

تأثیر 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،
سید علیرضا رضوی ششده Ph.D. Student^۴، حمید رضا شاهمرادی رضی M.Sc.^۲

۱- دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران

۲- دانشگاه 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 پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱

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 و مایع سمینال موش نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش نر بالغ به صورت تصادفی به سه گروه تجربی و یک 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 به صورت دهانی به مدت 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 دم‌پی‌دیدیم، اسپرم‌های به‌دست آمده مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: گروه سوم تجربی (دوز بالا) دارای کمترین میانگین تعداد اسپرم ($16/00 \pm 2/6$)، کمترین درصد اسپرم‌های با حرکت پیش رونده سریع ($18/16 \pm 5/45$)، بیشترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی ($35/83 \pm 4/40$) و بیشترین میزان غلظت MDA در سرم و مایع سمینال در مقایسه با سایر گروه‌ها بودند.

نتیجه‌گیری: 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 می‌گردند.

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

مقدمه

نانو تکنولوژی به فناوری موادی اطلاق می شود که ابعادی در حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر دارند (۱). نانوذرات دارای ویژگی های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند، به طوری که حتی این خصوصیات در موادی که از آنها مشتق می شوند، دیده نمی شود. اندازه کوچک و مساحت سطحی بالای نانوذرات، سبب افزایش فعالیت شیمیایی آنها گردیده و به آنها اجازه می دهد که به عنوان 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 بیماری ها گردیده است (۴). نانوذرات نقره یکی از محصولات با ارزش تکنولوژی نانو می باشند که امروزه کاربردهای گسترده ای در علوم مختلف، به ویژه بیولوژی و پزشکی پیدا نموده اند. به عنوان مثال در زمینه پزشکی، از نانوذرات نقره به عنوان پوششی برای ترمیم زخم ها، تهیه ابزارهای جراحی و پروتزهای استخوانی و دندانپزشکی استفاده می شود. همچنین به علت خاصیت ضد میکروبی، می توان از این پوشش در صنایع بسته بندی مواد غذایی استفاده کرد (۵). دلیل اصلی برای کاربردهای گسترده نانوذرات نقره خاصیت ضد میکروبی آن می باشد. نانوذرات نقره دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی و ضد تک یاخته ها هستند، به طوری که با افزودن مقدار اندکی از این نانوذرات در پوشش ها می توان سطوح ضد میکروبی ایجاد کرد و آلودگی ها را برطرف نمود (۵، ۶ و ۷). با افزایش کاربردهای نانوذرات نقره، احتمال در معرض قرار گرفتن انسان توسط این مواد نیز افزایش می یابد (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 هنگامی که از راه دهانی، تنفسی یا زیر پوستی مصرف شوند، به جریان خون وارد شده و در بعضی از اندام های بدن انباشته می شوند که موجب مسمومیت کبدی یا کلیوی و یا سلول های خونی می شود (۱۱-۱۵).

گونه های فعال اکسیژن (ROS)، واسطه های شیمیایی با نیمه عمر پائینی هستند که در مسیرهای متابولیکی همه سلول های هوازی از اکسیژن مشتق می شوند. رادیکال های آزاد به خاطر

داشتن الکترون جفت نشده بسیار واکنش پذیر بوده و قادرند برای جبران کمبود اکسیژن خود، ماکرومولکول های زیستی نظیر آمینواسیدها یا پروتئین ها، قندها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئوتیک را مورد حمله قرار داده و با آسیب شدید ساختار و عملکرد سلولی نهایتاً سبب مرگ زودرس سلولی می گردند (۱۶ و ۱۷). بدن انسان دارای یک سیستم دفاعی جهت مقابله با رادیکال های آزاد موسوم به سیستم آنتی اکسیدانت است. عدم تعادل بین میزان رادیکال آزاد تولید شده و ظرفیت آنتی اکسیدانتی باعث استرس اکسیداتیو می گردد (۱۷ و ۱۸). هم اکنون استرس اکسیداتیو القا شده با رادیکال های آزاد اکسیژن، به عنوان یکی از مهم ترین عوامل پاتولوژی در بسیاری از بیماری ها محسوب می شود (۱۸ و ۱۹). با توجه به اینکه سلول های اسپرم همانند هر سلول هوازی دیگری در طی مسیرهای متابولیکی قادر به تولید ROS می باشند، شدیداً مستعد آسیب های اکسیداتیو و نهایتاً از دست دادن عملکرد طبیعی خود هستند (۱۷). زمانی که غلظت این رادیکال های آزاد بیشتر از حد فیزیولوژیک خود گردد، منجر به اثرات اکسیداتیو جبران ناپذیری نظیر اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، آسیب پروتئین ها، آسیب DNA و مرگ زودرس یا آپوپتوزیس در سلول ها می شوند که نهایتاً با عدم عملکرد طبیعی سلول ها همراه خواهد بود (۱۶-۱۹).

