئین‌ها، آسیب DNA و مرگ زودرس یا آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌شوند که نهایتا با عدم عمل‌کرد طبیعی سلول‌ها همراه خواهد بود (۱۶-۱۹).

پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) یکی از مهم‌ترین اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود و به‌طور عمومی تحت عنوان فساد اکسیداتیو اسیدهای چرب دارای چند پیوند غیر اشباع، نامیده می‌شود (۲۰). محصولات پراکسیداتیوی قادرند که خصوصیات فیزیکی غشاهای زیستی را تغییر دهند. بنابراین برداشت این محصولات پراکسیداتیوی لیپیدها، برای عمل‌کرد طبیعی غشاها ضروری بوده که توسط سیستم آنتی اکسیدانتی آنزیمی انجام می‌شود (۲۰ و ۲۱). از طرفی، اسپرم‌ها در مقایسه با دیگر سلول‌های بدن با اینکه سرشار از اسیدهای چرب در غشا خود هستند، ظرفیت آنتی اکسیدانتی موجود در سیتوپلاسم آن‌ها اندک می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که سلول‌های اسپرم بر خلاف دیگر سلول‌های بدن، حساسیت بالاتری نسبت به اثرات اکسیداتیوی داشته و در معرض آسیب‌های اکسیداتیوی بیشتری قرار داشته باشند (۲۱). از آنجایی‌که آنالیز مستقیم محصولات اولیه پرکسیداسیون لیپیدها کار بسیار مشکلی است، بنابراین بهتر است که محصولات ثانوی پرکسیداسیون لیپیدها جهت بررسی وضعیت اکسیداتیوی مورد آنالیز قرار گیرند (۲۲). محصولات اولیه پراکسیداسیون لیپیدها، ترکیبات ناپایداری

www.SID.ir

Archive of SID

هستند که طی واکنش‌هایی چند مرحله‌ای به ترکیبات ثانوی دیگری نظیر آلدئیدها و کتون‌ها شکسته می‌شوند (۲۳ و ۲۴). مالون دی الدئید (MDA) یکی از محصولات ثانوی پایدار از اکسیداسیون لیپیدها می‌باشد که به راحتی قابل اندازه‌گیری است (۲۵).

یکی از نانوذرات مهم با تاثیر بیولوژیکی فراوان، نانوذرات اکسید روی بوده که به‌طور معنی‌داری، بر تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها تاثیر منفی دارد به‌طوری‌که از نانوذرات اکسید روی به‌عنوان یک ماده سمی برای بافت بیضه یاد می‌گردد (۲۶). مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات نقره نیز به‌طور معنی‌داری، مرگ سلولی را از طریق مکانیسم‌های مرتبط بااسترس اکسیداتیو که موجب آسیب رساندن به DNA در سلول‌های پستانداران می‌شود، افزایش می‌دهند (۱۰). اثرات کلوئید نانوذرات نقره بر روی پارامترهای اسپرم قوچ در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد و نتایج حاصل از این آزمایش شاهدی بر ادعای سمیت نانونقره بر روی سلول‌های اسپرم می‌باشد (۲۷). به‌نظر می‌رسد که نانوذرات نقره اثرات جدّی و معنی‌داری بر روی فرآیند اسپرماتوژنز و همچنین تعداد سلول‌های اسپرم ساز و واکنش اکروزومی اسپرم موش صحرایی داشته باشد (۲۸).

با توجه به نقش نانوذرات نقره در تولید و افزایش رادیکال‌های آزاد و حساسیت بیش از حد سلول‌های اسپرم نسبت به اثرات پاتولوژیک گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش سطح آنتی‌اکسیدانتی اسپرم، احتمال می‌رود که نانو ذرات نقره سبب اثرات پاتولوژیک و استرس اکسیداتیو در مایع سمینال و در پی آن کاهش کیفیت و توانایی بارورسازی اسپرم گردند. به‌همین منظور در این مطالعه اثر احتمالی نانوذرات نقره بر ایجاد استرس اکسیداتیو در مایع سمینال و خون و همچنین کیفیت اسپرم موش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نانو ذرات نقره به ابعاد ۴۰ نانومتر به‌صورت محلول با غلظت $۱/۴۳ \times ۱۰^{-۴}$ مولار و وزن ۱۰۷/۸۶۸ گرم سنتز شده از پژوهشکده علوم پایه نانوفناوری دانشگاه پیام نور استان یزد تهیه گردید.

