

تأثیر دوزهای مختلف نانو ذرات نقره بر پارامترها، ساختار کروماتین و DNA اسپرم موش

مهناز یاورى^۱، علیرضا طالبی^۲ Ph.D.*، سعید رضایی زارچی^۱ Ph.D.، سید علیرضا رضوی ششده^۳ M.Sc.

۱- دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران

۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباورى، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، یزد، ایران

۳- دانشجوی دکتری زیست شناسی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Prof_talebi@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲۷

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات مخرب دوزهای مختلف نانوذرات نقره بر پتانسیل باروری، ساختار کروماتین و DNA اسپرم اپیدیدیمی موش بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۴ موش نر سوری در چهار گروه ۶ تایی شامل یک گروه کنترل و سه گروه مطالعه جهت تجویز دهانی نانوذرات نقره با دوزهای مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو لیتر بر کیلوگرم در روز به مدت ۵ هفته در نظر گرفته شدند. سپس اسپرم های اپیدیدیمی برای آنالیز پارامترهای اسپرم به روش‌های معمول میکروسکوپی و بر اساس معیارهای WHO آسپیره شدند. تراکم کروماتین، شدت ناهنجاری و میزان پروتامین کروماتین اسپرم با سه روش سیتوشیمی مختلف به ترتیب شامل انیلین بلو، تولوئیدین بلو و کرومومایسین A3 ارزیابی گردیدند.

نتایج: نتایج نشان داد که سومین گروه (گروه دریافت کننده بالاترین دوز نانوذرات نقره) در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه های مورد بررسی دارای کمترین تعداد، کمترین درصد اسپرم‌های با حرکت سریع و کمترین درصد اسپرم های با مورفولوژی نرمال بودند. گروه های II و III، اختلاف معنی داری را با سایر گروه‌ها در میزان تراکم کروماتین و نقص پروتامین اسپرم نشان دادند.

نتیجه گیری: در این مطالعه، تاثیرات منفی نانو ذرات نقره بر پارامترها، ساختار کروماتین و DNA اسپرم موش، مشاهده گردید. تصور می‌شود که اثر منفی نانوذرات نقره بر کیفیت اسپرم قابل ملاحظه بوده و وابسته به دوز مصرفی می‌باشند.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، پارامترهای اسپرم، کروماتین، DNA، موش

مقدمه

گذاشته و قابلیت باروری اسپرم را به طور معنی داری کاهش دهند (۱۵ - ۲۰).

ناباروری مشکل عمده ای است که در ۱۵ درصد از زوجها مشاهده شده و مطالعات آماری نشان داده اند که حدود ۵۰ درصد از این موارد مربوط به فاکتور مردانه می باشد (۲۱). رویکرد جدید ارزیابی ناباروری مردان بررسی عمل کرد اسپرم و خصوصا ارزیابی کروماتین هسته اسپرم می باشد. از آنجائی که گامت های مرد حامل نیمی از ژنوم جنینی می باشند، هر گونه ناهنجاری در ساختار کروماتین اسپرم بر جنین تاثیر نامطلوب می گذارد. علاوه بر این، تراکم کروماتین اسپرم دارای نقش کلیدی در باروری مردان و نتایج اولیه باروری می باشد (۲۲).

با توجه به کاربرد گسترده نانوذرات نقره در شاخه های مختلف پزشکی، صنایع غذایی و لوازم آرایشی به نظر می رسد که بررسی اثرات منفی این مواد بر بافت های مختلف، به ویژه ارگان های تولیدمثلی و سلول های اسپرمی حائز اهمیت می باشد. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات مخرب دوزهای مختلف نانوذرات نقره بر پتانسیل باروری، ساختار کروماتین و DNA اسپرم اپی دیدیمی در حیوان آزمایشگاهی موش می باشد.

مواد و روش ها

نانو ذرات نقره به ابعاد ۴۰ نانومتر به صورت محلول با غلظت $10^{-4} \times 1/43$ مولار و وزن ۰/۷۹ میلی گرم بر لیتر ۱۰ سنتز شده از پژوهشکده علوم پایه نانوفناوری دانشگاه پیام نور استان یزد تهیه گردید.

به منظور انجام این مطالعه تجربی، ۲۴ سرموش نر بالغ از نژاد سوری به ۴ گروه ۶ تایی شامل 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 نگه داری از حیوانات آزمایشگاهی نگه داری شدند. موش های گروه مطالعه به مدت ۳۵ روز (بیش از یک دوره اسپرماتوزن) روزانه مورد تجویز دهانی نانوذرات نقره از طریق گاوژ قرار گرفتند. گروه مورد مطالعه اول، دوم و سوم هر روز به ترتیب دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر کیلوگرم نانوذرات نقره محلول و گروه کنترل تنها سرم فیزیولوژی به صورت دهانی دریافت می نمودند.

نانوذرات شامل ذرات جامد کلئیدی با اندازه هایی در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده که از دهها یا هزاران اتم تشکیل شده و به عنوان یکی از پرکاربردترین مواد در دانش فناوری نانو به شمار می روند (۱). رفتار آنها عمدتا ناشی از اندازه بسیار کوچک آنها بوده و خواص فیزیکوشیمیایی همچون حلالیت، نفوذپذیری، میزان عبور نور، هدایت الکتریکی و توان مغناطیسی کنترل نشده ای در مقایسه با مواد مشابه خود ولی در مقیاس میکرونی دارند (۲ و ۳). شناسایی مولکول های زیستی، انتقال هدفمند داروها، واکنش ها و ژن ها، درمان بیماری های نظیر سرطان، دیابت، ایدز، ترمیم آسیب های عصبی و نخایی، ترمیم زخم ها، افزایش عمر سلول های مغزی و تولید مواد ضد میکروبی تنها بخش کوچکی از کاربردهای این مواد می باشد (۴). خصوصیات مهم و ویژه نانوذرات نقره از قبیل تاثیر سریع، پایداری زیاد، قابلیت اضافه شدن به الیاف و پلیمرها و خاصیت ضد باکتری بالا باعث شده است که در اکثر صنایع از جمله صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم ها اثر گذاشته به طوری که این مواد تاکنون بیش از ۶۵۰ نوع باکتری شناخته شده را از بین برده اند (۵، ۶ و ۷). نانو ذرات نقره به دو صورت پودر (کامپوزیت) و مایع (کلئید) تولید می شود. در فناوری نانونقره، یون های نقره به صورت کلئیدی در محلولی به حالت سوسپانسیون قرار دارند که دارای خاصیت ضد باکتری، ضدقارچ و ضد ویروس می باشند (۸ و ۹).