پراکسیداسیون لیپیدها (LPO) یکی از مهم ترین اثرات پاتولوژیک رادیکال های آزاد محسوب می شود و به طور عمومی تحت عنوان فساد اکسیداتیو اسیدهای چرب دارای چند پیوند غیر اشباع، نامیده می شود (۲۰). محصولات پراکسیداتیو قادرند که خصوصیات فیزیکی غشاهای زیستی را تغییر دهند. بنابراین برداشت این محصولات پراکسیداتیو لیپیدها، برای عملکرد طبیعی غشاها ضروری بوده که توسط سیستم آنتی اکسیدانتی آنژیومی انجام می شود (۲۰ و ۲۱). از طرفی، اسپرم ها در مقایسه با دیگر سلول های بدن با اینکه سرشار از اسیدهای چرب در غشا خود هستند، ظرفیت آنتی اکسیدانتی موجود در سیتوپلاسم آنها اندک می باشد. بنابراین انتظار می رود که سلول های اسپرم بر خلاف دیگر سلول های بدن، حساسیت بالاتری نسبت به اثرات اکسیداتیو داشته و در معرض آسیب های اکسیداتیو بیشتری قرار داشته باشند (۲۱). از آنجایی که آنالیز مستقیم محصولات اولیه پراکسیداسیون لیپیدها کار بسیار مشکلی است، بنابراین بهتر است که محصولات ثانوی پراکسیداسیون لیپیدها جهت بررسی وضعیت اکسیداتیو مورد آنالیز قرار گیرند (۲۲). محصولات اولیه پراکسیداسیون لیپیدها، ترکیبات ناپایداری

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 سانتی گراد، رطوبت حدود ۵۵ تا ۶۰ درصد با دوره نوری ۱۲ ساعت 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 به مدت ۳۵ روز (بیش از یک دوره اسپرماتوزن) به‌طور روزانه مورد تجویز دهانی نانوذرات نقره از طریق گاوژ قرار گرفتند. گروه مورد مطالعه اول، دوم و سوم هر روز به ترتیب 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 به مدت 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 به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰g سانتریفوژ گردیدند. پس از آن مایع رویی برداشته شده و سریعاً در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده تا بعداً برای اندازه‌گیری 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

هستند که طی واکنش‌هایی چند مرحله‌ای به ترکیبات ثانوی دیگری نظیر آلدئیدها و کتون‌ها شکسته می‌شوند (۲۳ و ۲۴). مالون دی‌الدئید (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 با استرس اکسیداتیو که موجب آسیب رساندن به DNA در سلول‌های پستانداران می‌شود، افزایش می‌دهند (۱۰). اثرات کلونید نانوذرات نقره بر روی پارامترهای اسپرم قوچ در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد و نتایج حاصل از این آزمایش شاهدهی بر ادعای سمیت نانوذرات نقره روی سلول‌های اسپرم می‌باشد (۲۷). به‌نظر می‌رسد که نانوذرات نقره اثرات جدی و معنی‌داری بر روی فرآیند اسپرماتوزن و همچنین تعداد سلول‌های اسپرم ساز و واکنش آکروزومی 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 $10^{-4} \times 1/43$ 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

اضافه شد و به مدت 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 اسپکتروفوتومتر خوانده شد (۲۴ و ۲۹).

آنالیز آماری: برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار آماری SPSS Windows Version 16 استفاده گردید. میانگین تمام پارامترها به صورت Mean±SD و سطح معنی‌دار $p < 0.05$ 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 به کمک 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. به طوری که گروه مطالعه سوم، که بیشترین دوز مصرفی نانوذرات نقره را دریافت کرده بود، به طور معنی‌داری کمترین میانگین تعداد اسپرم در مقایسه با گروه کنترل و حتی در مقایسه با گروه‌های مورد مطالعه اول و گروه دوم بود (جدول ۱). 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 به طور 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 به طور معنی‌داری بیشتر بوده است. تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه ۲ مشاهده نگردید (جدول ۱). 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 به طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۲ گزارش گردید (جدول ۱). میانگین درصد حرکت غیرطبیعی به فرم درجا در گروه ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. در حالی که گروه کنترل به طور معنی‌داری کمترین میانگین درصد اسپرم‌های متحرک

غیرطبیعی اسپرم، در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $100\times$ 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 $200\times$ اسپرم مشاهده گردیده و گزارش شدند.