به‌منظور انجام این مطالعه تجربی، ۲۴ سرموش نر بالغ از نژاد سوری به ۴ گروه ۶ تایی شامل یک گروه کنترل و ۳ گروه تجربی تقسیم شده و در شرایط کنترل شده درجه حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۵۵ تا ۶۰ درصد با دوره نوری ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آسان به آب و غذای کامل طبق ضوابط قانون نگه‌داری از حیوانات آزمایشگاهی نگه‌داری شدند. موش‌های گروه مطالعه به‌مدت ۳۵ روز (بیش از یک دوره اسپرماتوژنز) به‌طور روزانه مورد تجویز دهانی نانوذرات نقره از طزیق گاواژ قرار گرفتند. گروه مورد مطالعه اول، دوم و سوم هر روز به‌ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر نانوذرات نقره محلول و گروه کنترل تنها سرم فیزیولوژی به‌صورت دهانی دریافت می‌نمودند.

پس از این مدت موش‌ها از لحاظ وزنی اندازه گیری و سپس توسط اتر بی‌هوش و با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتر از قلب موش‌ها (بطن راست) عمل خون‌گیری انجام شد. سرم حاصل از هر نمونه در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و برای اندازه‌گیری غلظت مالون در آلدئید (MDA) با استفاده از روش اسپکتروفتومتری مورد استفاده قرار گرفت (۲۹).

جهت بررسی پارامترهای اسپرمی پس از بی‌هوش کردن موش‌های مورد مطالعه، ناحیه شکم برش داده شد و دم اپی‌دیدیم که در قطب تحتانی هر بیضه قابل مشاهده بود، توسط قیچی استریل بریده و در محیط کشت HamsF10 قرار گرفت. سپس با فشردن و تکان دادن آرام، سلول‌های اسپرم به‌صورت شناور وارد محیط کشت شدند. قطعات اضافی اپی‌دیدیم از داخل ظرف برداشته شده و این محیط کشت حاوی سوسپانسیون اسپرم به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فشار CO_2، ۵ درصد انکوبه شد. سپس سوسپانسیون حاوی اسپرم مربوط به هر نمونه توسط سمپلر برداشته شده و مورد آنالیز قرار گرفت. باقیمانده نمونه‌ها به میکروتیوپ انتقال یافتند و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰g سانتریفوژ گردیدند. پس از آن مایع رویی برداشته شده و سریعا در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده تا بعدا برای اندازه گیری MDA مورد بررسی قرار گیرند.

پارامترهای اسپرم: مطالعه شکل ظاهری (morphology) اسپرم‌ها، با استفاده از پروتکل استاندارد پاپانیکولا انجام گردید (۳۰). این نوع رنگ آمیزی که یکی از روش‌های معمول برای بررسی مورفولوژی اسپرم می‌باشد، نواحی آکروزوم و بخش سر و قطعه میانی اسپرم رنگ‌آمیزی شده و اشکال طبیعی و

www.SID.ir

Archive of SID

غیرطبیعی اسپرم، در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۱۰۰ مورد بررسی قرار می‌گیرند. مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم شامل اسپرم‌هایی با دو سر، سر بزرگ، سر کوچک، سر گرد، بدون آکروزوم، بدون سر، دم بلند یا کوتاه، بدون دم و یا دم پیچ خورده و قطره سیتوپلاسمی در ۲۰۰ اسپرم مشاهده گردیده و گزارش شدند.

برای بررسی تحرک (motility) اسپرم‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه را در مرکز Makler chamber قرار داده و پس از گذاشتن درپوش توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۴۰ مشاهده و شمارش گردیدند. در این بررسی، تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم مورد شمارش قرار گرفته و از این تعداد درصد تحرک اسپرم بر اساس معیار سازمان جهانی سلامت (WHO) مشخص گردید (۳۱ و ۳۲). بر این اساس، تحرک اسپرم‌ها به گروه‌های بدون تحرک (Immotile)، متحرک با حرکت پیش رونده سریع (Fast progressive motile)، متحرک با حرکت پیش رونده آهسته (Slow progressive motile) و اسپرم‌های متحرک به فرم درجا (Non-progressive motile) تقسیم شدند.

