

## Original Article

**Copper oxide nanoparticles toxicity on pituitary gonadal axis  
and spermatogenesis in male rats**

Sajjad Rajabi, M.Sc in Animal Physiology, Payam Noor University of Tehran, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-1901-9225

\*Ali Noori (Ph.D), **Corresponding Author**, Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. E-mail: ali.noori55@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-3083-6602

Fateme Shahbazi (Ph.D), Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-4091-0135

**Abstract**

**Background and Objective:** Copper oxide nanoparticles with unique properties have numerous biological applications with probably toxicity. This study was conducted to determine the toxicity of copper oxide nanoparticles on the pituitary-gonadal axis and spermatogenesis in male rats.

**Methods:** In this experimental study, 40 male Wistar rats were randomly allocated into 4 groups including control group and three intervention groups which receiving the concentration of 10, 20 and 30 mg/kg of copper oxide nanoparticles 5 times intra-peritoneally, respectively. Blood sampling was collected first day and 15 days after the last injection. Level of testosterone, FSH and LH were measured by ELISA method. After anesthesia and dissection of mice in each group, tissue sections of testis were prepared and stained with hematoxylin-eosin. Morphological status of spermatogenesis process and counting of types of cells (spermatogonium, spermatocyte and spermatid) were studied by optical microscope.

**Results:** In the first day of blood collection, a significant increase in LH and FSH level was observed at concentrations of 10 and 30 mg/kg, respectively. Also, Testosterone and FSH level decreased significantly reduced at 10 mg/kg/bw concentration compared to control ( $P<0.05$ ). In 15 days after of the last injection, level of testosterone ( $P<0.05$ ) and LH ( $P<0.05$ ) significantly increased in concentrations of 10 and 30 mg/kg/bw respectively. Also, there was a significant reduction in level of FSH in the concentration of 10 mg/kg/bw ( $P<0.05$ ). The examination of testis tissue sections showed a significant decrease ( $P<0.05$ ) in density and number of cell types (spermatogonium, spermatocyte and spermatid) and anomalies in the spermatogenesis process, in a dose-dependent manner. The most disturbances was seen at a concentration of 30 mg/kg/bw of copper oxide nanoparticles.

**Conclusion:** Copper oxide nanoparticles may interfere with the secretion of gonadotropins and testosterone and ultimately lead to a disruption of the spermatogenesis process.

**Keywords:** Copper oxide nanoparticles, Gonadotropins, Testosterone, Spermatogenesis

Received 19 Aug 2018

Revised 26 Dec 2018

Accepted 30 Dec 2018

Cite this article as: Sajjad Rajabi, Ali Noori, Fateme Shahbazi. [Copper oxide nanoparticles toxicity on pituitary gonadal axis and spermatogenesis in male rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Autumn; 21(3): 49-56. [Article in Persian]

## سمیت نانو ذرات اکسید مس بر محور هیپوفیز-گناد و اسپرماتوژنز در موش صحرائی نر

ORCID ID: 0000-0002-1901-9225

سجاد رجیبی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران.

ORCID ID: 0000-0003-3083-6602

\* دکتر علی نوری، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-4091-0135

دکتر فاطمه شهبازی، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** نانوذرات اکسید مس با داشتن خواص منحصر به فرد، دارای کاربردهای بیولوژیک متعدد هستند. به طوری که احتمال ایجاد سمیت توسط آنها وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین سمیت نانوذرات اکسید مس بر محور هیپوفیز-گناد و اسپرماتوژنز در موش صحرائی نر انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار به ۴ گروه شامل گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس در ۵ مرتبه به صورت درون صفاقی، تقسیم شدند. خونگیری در دو مرحله (یک و ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق) انجام گردید و میزان هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH با روش الیزا اندازه‌گیری شدند. پس از بیهوشی و تشریح موش‌ها در هر گروه، مقاطع بافتی بیضه تهیه و به روش هماتوکسیلین-انئوزین رنگ‌آمیزی شدند. وضعیت مورفولوژیک روند اسپرماتوژنز و شمارش انواع سلول‌ها (اسپرماتوگوننی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در مرحله اول خونگیری افزایش آماری معنی‌دار مقادیر LH و FSH به ترتیب در غلظت ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) و میزان تستوسترون و FSH در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). در مرحله دوم خونگیری، افزایش آماری معنی‌دار مقادیر تستوسترون و LH در همه گروه‌های تیمار و در غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ). همچنین مقدار FSH در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش آماری معنی‌داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). بررسی مقاطع بافتی بیضه کاهش آماری معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) تراکم و تعداد انواع سلول‌ها (اسپرماتوگوننی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) و ناهنجاری در روند اسپرماتوژنز را به‌صورت وابسته به دوز نشان داد. به‌طوری‌که بیشترین اختلالات در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً نانوذرات اکسید مس سبب ایجاد اختلال در ترشح گنادوتروپین‌ها و هورمون تستوسترون شده و در نهایت منجر به ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنوز می‌شود.