برای بررسی تحرک (motility) اسپرم‌ها، مقدار 10 میکرولیتر از هر نمونه را در مرکز Makler chamber قرار داده و پس از گذاشتن درپوش توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40\times$ مشاهده و شمارش گردیدند. در این بررسی، تعداد 200 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 به روش بررسی سلامت غشا سیتوپلاسمی اسپرم، با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $100\times$ انجام گردید (۳۱). اسپرم‌های زنده به دلیل سالم بودن غشا سیتوپلاسمی رنگ ائوزین وارد شده به داخل سلول را مجدداً خارج می‌کنند و بنابراین در زیر میکروسکوپ بدون رنگ قابل مشاهده هستند. در حالی که که اسپرم‌های مرده به دلیل غشا آسیب دیده رنگ وارد شده به داخل 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 اسپکتروفوتومتر مورد استفاده قرار گرفتند. به طور خلاصه 50 میکرولیتر از نمونه‌های مورد آزمایش با مقدار 150 میکرولیتر از محلول آب مقطر دو بار تقطیر شده مخلوط گردیده و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. با اضافه کردن 300 میکرو لیتر تری کلرواستیک اسید 20 درصد واکنش متوقف شده و به مدت 10 دقیقه در دور 3000 rpm سانتریفوژ گردیدند. سپس 200 میکرو لیتر از محلول رویی را برداشته شده و به آن 200 میکرو لیتر محلول تیوباربیئوریک اسید 67 درصد

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

مقایسه مورفولوژی اسپرمها بین گروههای مختلف نشان داد که درصد اسپرمهای غیرطبیعی در گروههای مورد مطالعه، به ویژه در گروههای دریافت کننده دوزهای بالاتر نانوذرات نقره بیشتر بوده و حداکثر تفاوت بین گروه ۳ و گروه کنترل مشاهده گردید (جدول ۱).

آنالیز میانگین درصد قابلیت حیات اسپرمها، تفاوت معنی داری 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 (جدول ۱).

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 (10 ⁶ × ml)	22/66±55/3	13/5±4/59	17/22±0/8/3	16±2/6	*./0.04	./897	*./0.08	./0.53
اسپرم های زنده (%)	62/16±5/0/3	61/66±3/77	59±7/29	51/4±8	*./0.29	./0.27	./661	./219
حرکت پیشرونده سریع (%)	35/83±4/49	49±8/14	37/6±4/33	18/16±5/45	*./0.00	*./0.05	*./0.00	*./0.00
حرکت پیشرونده آهسته (%)	33/5±2/34	22/33±5/64	15/6±2/51	22/33±5/68	*./0.00	*./0.19	1/0.00	*./0.19
متحرک به فرم درجا (%)	19/16±4/7	16/83±3/54	28/2±3/11	44±5/83	*./0.00	*./0.01	*./0.00	*./0.00
اسپرم های بی حرکت (%)	11/5±2/88	11/66±3/38	18/4±5/22	17±3/28	*./0.09	*./0.07	*./0.22	./541
اسپرم های با مورفولوژی طبیعی (%)	70/83±5/47	69/17±3/6	64/67±3/8	64/17±5/6	./192	./262	*./0.27	./973

گروه دریافت کننده دوز 50 میکرولیتر نانو ذرات نقره = a

گروه دریافت کننده دوز 100 میکرولیتر نانو ذرات نقره = b

گروه دریافت کننده دوز 200 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 معنی داری 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 به طور معنی داری افزایش یافته بود (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین غلظت MDA در گروه های 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	0/331	0/332	0/360	0/430	./0.69	./172	*./0.00	*./0.08
مایع سمین	0/277	0/278	0/323	0/346	*./0.26	*./0.00	*./0.00	./0.57

بحث

در این پژوهش، اثرات مضر نانوذرات نقره ۴۰ نانومتر با دوزهای مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) بر روی کیفیت اسپرم و استرس های 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 می کند. حیوانات گروه تجربی سوم که بیشترین دوز مصرفی نانوذرات نقره را دریافت کرده بودند، به طور معنی داری کمترین میانگین تعداد اسپرم، کمترین درصد اسپرم های با حرکت پیش رونده سریع، بیشترین درصد اسپرم های غیرطبیعی و بیشترین میزان غلظت *MDA* در سرم و مایع سمینال در مقایسه با گروه کنترل و حتی گروه های مورد مطالعه اول و گروه دوم بودند. به طور کلی می توان گفت که اثر نانوذره نقره بر کیفیت اسپرم قابل ملاحظه بود.