مطالعه قابلیت حیات (Viability) اسپرم‌ها به‌روش بررسی سلامت غشا سیتوپلاسمی اسپرم، با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۱۰۰ انجام گردید (۳۱). اسپرم‌های زنده به‌دلیل سالم بودن غشا سیتوپلاسمی رنگ ائوزین وارد شده به‌داخل سلول را مجددا خارج می‌کنند و بنابراین در زیر میکروسکوپ بدون رنگ قابل مشاهده هستند. در حالی‌که که اسپرم‌های مرده به‌دلیل غشا آسیب دیده رنگ وارد شده به‌داخل سلول را حفظ نموده، بعد از شستشو همچنان به به حالت رنگی مشاهده می‌شوند.

اندازه گیری MDA در سرم و مایع سمینال: نمونه‌های سرم و مایع سمینال فریز شده بعد از قرار گرفتن در دمای اتاق برای اندازه گیری MDA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفتند. به‌طور خلاصه ۵۰ میکرولیتر از نمونه های مورد آزمایش با مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول آب مقطر دو بار تقطیرشده مخلوط گردیده و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. با اضافه کردن ۳۰۰ میکرو لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد واکنش متوقف شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردیدند. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی را برداشته شده و به آن ۲۰۰ میکرو لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید ۶۷ درصد اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب جوش نگه‌داری گردید. پس از سرد شدن نمونه‌ها، جذب نوری در طیف ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۲۴ و ۲۹).

آنالیز آماری: برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار آماری SPSS Windows Version 16 استفاده گردید. میانگین تمام پارامترها به‌صورت Mean±SD و سطح معنی‌دار $p< ۰/۰۵$ نشان داده شد. مقایسه میانگین غلظت کیفیت پارامترهای اسپرمی و غلظت MDA در بین تمام گروه‌ها با استفاده از آنالیز ANOVA و بین دو گروه با آزمون t-test مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودار استاندارد غلظت‌های مختلف MDA به‌کمک نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج

در بررسی وزن حیوانات مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌ها و همچنین قبل و بعد از تیمار موش‌ها با نانوذرات نقره مشاهده نگردید. مقایسه میانگین تعداد اسپرم‌ها بین گروه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان داد. به‌طوری‌که گروه مطالعه سوم، که بیشترین دوز مصرفی نانوذرات نقره را دریافت کرده بود، به‌طور معنی‌داری کمترین میانگین تعداد اسپرم در مقایسه با گروه کنترل و حتی در مقایسه با گروه‌های مورد مطالعه اول و گروه دوم بود (جدول۱). مقایسه میانگین درصد حرکت پیش رونده سریع اسپرم‌ها بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد. میانگین درصد اسپرم‌هایی با حرکت پیش رونده سریع در گروه مورد مطالعه ۳ به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود. از طرفی درصد حرکت پیش رونده سریع در گروه مورد مطالعه ۱ در مقایسه با سایر گروه‌ها و حتی گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است. تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه ۲ مشاهده نگردید (جدول۱). در مقایسه میانگین درصد حرکت پیشرونده آهسته اسپرم‌ها نیز، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه ۳ و ۲ مشاهده نگردید. همچنین درصد اسپرم‌های با حرکت آهسته در گروه مورد مطالعه ۳ و ۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۲ گزارش گردید (جدول۱). میانگین درصد حرکت غیرطبیعی به فرم درجا در گروه ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی داری افزایش یافته بود. درحالی‌که گروه کنترل به‌طور معنی دارای کمترین میانگین درصد اسپرم‌های متحرک

www.SID.ir

Archive of SID

به فرم درجا در مقایسه با گروه ۲ و گروه ۳ داشت. تفاوت معنی‌داری بین میزان تحرک گروه کنترل و گروه ۱ مورد مطالعه مشاهده نگردید (جدول۱).

مقایسه مورفولوژی اسپرم‌ها بین گروه‌های مختلف نشان داد که درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در گروه‌های مورد مطالعه، به‌ویژه در گروه‌های دریافت کننده دوزهای بالاتر نانوذرات نقره بیشتر بوده و حداکثر تفاوت بین گروه ۳ و گروه کنترل مشاهده گردید (جدول۱).