**کلید واژه‌ها:** نانو ذرات اکسید مس، گنادوتروپین‌ها، تستوسترون، اسپرماتوژنز

\* نویسنده مسؤل: دکتر علی نوری، پست الکترونیکی [ali.noori55@gmail.com](mailto:ali.noori55@gmail.com)

نشانی: اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، تلفن ۰۳۱-۳۷۴۲۰۱۳۵، نمابر ۰۳۱-۳۷۴۳۰۱۴۵

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۵/۲۸، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/۱۰/۵، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۹

### مقدمه

تومورها گزارش شده است (۳). به دلیل رشد فزاینده کاربرد نانوذرات، نگرانی ناشی از خطرات آنها که اغلب از طریق ایجاد فشارهای اکسیداتیو (Reactive oxygen species: ROS) رخ می‌دهد؛ در حال افزایش است به طوری که برخی محققین نشان دادند اگر میزان تجمع ذرات مس از آستانه تحمل فیزیولوژیک موجودات زنده تجاوز کند؛ ممکن است باعث سمیت شود و اختلالاتی در عملکرد کبد و کلیه ایجاد گردد (۴) و اثرات سمی نظیر همولیز، تخریب اپیتلیال ریوی و پاسخ التهابی را به همراه دارد (۵و۶). نانوذرات اکسید مس در سلول‌های اپیتلیال حبابچه‌های ریوی نسبت به نانوذرات SiO<sub>2</sub> و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> سمیت سلولی بیشتری نشان

پیشرفت‌های اخیر در فناوری نانو، امکان تولید نانو ساختارهایی منحصر به فرد را فراهم کرده است که دارای ویژگی منحصر به فرد از نظر اندازه، سطح، مقاومت و انعطاف‌پذیری است. در این میان نانوذرات اکسید مس کاربردهای متعدد و موثری نظیر استفاده در ساخت کاتالیزورها، روان کننده‌های سوخت، رنگ، هدایت الکتریکی، لوازم آرایشی و انتقال دارو یافته‌اند (۱). برخی مطالعات نیز فعالیت ضد میکروبی قابل توجه نانوذرات اکسید مس را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده اند (۲). در تحقیقات دیگری نیز فعالیت ضدسرطانی نانوذرات اکسید مس برای درمان

برای جلوگیری از ایجاد رسوب نانوذرات و تهیه سوسپانسیون نسبتاً یکنواخت، نمونه‌های آماده شده قبل از تزریق در دستگاه اولتراسونیک FALC-LB5210 ساخت ایتالیا با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دامنه ۴۰ درصد برای مدت سی دقیقه قرار گرفتند (۱۳).

**حیوانات:** برای انجام این تحقیق ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری شد و در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی به منظور سازگاری با محیط در مرکز پرورش حیوانات نگهداری شدند.

حیوانات به صورت تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل: طی ۱۰ روز فقط سرم فیزیولوژیک دریافت کردند.

گروه تیمار اول: طی مدت ۱۰ روز به صورت یک روز در میان، نانوذرات اکسید مس را با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی دریافت کردند (۱۱ و ۱۲).

گروه تیمار دوم: طی مدت ۱۰ روز به صورت یک روز در میان، نانوذرات اکسید مس را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی دریافت کردند (۱۱ و ۱۲).

گروه تیمار سوم: طی مدت ۱۰ روز به صورت یک روز در میان، نانوذرات اکسید مس را با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی دریافت کردند (۱۱ و ۱۲).

با توجه به این که در مطالعات متعدد تفاوتی بین نتایج دو گروه کنترل و دارونما در اثر شوک حاصل از تزریق دیده نشد؛ در مطالعه حاضر گروه دارونما در نظر گرفته نشد و نتایج گروه‌های تیمار فقط با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت (۱۲ و ۱۳).