همانطور که در بخش مقدمه عنوان گردید نانوذرات فلزی دارای اثرات مخربی بر سیستم های بیولوژیکی و بافت های مختلف بدن می باشند. در یک مطالعه اثر نانوذرات نقره بر روی سلول های خونی موش مورد بررسی گرفته و نشان داده شد که نانوذرات نقره در دوزهای بالا (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) منجر به مهار فرآیند انعقاد توسط پلاکت ها در خون و در نتیجه افزایش زمان خون ریزی می گردند. علاوه بر این نتایج آن ها مشخص نمود که تعداد سلول های خونی از جمله تعداد سلول های سفید و قرمز، غلظت هموگلوبین، تعداد نوتروفیل و لنفوسیت به طور معنی داری در مقایسه با گروه های کنترل تغییر کرده است (۱۱). یافته های دیگر نیز نشان دهنده افزایش آپوپتوزیس و نکروز بافتی به دنبال مصرف نانوذرات نقره در بافت هایی همچون ریه و بیضه می باشند (۱۲).

مطالعات متعددی نیز اثر نانوذرات به ویژه نانوذرات نقره را بر پتانسیل باروری و عمل کرد اسپرم مورد بررسی قرار داده اند. در بررسی که اخیراً توسط گروه تحقیقاتی *Talebi* صورت پذیرفت، تاثیرات توکسیک نانوذرات روی بر فرآیند اسپرماتوزن و کاهش سلول های زایای لوله های اسپرم ساز موش مشاهده گردید (۲۶). همچنین گروه تحقیقاتی *Komatsu* ضمن بررسی اثر نانوذرات اکسید تیتانیوم (*TiO2*) بر توانایی باروری موش ها، نشان دادند که این نانوذرات با القا مسیر استرس اکسیداتیو سبب کاهش شدید سلول های لایدیگ، قابلیت حیاتی اسپرم و همچنین بیان برخی از ژن ها می شوند (۳۳).

در مطالعه حاضر علی رغم اینکه ناهنجاری های *DNA* اسپرم مورد آنالیز قرار نگرفت ولی به دلیل افزایش میزان *MDA* سرم و مایع سمینال می توان نتیجه گرفت که طبیعتاً بایستی اسپرم هایی با ناهنجاری های کروماتین نیز به دنبال تیمار با نانوذرات نقره افزایش یافته باشد. در راستای یافته های تحقیق حاضر، در مطالعه ای 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 اسپرم ساز در گروه های تیمار شده با نانوذرات نقره به میزان معنی داری بالاتر از گروه کنترل بوده است. لازم به ذکر است که در این پژوهش تغییری در تعداد اسپرم هایی با مورفولوژی غیرطبیعی بین گروه ها مشاهده نگردید (۳۴).

یکی از یافته های تحقیق حاضر مشاهده کاهش تعداد اسپرم به دنبال مصرف نانوذرات نقره در موش ها بود. در یک پژوهش، اثرات کلونید نانوذرات نقره بر پارامترهای اسپرماتوزن و کوچ در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردیده و نتایج حاصل از این آزمایش، سمیت نانوذرات نقره بر فرآیند اسپرم سازی و کاهش تعداد اسپرماتوزن مشاهده گردید (۲۷). همچنین *Miresmaeili* و همکاران (۲۸) نشان دادند که نانوذرات نقره اثرات جدی و معنی داری بر فرآیند اسپرماتوزن و تعداد سلول های اسپرم ساز و همچنین واکنش اکروزومی در سلول های اسپرمی موش صحرایی دارد.