آنالیز میانگین درصد قابلیت حیات اسپرم‌ها، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان داد. در این میان گروه مورد مطالعه دوم و سوم کمترین درصد اسپرم‌های زنده را در مقایسه با گروه کنترل داشتند. تفاوت معنی داری بین درصد اسپرم‌های زنده در گروه کنترل و گروه اول مشاهده نگردید (جدول۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم در گروه های مختلف

پارامترهای اسپرم	گروه کنترل (n=6)	گروه مطالعه a (n=6)	گروه مطالعه b (n=6)	گروه مطالعه c (n=6)	p- value abc	p-value ab	p-value ac	p-value bc
تعداد اسپرم ml (×۱۰۶)	۲۳/۶۶±۵۵/۳	۱۳/۵±۴/۵۹	۱۷/۲۲±۰۸/۳	۱۶±۲,۶	*۰/۰۰۴	۰/۸۹۷	*۰/۰۰۸	۰/۰۵۳
اسپرم های زنده (٪)	۶۳/۱۶±۵/۰۳	۶۱/۶۶±۳/۷۷	۵۹±۷/۲۹	۵۱/۴±۸	*۰/۰۲۹	۰/۰۲۷	۰/۶۶۱	۰/۲۱۹
حرکت پیشرونده سریع (٪)	۳۵/۸۳±۴/۴۹	۴۹±۸/۱۴	۳۷/۶±۴/۳۳	۱۸/۱۶±۵/۴۵	*۰/۰۰۰	*۰/۰۰۵	*۰/۰۰۰	*۰/۰۰۰
حرکت پیشرونده آهسته (٪)	۳۳/۵±۲/۳۴	۲۲/۳۳±۵/۶۴	۱۵/۶±۲/۵۱	۲۲/۳۳±۵/۶۸	*۰/۰۰۰	*۰/۰۱۹	۱/۰۰۰	*۰/۰۱۹
متحرک به فرم درجا (٪)	۱۹/۱۶±۴/۷	۱۶/۸۳±۳/۵۴	۲۸/۲±۳/۱۱	۴۴±۵/۸۳	*۰/۰۰۰	*۰/۰۰۱	*۰/۰۰۰	*۰/۰۰۰
اسپرم های بی حرکت (٪)	۱۱/۵±۲/۸۸	۱۱/۶۶±۳/۳۸	۱۸/۴±۵/۲۲	۱۷±۳/۲۸	*۰/۰۰۹	*۰/۰۰۷	*۰/۰۲۲	۰/۵۴۱
اسپرم های با مورفولوژی طبیعی (٪)	۷۰/۸۳±۵/۴۷	۶۹/۱۷±۳/۶	۶۴/۶۷±۳/۸	۶۴/۱۷±۵/۶	۰/۱۹۲	۰/۲۶۲	*۰/۰۲۷	۰/۹۷۳

گروه دریافت کننده دوز ۵۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره = a

گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره = b

گروه دریافت کننده دوز ۲۰۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره = c

در بخش بررسی میانگین غلظت MDA سرم، غلظت این ماده از گروه کنترل به گروه ۳ رو به افزایش بوده و تفاوت معنی‌داری بین گروه ۳ و گروه کنترل مشاهده شد (جدول ۲). میانگین غلظت MDA مایع سمینال نیز در گروه‌های مورد مطالعه ۲ و ۳ در مقایسه با گروه‌های کنترل و گروه ۱ به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین غلظت MDA در گروه‌های مختلف

غلظت MDA برحسب nmol/ml	گروه کنترل (n=6)	گروه مطالعه a (n=6)	گروه مطالعه b (n=6)	گروه مطالعه c (n=6)	p- value abc	p-value ab	p-value ac	p-value bc
مایع سرم	۰/۳۳۱	۰/۳۳۲	۰/۳۶۰	۰/۴۳۰	۰/۰۶۹	۰/۱۷۲	*۰/۰۰۰	*۰/۰۰۸
مایع سیمن	۰/۲۷۷	۰/۲۷۸	۰/۳۲۳	۰/۳۴۶	*۰/۰۲۶	*۰/۰۰۰	*۰/۰۰۰	۰/۰۵۷

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این پژوهش, اثرات مضر نانوذرات نقره ۴۰ نانومتر با دوزهای مختلف (۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) برروی کیفیت اسپرم و استرس‌های اکسیداتیو موش بررسی گردیده و نتایج با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که افزایش دوز، اثر سمیت بیشتری را در حیوان ایجاد می‌کند. حیوانات گروه تجربی سوم که بیشترین دوز مصرفی نانوذرات نقره را دریافت کرده بودند، به‌طور معنی‌داری کمترین میانگین تعداد اسپرم، کمترین درصد اسپرم‌های با حرکت پیش رونده سریع، بیشترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و بیشترین میزان غلظت *MDA* در سرم و مایع سمینال در مقایسه با گروه کنترل و حتی گروه‌های مورد مطالعه اول و گروه دوم بودند. به‌طور کلی می‌توان گفت که اثر نانوذره نقره بر کیفیت اسپرم قابل ملاحظه بود.