**شیوه نمونه‌گیری و سنجش هورمون‌ها:** به منظور تعیین اثرات تزریق نانوذرات اکسید مس بر میزان هورمون‌های گنادوتروپ و جنسی، خونگیری در دو مرحله انجام گردید. مرحله اول یک روز بعد از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس از گوشه چشم و مرحله دوم ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق نانوذرات، خونگیری مستقیماً از قلب (پس از بیهوشی با کتامین) از تمام موش‌ها به عمل آمد (۱۶). میزان هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون با استفاده از کیت‌های شرکت مونوبایند (Monobind) و به روش الایزا در تمام نمونه‌های خون (۱۰ نمونه از هر گروه) مورد سنجش قرار گرفت. پس از خونگیری مرحله دوم، برای تهیه مقاطع بافتی از بیضه، از هر گروه ۳ سر موش صحرایی تشریح شدند و پس از قرار گرفتن بیضه سمت راست در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت، از هر نمونه سه عدد

داده‌اند که در اثر اتصال و پیوند با غشاء سلول‌ها و نفوذ به داخل سلول و اندامک‌های مختلف آن بوده است که اثبات کننده عبور این نانوذرات از سد خونی- هوایی در ریه‌ها است (۷). چندین مطالعه نیز اثبات کرده‌اند که نانوذرات می‌توانند از سد خونی بیضه عبور کنند و به سلول‌های اسپرماتوژنیک و یا هسته آنها باند شده و از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد و یا پروکسیداسیون لیپیدی در غشاء اثرات نامطلوب ایجاد کنند (۸ و ۹). عنصر مس به‌طور طبیعی در عملکرد و تنظیم فعالیت سیستم تولید مثل و محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین ممکن است مس آزاد شده از نانوذرات اکسید مس ضمن نفوذ به بافت بیضه و لوله‌های اسپرم ساز بتواند در فعالیت میتوکندریایی سلول‌های لایدیگ اثر گذاشته و فعالیت ترشحی آنها را دچار اختلال کند (۱۰). در گزارشی تزریق نانوذرات مس به موش‌ها سبب افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های غیرنرمال گردید (۱۱). همچنین در مطالعات متعدد سمیت نسبی نانوذرات فلزی گوناگون از جمله اکسید مس در غلظت‌های مختلف بر اسپرماتوژنز اثبات گردید که شدت سمیت به نوع و اندازه نانوذرات، خلوص، مدت زمان تیمار و تعداد دفعات تزریق وابسته بود (۱۳-۱۱). با توجه به این که تغییر در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات و همچنین مقدار کاربرد آنها شدیداً بر خواص و سمیت آنها تأثیرگذار است (۱۴)؛ این مطالعه به منظور تعیین سمیت نانوذرات اکسید مس بر محور هیپوفیز-گناد و اسپرماتوژنز در موش صحرایی نر انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان - اصفهان طی سال ۱۳۹۶ انجام گردید. آزمایشات مورد تأیید شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان - اصفهان قرار گرفت و بر طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه درد (International association for study of pain) در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد (۱۵).

**نانوذرات:** نانوذرات اکسید مس از شرکت نوترینو در تهران (وارد کننده از اسپانیا) تهیه گردید. نانوذرات مذکور به قطر ۵۰ نانومتر و درجه خلوص ۹۹/۹ درصد بود. سایر خواص نانوذرات اکسید مس در جدول یک آمده است.

تغییر	شرح
درصد خلوص	۹۹/۹ Wt%
اندازه	۵۰ نانومتر
چگالی	۷/۴ g/cm <sup>3</sup>
چگالی سطحی	۰/۳ g/cm <sup>3</sup>
رنگ	سیاه
شکل	کروی
روش شیمیایی	روش شیمیایی

جدول ۲: مقایسه مقادیر میانگین و انحراف معیار هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH در گروه‌های تیمار و کنترل در مرحله اول خونگیری (یک روز بعد از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس) و مرحله دوم خونگیری (۱۵ روز بعد از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس) (n=10)

مرحله خونگیری	گروه‌ها	مقدار تستوسترون (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	مقدار FSH (نانوگرم بر دسی‌لیتر)	مقدار LH (نانوگرم بر دسی‌لیتر)
مرحله اول	کنترل	۲/۳۷±۰/۴۱	۳/۴۳±۰/۷۲	۳/۱۵±۰/۴۳
	تیمار اول	۱/۲۶±۰/۳۴ *	۲/۸۲±۰/۲۳ *	۵/۲۷±۱/۱۲ *
	تیمار دوم	۲/۳۹±۰/۴۴	۳/۱۱±۰/۴۵	۲/۹۷±۰/۷۰
	تیمار سوم	۲/۳۷±۰/۴۰	۴/۱۶±۰/۴۴ *	۳/۲۲±۰/۸۷
	P-value	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱
		F=۱۷/۹۵۶	F=۱۴/۴۸۸	F=۱۴/۳۱۵
مرحله دوم	کنترل	۲/۲۵±۰/۲۷	۳/۳۰±۰/۴۰	۳/۳۶±۰/۵۴
	تیمار اول	۳/۰۸±۰/۵۱ *	۲/۵۱±۰/۵۵ **	۴/۷۶±۰/۷۱ **
	تیمار دوم	۵/۷۶±۰/۹۴ *	۳/۲۸±۰/۷	۳/۹۷±۰/۵۳
	تیمار سوم	۳/۴۳±۰/۱۹ *	۳/۲۲±۰/۲۶	۴/۳۱±۰/۷۸ **
	P-value	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۱	P < ۰/۰۱
		F=۴۶/۷۱۷	F=۶/۶۱۴	F=۵/۰۲۹