همانطور که در تحقیق ما مشاهده گردید، وضعیت استرس اکسیداتیو در مایع سمینال و سرم نمونه های مورد بررسی، عامل مهمی در کاهش کیفیت اسپرم محسوب می گردد و با توجه به اینکه نانوذرات نقره با مکانیسم های متعددی سبب افزایش سطح رادیکال های آزاد می گردند، بنابراین انتظار می رود که درصد اسپرم هایی با *DNA* آسیب دیده و جهش یافته نیز در حیوانات مورد آزمایش افزایش یابد. لازم به ذکر است که این وضعیت می تواند 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 موش های دریافت کننده نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته و این کاهش وابسته به دوز مصرفی می باشد. به عبارتی با افزایش دوز نانوذرات نقره، کیفیت پارامترهای اسپرم، به ویژه درصد مورفولوژی طبیعی، تعداد اسپرم های زنده و درصد اسپرم های

منابع

- Masciangioli T, Zhang W. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ .Sci. Technol.* 2003; 37(5): 102.
- Erb U, Aust KT, Palumbo G. Nanostructured materials: processing, properties and potential applications. New York: Noyes Publications; 2002: 179-222.
- Goddard WA, Brenner DW, Lyshevski SE, Iafrate GJ. Handbook of nanoscience engineering, and technology. USA: CRC Press; 2002: 22-47.
- Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 2008; 176 (1): 1-12.
- Buzea C, Pacheco I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007; 2(4): 17-71.
- Gibbons B, Warner L. The role of antimicrobial silver nanotechnology. *Medical Device and Diagnostic Industry Magazine.* 2005; 27(5): 164-169.
- Panacek A, Kvittek L, prucek R, Kolar M. et al Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity. *J Phys Chem.* 2006; 110(33): 16248-16253.
- 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.
- 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.
- Ostiguy C, Soucy B, Lapointe G, Woods C, et al. Health Effects of Nanoparticles Second ed. Quebec: IRSST; 2008: 589-590.
- Hamrahi-michak M, Sadeghi SA, Haghghi 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.
- 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.
- 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.

متحرک کمتر می‌گردد. با توجه به اطلاعات موجود به نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر نانو ذرات نقره بر کیفیت اسپرم، تشدید استرس اکسیداتیو و به‌ویژه پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم‌ها باشد (۱۷، ۳۴). با توجه به نتایج تحقیق ما، نانو ذرات 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 اولاً 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 نانو ذرات 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 تأثیر نانو ذرات 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 می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

با تشکر از راهنمایی‌های بی‌شائبه 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.

14. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, et al. Twenty-eight day oral toxicity, genotoxicity, 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, Dobrzy ska 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.

Effects of Silver Nanoparticles on Sperm Parameters and Reactive Oxygen Species in the mouse Serum and Seminal fluid

Razi A, M.Sc.¹, Talebi AR, Ph.D.², Poorrajab F, Ph.D.³, Rezaie zarchi S, Ph.D.¹,
Razavi sheshdeh SAR, Ph.D. Student⁴, Shahmoradi Razi HR, M.Sc.³

1. University of Payame noor, Taft, Iran
2. Department of Anatomy, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
3. Department of Biochemistry, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
4. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

* Email of corresponding author: Prof_talebi @ hotmail.com

Received: 21 Jan. 2014

Accepted: 30 Sep. 2014

Abstract

Aim: Due to the role of silver nanoparticles on elevation of reactive oxygen species, and high sensitivity of spermatozoa to these agents, it is possible that silver nanoparticles reduce the fertility potential of spermatozoa. The aim of present study was to evaluate the effects of silver nanoparticles on sperm parameters and the concentration of reactive oxygen species in mouse serum and seminal fluid.

Material and Methods: In this experimental study, 24 adult male Syrian mice were divided into a control and three experimental groups. The experimental groups received silver nanoparticles orally at different doses (0.05, 0.1 and 0.2 ml orally) for 5 weeks. Then blood samples were taken from hearts to examine the Malondialdehyde (MDA) concentration by spectrophotometry. In addition, to analyze the sperm parameter cauda epididymis was dissected and swim-out spermatozoa were analyzed.

Results: The 3rd experimental group (highest dose) significantly showed the lowest mean of sperm count (16 ± 2.6), the lowest percentage of rapid progressive motile spermatozoa (18.16 ± 5.45), the highest rates of abnormal spermatozoa (35.83 ± 4.4) and the highest concentrations of MDA in serum and seminal plasma compared to the control and other experimental groups.

Conclusion: The silver nanoparticles as a factor which increase the effects of free radicals and reactive oxygen species in serum and seminal fluid caused reduction of sperm parameters.

Keywords: Silver nanoparticles, Sperm, Reactive Oxygen Species, Seminal fluid, Mouse