همانطور که در بخش مقدمه عنوان گردید نانوذرات فلزی دارای اثرات مخربی بر سیستم‌های بیولوژیکی و بافت‌های مختلف بدن می‌باشند. در یک مطالعه اثر نانوذرات نقره بر روی سلول‌های خونی موش مورد بررسی گرفته و نشان داده شد که نانوذرات نقره در دوزهای بالا (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) منجر به مهار فرآیند انعقاد توسط پلاکت‌ها در خون و در نتیجه افزایش زمان خون‌ریزی می‌گردند. علاوه بر این نتایج آن‌ها مشخص نمود که تعداد سلول‌های خونی از جمله تعداد سلول‌های سفید و قرمز، غلظت هموگلوبین، تعداد نوتروفیل و لنفوسیت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های کنترل تغییر کرده است (۱۱). یافته‌های دیگر نیز نشان‌دهنده افزایش آپوپتوزیس و نکروز بافتی به‌دنبال مصرف نانوذرات نقره در بافت‌هایی همچون ریه و بیضه می‌باشند (۱۲).

مطالعات متعددی نیز اثر نانوذرات به ویژه نانوذرات نقره را بر پتانسیل باروری و عمل‌کرد اسپرم مورد بررسی قرار داده‌اند. در بررسی که اخیرا توسط گروه تحقیقاتی *Talebi* صورت پذیرفت، تاثیرات توکسیک نانوذرات روی بر فرآیند اسپرماتوژنز و کاهش سلول‌های زایای لوله‌های اسپرم ساز موش مشاهده گردید (۲۶). همچنین گروه تحقیقاتی Komatsu ضمن بررسی اثر نانوذرات اکسید تیتانیوم (*TiO2*) بر توانایی باروری موش‌ها، نشان دادند که این نانوذرات با القا مسیر استرس اکسیداتیو سبب کاهش شدید سلول‌های لایدیگ، قابلیت حیاتی اسپرم و همچنین بیان برخی از ژن‌ها می‌شوند (۳۳).

در مطالعه حاضر علی‌رغم اینکه ناهنجاری‌های *DNA* اسپرم مورد آنالیز قرار نگرفت ولی به‌دلیل افزایش میزان *MDA* سرم و مایع سمینال می‌توان نتیجه گرفت که طبیعتا بایستی اسپرم‌هایی با ناهنجاری‌های کروماتین نیز به‌دنبال تیمار با نانوذرات نقره افزایش یافته باشد. در راستای یافته‌های تحقیق حاضر، در مطالعه‌ای مشابه ضمن بررسی اثر نانوذرات نقره بر میزان اکسیداسیون *DNA* و پارامترهای اسپرمی نشان داده شده است که افزایش اکسیداسیون *DNA* و تغییر مورفولوژی مجاری اسپرم‌ساز در گروه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره به‌میزان معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بوده است. لازم به‌ذکر است که در این پژوهش تغییری در تعداد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی بین گروه‌ها مشاهده نگردید (۳۴).

یکی از یافته‌های تحقیق حاضر مشاهده کاهش تعداد اسپرم به‌دنبال مصرف نانوذرات نقره در موش‌ها بود. در یک پژوهش، اثرات کلوئید نانوذرات نقره بر پارامترهای اسپرماتوزوای قوچ در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردیده و نتایج حاصل از این آزمایش، سمیت نانوذرات نقره بر فرآیند اسپرم‌سازی و کاهش تعداد اسپرماتوزوا مشاهده گردید (۲۷). همچنین *Miresmaeili* و همکاران (۲۸) نشان دادند که نانوذرات نقره اثرات جدی و معنی‌داری بر فرآیند اسپرماتوژنز و تعداد سلول‌های اسپرم‌ساز و همچنین واکنش اکروزومی در سلول‌های اسپرمی موش صحرایی دارد.