گروه‌های تیمار اول، دوم و سوم به ترتیب دریافت کننده نانوذرات اکسید مس با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم \* تفاوت معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۰۱ \*\* تفاوت معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۱

جدول ۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار تعداد انواع سلول‌ها در لوله‌های اسپرم‌ساز پس از ۱۵ روز از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس (n=15)

گروه‌ها	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوسیت	تعداد اسپرماتید
کنترل	۴۰/۶۰±۱/۱۴	۵۶/۲۰±۵/۵۴	۲۰۲/۶۰±۱/۸۱
تیمار اول	۳۵/۶۰±۱/۰۴ *	۵۰/۴۰±۲/۰۷ *	۱۸۹/۵۲±۱/۰۸ *
تیمار دوم	۳۲/۵۶±۱/۱۳ *	۴۴/۸۰±۱/۴۸ *	۱۷۲/۲۰±۳/۱۱ *
تیمار سوم	۳۰/۰±۱/۸۷ *	۴۲/۶۰±۲/۰۷ *	۱۶۹/۲۳±۸/۲۶ *
P-value	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱	P < ۰/۰۰۱
	F=۵۵/۹۶۴	F=۵۶/۸۹۶	F=۵۴/۹۶۸

گروه‌های تیمار اول، دوم و سوم به ترتیب دریافت کننده نانوذرات اکسید مس با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم \* تفاوت معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۰۱

### یافته‌ها

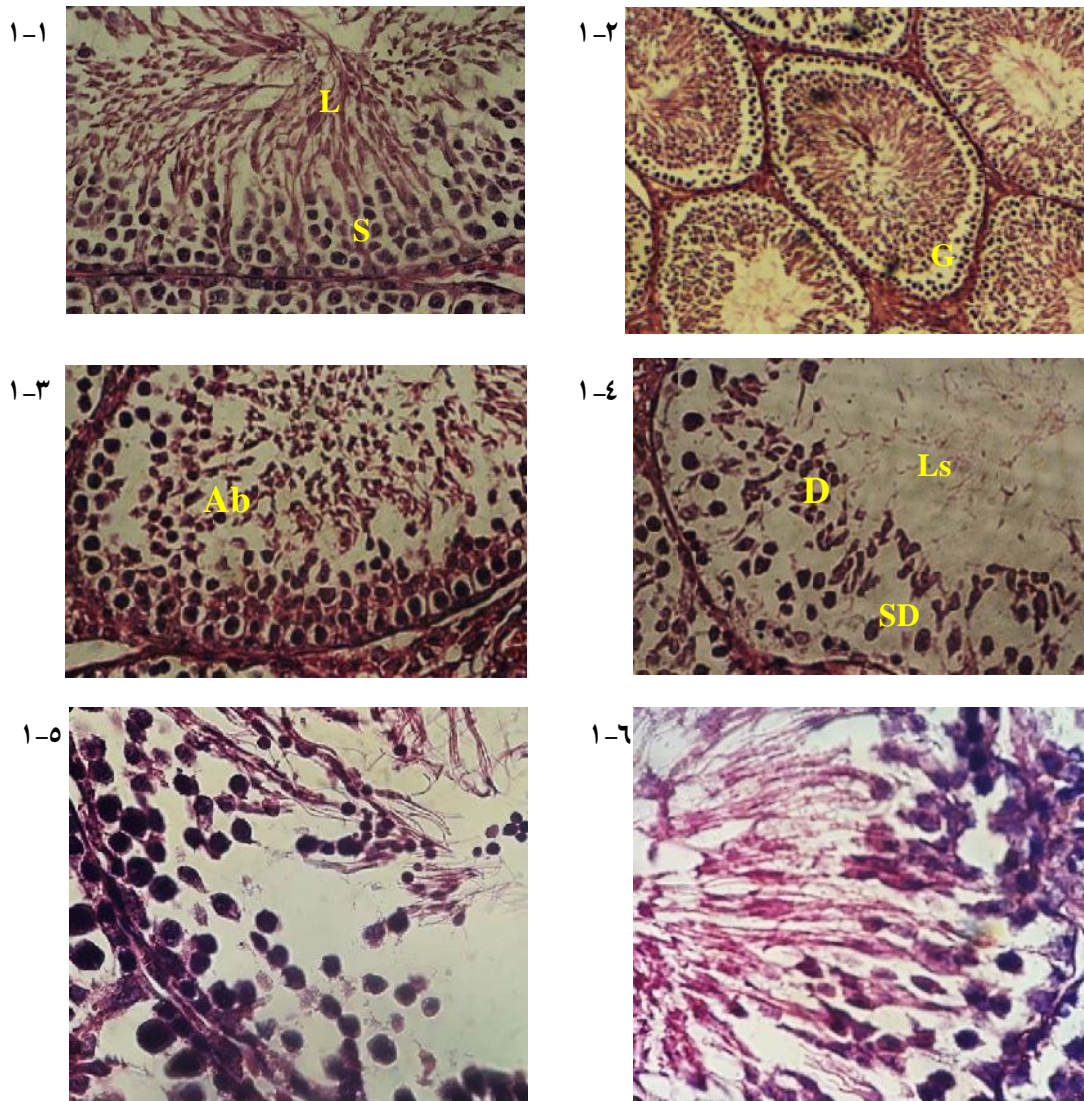
لام و در مجموع ۳۶ عدد لام تهیه گردید.

**تغییرات هورمونی:** در مرحله اول خونگیری مقدار تستوسترون فقط در گروه تیمار اول نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۰۱)؛ اما با گذشت زمان به مدت ۱۵ روز (در مرحله دوم خونگیری) مقدار تستوسترون در هر سه گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت (P < ۰/۰۰۱) و این افزایش وابسته به دوز نبود. به طوری که بیشترین افزایش در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس دیده شد (جدول ۲).

تغییرات هورمون LH در مرحله اول (P < ۰/۰۰۱) و دوم (P < ۰/۰۱) خونگیری معنی‌دار بود. در مرحله اول، میانگین مقدار LH فقط در گروه تیمار اول نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت. در مرحله دوم، پس از گذشت ۱۵ روز از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس، میزان LH در گروه‌های تیمار اول و سوم نسبت به دو گروه دیگر افزایش آماری معنی‌دار نشان داد

مقاطع به روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری Olympus CX22LED مجهز به دوربین Canon Eos 760D 18 (ساخت ژاپن) مورد مطالعه قرار گرفت. هنگام مطالعه لام‌ها، سعی گردید تا میدان‌های مشابهی از نظر مدور بودن مقاطع لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد تقریباً یکسان آنها در هر میدان از نظر وضعیت مورفولوژیک و شمارش سلولی (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) بررسی گردد. شمارش سلولی در ۱۵ مقطع عرضی لوله اسپرم‌ساز در لام‌های هر گروه انجام گردید (۱۷).

**آنالیز آماری:** میانگین مقادیر هورمون‌ها در گروه‌های تیمار و کنترل توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست دانکن با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-22 مورد مقایسه قرار گرفت و سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



شکل ۱: مقاطع بافت بیضه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین

۱-۱) گروه کنترل: تراکم و مورفولوژی طبیعی سلول‌های اسپرماتوژنیک، (S) سرتولی، (L) حفره مرکزی لوله اسپرم‌ساز با تراکم بالای اسپرم‌های بالغ (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): ۱-۲) گروه دریافت کننده غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس: (G) ایجاد شکاف بین غشاء پایه و سلول‌های اسپرماتوژنیک (بزرگ‌نمایی ۱۰۰x): ۱-۳) گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید مس با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم: (Ab) بی‌نظمی و ناهنجاری در اسپرماتوزنز و عدم بلوغ اسپرم‌ها (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): ۱-۴) گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید مس با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم: (Ls) عدم مشاهده یا کاهش شدید اسپرم بالغ در حفره مرکزی لوله اسپرم‌ساز، (D) کاهش شدید تراکم انواع سلول‌ها، (SD) دژنره شدن سلول‌های سرتولی (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): ۱-۵ و ۱-۶) ناهنجاری و کاهش شدید تراکم سلولی در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید مس با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰x)

(جدول ۲).