همانطور که در تحقیق ما مشاهده گردید، وضعیت استرس اکسیداتیو در مایع سمینال و سرم نمونه‌های مورد بررسی، عامل مهمی در کاهش کیفیت اسپرم محسوب می‌گردد و با توجه به اینکه نانوذرات نقره با مکانیسم‌های متعددی سبب افزایش سطح رادیکال‌های آزاد می‌گردند، بنابراین انتظار می‌رود که درصد اسپرم‌هایی با *DNA* آسیب دیده و جهش یافته نیز در حیوانات مورد آزمایش افزایش یابد. لازم به‌ذکر است که این وضعیت می‌تواند سبب بروز آسیب های متعددی در نسل های آینده گردد (۳۵).

آنالیز حاصل از کیفیت اسپرم و میزان *MDA* در این تحقیق نشان داد که کیفیت اسپرم موش‌های دریافت کننده نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته و این کاهش وابسته به دوز مصرفی می‌باشد. به‌عبارتی با افزایش دوز نانوذرات نقره، کیفیت پارامترهای اسپرم، به‌ویژه درصد مورفولوژی طبیعی، تعداد اسپرم‌های زنده و درصد اسپرم‌های

www.SID.ir

Archive of SID

متحرک کمتر می‌گردد. با توجه به اطلاعات موجود به نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر نانوذرات نقره بر کیفیت اسپرم، تشدید استرس اکسیداتیو و به‌ویژه پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم‌ها باشد (۳۴، ۱۷). با توجه به نتایج تحقیق ما، نانوذرات نقره یکی از عوامل تشدید کننده اثرات اکسیداتیوی در سرم و مایع سمینال محسوب می‌شود که با کاهش سیالیت غشا اسپرم و پارامترهای اسپرمی همراه می‌باشد (۱۶ و ۱۷). اگرچه امروزه با پیشرفت تکنیک‌های مختلف، اکثر مردان نابارور ممکن است که بدون هیچ مشکل خاصی صاحب فرزند شوند، اما احتمال اینکه یک اسپرم غیر طبیعی (مثلا اسپرمی که در یک یا چند ژن خاص دچار جهش شده باشد) به‌صورت مصنوعی (مثلا از طریق *ICSI*) در بارورسازی تخمک شرکت نماید، وجود دارد و این مشکل ممکن است که اولا منجر به یک لقاح ناموفق گردد و یا اینکه در نسل‌های آینده اثرات خود را نشان دهد و سبب اثرات شدیدی در نوزادان مثل انواع سرطان و یا عدم تکامل طبیعی جنین گردد. بنابراین بررسی و رسیدگی به استفاده از نانوذرات نقره در زمینه‌های مختلف از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به‌عنوان یکی از فاکتورهای اساسی موثر بر روی توانایی باروری مردان باید به دقت مورد بررسی قرار گیرد و تحقیقات بیشتر، درک مکانیسم دقیق روند تاثیر نانوذرات بر بافت‌های مختلف را روشن خواهد ساخت.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف نانو ذرات نقره علاوه کاهش کیفیت اسپرم، سبب افزایش میزان *MDA* در مایع سمینال و سرم خون موش می‌گردد. همچنین مشخص گردید که اثرات فوق وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز مصرفی این اثرات مضر شدیدتر بروز می نمایند.

تشکر و قدردانی

با تشکر از راهنمایی‌های بی شائبه اساتید و همکاران پژوهشکده علوم پایه و فناوری نانو فناوری دانشگاه پیام نور استان یزد، مرکز درمانی و تحقیقاتی ناباروری و گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد که در مراحل مختلف این تحقیق همکاری داشتند.

منابع

1. Masciangioli T, Zhang W. Environmental technologies at the nanoscale. Environ .Sci. Technol. 2003; 37(5): 102.

2. Erb U, Aust KT, Palumbo G. Nanostructured materials: processing, properties and potential applications. New York: Noyes Publications; 2002: 179-222.

3. Goddard WA, Brenner DW, Lyshevski SE, Iafrate GJ. Handbook of nanoscience engineering, and technology. USA: CRC Press; 2002: 22-47.

4. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicol Lett. 2008; 176 (1): 1–12.