کاهش تراکم سلول‌های مختلف (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید)، ایجاد شکاف بین غشاء پایه و سلول‌های اسپرماتوژنیک، بی‌نظمی و پراکندگی سلول‌ها، فقدان اسپرم بالغ در حفره مرکزی لوله‌های اسپرم‌ساز و دژنره شدن سلول‌های سرتولی بود. شدت این ناهنجاری‌ها در گروه‌های تیمار دوم و سوم به‌طور قابل توجهی بیشتر بود (شکل یک). همچنین بررسی‌های کمی با شمارش انواع سلول‌ها در مقاطع مختلف نشان داد که ۵ مرتبه تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پس از گذشت ۱۵ روز از تیمار، کاهش آماری معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید را در

در رابطه با میزان هورمون FSH، در مرحله اول خونگیری (یک روز پس از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس) در گروه‌های تیمار اول و سوم به ترتیب کاهش و افزایش آماری معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. در حالی که در مرحله دوم خونگیری، کاهش آماری معنی‌دار مقدار FSH فقط در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.001$ ) یافت شد (جدول ۲).

اختلالات بافتی بیضه: بررسی‌های هیستوپاتولوژیک اختلالات متعددی را در روند اسپرماتوزنز پس از تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید مس به‌صورت وابسته به دوز نشان داد که شامل

تمام گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل به همراه دارد (جدول ۳).

## بحث

باتوجه به اهمیت کاربردهای بیولوژیک نانوذرات اکسید مس و همزمان ایجاد اثرات سمی بر اندام‌های مختلف بالغین و جنین‌های در حال تکوین، در مطالعه حاضر به دلیل حساسیت گامتوزن و اهمیت آن در جانوران و انسان (۱۸ و ۱۹)؛ سمیت این نانوذرات بر تغییرات هورمونی و اسپرماتوزن بررسی گردید. نتایج، تغییرات معنی‌دار سطح هورمون‌های مختلف را در هر دو زمان خونگیری (یک و ۱۵ روز پس از تیمار) نشان داد. ۵ بار تزریق غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس، در مرحله اول خونگیری سبب کاهش معنی‌دار مقدار تستوسترون و FSH و افزایش معنی‌دار LH گردید و غلظت‌های دیگر (۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به جز افزایش معنی‌دار FSH در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تغییر معنی‌داری در سطح هورمون‌ها ایجاد نکرد. در مرحله دوم خونگیری پس از گذشت ۱۵ روز از آخرین تزریق نانوذرات اکسید مس، کاهش و افزایش معنی‌دار به ترتیب در مقادیر FSH و LH در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ادامه یافت. در حالی که افزایش معنی‌دار مقدار تستوسترون در هر سه گروه تیمار مشاهده شد و غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز سبب افزایش معنی‌دار LH گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده تغییرات غیروابسته به دوز در اثر مواجهه با نانوذرات اکسید مس بود که در مورد هورمون‌های مختلف به‌طور یکسان رخ نداد. برخی محققین علت اثرات نامنظم نانوذرات بر تغییرات هورمونی یا آنزیمی را عدم وجود بافت یا اندام هدف مشخص در بدن جانوران و انسان برای این مواد ذکر کرده‌اند (۱۹). از آنجایی که نانوذرات اکسید مس شبیه نانوذرات دیگر قادر به نفوذ و تجمع در اکثر اندام‌ها و بافت‌ها هستند؛ می‌توانند اثرات مخرب بر بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیک ایجاد کنند که نتیجه آن به صورت نوسانات نامنظم هورمونی در محور هیپوفیز-گناد مشاهده می‌شود (۸ و ۱۱). از طرفی مکانیسم‌های تنظیمی هورمون‌های گنادوتروپ و هورمون‌های جنسی بسیار متعدد، حساس و پیچیده است. بنابراین تجمع نانوذرات اکسید مس ضمن عبور از سد خونی مغز و بیضه و آزاد شدن عنصر مس، با ایجاد فشارهای اکسیداتیو و در نتیجه اثرات مخرب بر غشاها و اندامک‌های سلولی، ممکن است سبب بی‌نظمی در ترشح این هورمون‌ها گردد (۲۰ و ۲۱). تغییرات معنی‌دار مقادیر هورمون‌ها در مطالعه حاضر، در مرحله دوم خونگیری نسبت به مرحله اول بیشتر بود که به‌ویژه در مورد مقدار هورمون تستوسترون و LH به‌صورت افزایش معنی‌دار مشاهده شد. در حالی که مقدار هورمون FSH تغییرات کمتری را در مرحله دوم خونگیری نسبت به مرحله اول نشان داد. به‌نظر می‌رسد با گذشت زمان ۱۵ روز از آخرین تزریق،