5. Buzea C, Pacheco I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles:Sources and toxicity. Biointerphases. 2007; 2(4): 17-71.

6. Gibbons B, Warner L. The role of antimicrobial silver nanotechnology. Medical Device and Diagnostic Industry Magazine. 2005; 27(5): 164-169.

7. Panacek A, Kvitek L, prucek R, Kolar M. et al Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity. J Phys Chem. 2006; 110(33): 16248-16253.

8. Tang J, Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2008; 25(4): 958-61.

9. Panyala NR, Pena-Mendez EM, Havel J. Silver or silver nanoparticles: A hazardous threat to the environment and human health? J.Appl.Biomed. 2008; 6: 117-129.

10. Ostiguy C, Soucy B, Lapointe G, Woods C, et al. Health Effects of Nanoparticles Second ed. Quebec: IRSST; 2008: 589-590.

11. Hamrahi-michak M, Sadeghi SA, Haghighi H, Ghanbari-kakavandi Y, et al. The toxicity effect of cerium oxide nanoparticles on blood cells of male Rat. Annals of Biological Research. 2012; 3(6): 2859-2866.

12. Ranjbar Sardari RR, Rezaei Zarchi S, Talebi A, Nasri S. et al. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. African Journal of Microbiology Research. 2012; 6(27): 5587-5593.

13. Parka E, Bae E. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2010; 30(2): 162–168.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, et al Twenty-eight day oral toxicity, genotoicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats. Inhal. Toxicol. 2008; 20(6): 575–583.

15. Hyun JS, Lee BS, Ryu HY, Sung JH, et al. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. Toxicol. Lett. 2008; 182 (1–3): 24–28.

16. Warren JS, Johnson KJ, Ward PA .Oxygen Radicals in Cell Injury and Cell Death Pathol. Immunopathol. Res. 1987; 6(5-6): 301–315.

17. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. J Androl. 1995; 16(6): 464-8.

18. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of humn reproduction. Fertil Stil. 2003; 79(4): 829-843.

19. Ochsendorf FR. Infection in male genital tract and reactive oxygen species. Human reproduction Update. 1999; 5(5): 399-420.

20. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: From Research Bench to Clinical Practice. Journal of Andrology. 2002; 23(6): 737-752.

21. Zabludovsky N, Eltes F, Geva E, Berkovitz E, et al. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. Andrologia. 1999; 31: 91-8.

22. Aitken RJ, Clarkson JS, Fisher S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod. 1989; 40: 183-197.

23. Iwasaki A, Gagnon A. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril. 1992; 57: 409-416.

24. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978; 105: 302-310.

25. Tavilani H, Doosti M, Saiedi H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. Clinica Chemica Acta. 2005; 356(1-2): 199-203.

26. Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. J Assist Reprod Genet. 2013; 30(9): 1203–1209.

27. Mirshokraei P, Hassanpour H, Akhavan Taheri M, Riyahi M, et al. The in vitro effects of nanosilver colloid on kinematic parameters of ram spermatozoa. Iranian Journal of Veterinary Research. 2011; 12: 317-323.

28. Miresmaeili SM, Halvaei I, Fesahat F, Fallah A, et al Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat. Iran J Reprod Med. 2013; 11(5): 423-430.

29. Siddiqi N, Abdelhalim MAK, El-Ansari LK, Alhomida AS, et al. Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains. JNI. 2012; 9(123): 1-7.

30. Zare Z, Eimani H, Mohammadi M, Mofid M, et al. The Effect of Orally Administered L-carnitine on Testis Tissue, Sperm Parametrs and Daily Sperm Production in Adult Mice.Yakhte medical journal. 2010; 11(4): 382-389.

31. World Health Organization (WHO) Laboratory manual for the examination of human and sperm-cervical mucus interaction. 4th Ed Cambridge university press; 1999.

32. Lin MH, Morshedi M, Stisombot C, Nassar A, et al. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of results of the hyposomatic test, the water test and eosin- Y staining. Fertil Steril.1998; 10: 1148-55.

33. Komatsu T, Tabata M, Kubo-Lrie M, Shimizu T, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. Toxicol In Vitro. 2008; 22(8): 1825-1831.

34. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. Toxicol Lett. 2012; 214(3): 251-8.

35. Braydich-Stolle LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, et al. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. Toxicological Scences. 2010; 116(2): 577-589.

www.SID.ir