اثرات جانبی نانوذرات اکسید مس بر میزان هورمون‌ها بیشتر گردید. در حالی که در گزارش دودی و سترکی در سال ۲۰۱۵ سمیت نانوذرات اکسید مس طی ۱۴ روز پس از تزریق، کاهش یافت که به دلیل دفع تدریجی آنها از بدن بود (۱۶). هرچند که در گزارش دیگری با گذشت ۳، ۶ و ۹ روز از تزریق نانوذرات اکسید مس همچنان اختلالاتی در اسپرماتوزن مشاهده گردید (۱۱). برخی محققین نیز گزارش کردند که اندازه و ویژگی‌های سطحی نانوذرات اکسید مس می‌تواند بر نیمه عمر آنها در بدن جانداران موثر باشد (۱۰) که ممکن است دلیل تفاوت برخی نتایج تحقیق ما با مطالعات پیشین باشد. از طرفی مکانیسم‌های فیدبکی بین هورمون‌های مختلف محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (۲۲) احتمالاً سبب افزایش معنی‌دار همزمان مقادیر هورمون‌های تستوسترون و LH در مطالعه حاضر شد. برخی مطالعات نیز به نقش عنصر مس بر مسیرهای سیگنالی GnRH و تحریک فعالیت‌های آنزیمی نظیر ۱۷-بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز مرتبط با سنتز تستوسترون اشاره کرده‌اند (۲۳). بنابراین ممکن است تزریق نانوذرات اکسید مس ضمن افزایش مقدار این عنصر در بدن حیوانات، مکانیسم‌هایی را در راستای نوسانات هورمونی راه‌اندازی کرده باشد. به‌طور کلی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد دارای سیگنال‌ها و رستپورهای بسیار متعدد و پیچیده‌ای است که هرگونه اختلال در تنظیم عملکرد آن می‌تواند سبب افزایش یا کاهش ترشح هورمون‌های گنادوتروپ و هورمون‌های جنسی شود که نتیجه آن ایجاد اختلال در اسپرماتوزن است (۲۴). در تحقیق حاضر نیز اختلالاتی نظیر بی‌نظمی و پراکندگی سلول‌های اسپرماتوژنیک، دژنره شدن سلول‌های سرتولی، کاهش معنی‌دار تراکم و تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم‌های بالغ در لوله‌های اسپرم‌ساز به‌صورت وابسته به دوز مشاهده گردید. نتایج نسبتاً مشابهی در مطالعات پیشین به‌صورت کاهش معنی‌دار درصد تراکم، تحرک و بقای اسپرم‌ها در اثر مواجهه با نانوذرات اکسید مس به قطر ۳۰-۲۰ نانومتر و غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پس از ۹ روز گزارش شد (۱۰) که علت آن را تجمع نانوذرات در بیضه و افزایش استرس اکسیداتیو عنوان کردند (۱۱). به‌نظر می‌رسد تزریق دوزهای پایین‌تر این نانوذرات (۵۰ نانومتر) با گذشت زمان طولانی‌تر (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پس از ۱۵ روز) در مطالعه حاضر نیز همچنان اثرات سمی بر فعالیت لوله‌های اسپرم‌ساز را به‌همراه دارد. در گزارش‌های متعددی نیز اثرات رادیکال‌های آزاد بر پروکسیداسیون لیپیدی غشاء، افزایش آپوپتوز و اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید مس اثبات گردید (۲۵ و ۲۶) که ممکن است دلیل اصلی ناهنجاری‌های اسپرماتوژنیک در تحقیق حاضر باشد. هرچند که بی‌نظمی و افزایش معنی‌دار هورمون‌های تستوسترون و LH و از

بیشتر، ضمن برطرف شدن اثرات سمی نانوذرات، روند اسپرماتوزنز به حالت نرمال بازگردد. بنابراین لازم است در تحقیقات آینده اثر تزریق نانوذرات اکسید مس با ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی مشخص طی دوره‌های طولانی‌تر بر روی تغییرات هورمونی و اسپرماتوزنز بررسی گردد. همچنین برای اطمینان بیشتر از این اثرات سمی، ضروری است که قدرت باروری حیوانات تیمار شده با نانوذرات اکسید مس مورد مطالعه دقیق قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۲۴۶۱۲۶۲) آقای سجاد رجیبی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشگاه پیام نور تهران شرق بود. بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان نهایت سپاس خود را اعلام می‌دارند.

### References

- Rubilar O, Rai M, Tortella G, Diez MC, Seabra AB, Durán N. Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications. *Biotechnol Lett.* 2013 Sep; 35(9): 1365-75. doi: 10.1007/s10529-013-1239-x
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 3527-35. doi: 10.2147/IJN.S29020
- Sankar R, Maheswari R, Karthik S, Shivashangari KS, Ravikumar V. Anticancer activity of *Ficus religiosa* engineered copper oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Nov; 44: 234-39. doi: 10.1016/j.msec.2014.08.030
- Seyedalipour B, Barimani N, Dehpour Jooybari A, Hosseini S M, Oshrieh M. Histopathological Evaluation of Kidney and Heart Tissues after Exposure to Copper Oxide Nanoparticles in *Mus musculus*. *JBUMS.* 2015; 17(7): 44-50. doi: 10.22088/jbums.17.7.44
- Gomes T, Pereira CG, Cardoso C1, Pinheiro JP, Cancio I, Bebianno MJ. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 2012 Aug; 118-119: 72-79. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.03.017
- Jing X, Park JH, Peters TM, Thorne PS. Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with *in vivo* assessment. *Toxicol In Vitro.* 2015 Apr; 29(3): 502-11. doi: 10.1016/j.tiv.2014.12.023
- Ahamed M, Akhtar MJ, Alhadlaq HA, Alrokayan SA. Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. *Nanomedicine (Lond).* 2015; 10(15): 2365-77. doi: 10.2217/nmm.15.72
- Lan Z, Yang WX. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine (Lond).* 2012 Apr; 7(4): 579-96. doi: 10.2217/nmm.12.20
- Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B.* 2008 Oct; 112(43): 13608-19. doi: 10.1021/jp712087m
- Kalirawana TC, sharma P, Joshi SC. Reproductive Toxicity of Copper Nanoparticles in Male Albino Rats. *Int J Pharma Res Health Sci.* 2018; 6(1): 2258-63. doi: 10.21276/ijprhs.2018.01.29
- Al Bairuty GA, Taha MN. Effects of copper nanoparticles on reproductive organs of male albino rats. *International Journal for Sciences and Technology.* 2016; 11(3): 17-24. doi: 10.12816/0034940
- Thakur M, Gupta H, Singh D, Mohanty IR, Maheswari U, Vanage G, Joshi DS. Histopathological and ultra-structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *J Nanobiotechnology.* 2014; 12: 42. doi: 10.1186/s12951-014-0042-8
- Ostaszewska T, Chojnacki M, Kamaszewski M, Sawosz-Chwalibóg E. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Jan; 23(2): 1621-33. doi: 10.1007/s11356-015-5391-9
- Morgan AM, Abd El-Hamid MI, Noshay PA. Reproductive toxicity investigation of titanium dioxide nanoparticles in male albino rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2015; 4(10): 34-49.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983 Jun; 16(2): 109-10.
- Doudi M, Setorki M. Acute effect of nano-copper on liver tissue and function in rat. *Nanomedicine Journal.* 2014; 1(5): 331-38. doi: 10.7508/NMJ.2015.05.007
- Ema M, Okuda H, Gamo M, Honda K. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reprod Toxicol.* 2017 Jan; 67: 149-64. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.01.005
- Seyedalipour B, Barimani N, Hoseini SM. [Embryonic malformations following exposure to copper oxide nanoparticles in *Mus musculus*]. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2015; 17(5): 23-32. [Article in Persian]
- Seyedalipour B, Barimani N, Badoei-Dalfard A. [Evaluating of serum biochemical biomarker and liver histopathological changes in NMRI mice following exposure to copper oxide nanoparticle]. *Razi j Med Sci.* 2016; 23(5): 75-82. [Article in Persian]
- Chattopadhyay A, Sarkar M, Biswas NM. Testosterone supplemented protection on inhibition of testicular function induced by copper chloride. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences (DHR-IJBSL).* 2013; 4(1): 212-23.
- Roychoudhury S, Nath S, Massanyi P, Stawarz R, Kacaniova M, Kolesarova A. Copper-induced changes in reproductive

functions: in vivo and in vitro effects. *Physiol Res.* 2016; 65(1): 11-22.

22. Kochman K, Blitek A, Kaczmarek M, Gajewska A, Siawrys G, Counis R, et al. Different signaling in pig anterior pituitary cells by GnRH and its complexes with copper and nickel. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005 Aug; 26(4): 377-82.

23. Chattopadhyay A, Sarkar M, Biswas NM. Effect of copper chloride on adrenocortical activities in adult and immature male rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2002 Mar; 11(2): 79-84.

24. Lynn SE, Perfito N, Guardado D, Bentley GE. Food, stress, and circulating testosterone: Cue integration by the testes, not the

brain, in male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Gen Comp Endocrinol.* 2015 May; 215: 1-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.03.010

25. Alarifi S, Ali D, Verma A, Alakhtani S, Ali BA. Cytotoxicity and genotoxicity of copper oxide nanoparticles in human skin keratinocytes cells. *Int J Toxicol.* 2013 Jul; 32(4): 296-307. doi: 10.1177/1091581813487563

26. Xu J, Li Z, Xu P, Xiao L, Yang Z. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. *Arch Toxicol.* 2013 Jun; 87(6): 1067-73. doi: 10.1007/s00204-012-0925-0