علی رغم استفاده فراوان از نانوذرات و تلاش های زیادی که به منظور نشان دادن ویژگی های مطلوب نانو نقره در پزشکی صورت گرفته، هنوز اثرات بیولوژیکی این ذرات بر سلول ها و اندام ها به طور کامل مشخص نمی باشد. تحقیقات بر روی حیوانات نشان می دهند که پس از استنشاق، بلع یا تزریق نانو ذرات نقره، این مواد می توانند در پوست یا ریه رسوب کرده و سپس به جایگاه های ثانویه نظیر کبد، طحال، کلیه ها، ماهیچه ها، مغز، تخمدان ها و بیضه ها جابه جا شوند. بدیهی است که در این اعضا اثرات سمی مختلفی مشاهده گردیده است (۱۰-۱۴).

در پژوهش دیگری که در زمینه اثرات مخرب نانوذرات نقره بر سیستم تناسلی مذکر صورت پذیرفته نشان داده شده است که این نانو ذرات قادرند بر سلول های جنسی نر اثرات منفی

مطالعه قابلیت حیات (Viability) اسپرم به روش سیتوپلاسمی و با استفاده از رنگ آمیزی اتوزین و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 40$ انجام گردید (۲۶ و ۲۷). اسپرم‌های زنده به دلیل سالم بودن غشا سیتوپلاسمی رنگ اتوزین 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 لذا بعد از شستشو همچنان به صورت رنگی مشاهده می‌شوند.

ب) مطالعه ساختار کروماتین و DNA/اسپرم:

۱- رنگ آمیزی آنیلین بلو Aniline Blue جهت مطالعه میزان تراکم کروماتین اسپرم استفاده گردید (۲۳، ۲۸ و ۲۹). رنگ آنیلین بلو اسیدی، به طور خاص وجود هیستون‌های اضافی را در ساختار کروماتین اسپرم نشان می‌دهد. طی جابه‌جایی هیستون‌ها با پروتامین و تراکم کروماتین در مرحله اسپرمیوژن، اسپرم‌های طبیعی رنگ آنیلین بلو را به خود نگرفته، ولی اسپرم‌هایی که تراکم ناقص دارند یا بلوغ کافی را طی نکرده اند، این رنگ را به خود می‌گیرند.

۲- رنگ آمیزی تولوئیدین بلو Toluidine Blue جهت تخمین شدت ناهنجاری کروماتین اسپرم استفاده گردید (۲۳، ۲۸ و ۳۰). تولوئیدین بلو، یک رنگ متاکروماتیک بوده که برای تعیین کیفیت و کمیت تراکم کروماتین هسته و میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، از طریق پیوند با گروه‌های فسفات رشته‌های DNA آسیب دیده استفاده می‌شود. در این تست، هرچه میزان تراکم کروماتین کمتر باشد، رنگ پذیری DNA توسط تولوئیدین بلو افزایش می‌یابد. بنابراین طیفی از رنگ بین آبی روشن (اسپرم با کروماتین نرمال)، آبی تیره (اسپرم با کروماتین کمی ناهنجار)، بنفش (اسپرم با کروماتین ناهنجار) و بالاخره ارغوانی (اسپرم با کروماتین بسیار ناهنجار) قابل تشخیص می‌باشد.

۳- رنگ آمیزی کرومومایسین A3 برای بررسی بلوغ هسته اسپرم و نقص کروماتین اسپرم (CMA3) استفاده گردید (۲۳، ۲۸ و ۳۰). کرومومایسین یک فلوروکروم بوده که با مولکول پروتامین برای اتصال به شیار کوچک DNA دو رشته ای رقابت می‌کند. طی روند اسپرماتوژن قسمت عمده هیستون‌ها با

پس از این مدت، موش‌ها اندازه گیری وزنی شده و سپس توسط اتر بی‌هوش گردیدند. جهت بررسی پارامترهای اسپرمی، ناحیه شکم موش‌ها برش داده شد و دم اپی‌دیدیم که در قطب تحتانی هر بیضه قابل مشاهده می‌باشد، توسط قیچی استریل بریده شده و در محیط کشت serum-free medium for Chinese Hamster ovary cells یا HamsF10 قرار گرفت. سپس با فشردن و تکان دادن آرام، سلول‌های اسپرم به صورت 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 گردید. بعد از انکوباسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی اسپرم توسط سمپلر برداشته شده و مورد آنالیز قرار گرفتند (۲۳).

الف) پارامترهای اسپرم: مطالعه مورفولوژی اسپرم‌ها با استفاده از دستورالعمل استاندارد رنگ آمیزی پاپانیکولا انجام شد (۲۴). این نوع رنگ آمیزی یکی از روش‌های معمول برای بررسی مورفولوژی اسپرم می‌باشد که در آن نواحی آکروزوم و بخش سر و قطعه میانی اسپرم رنگ آمیزی می‌گردد، به طوری که ناحیه سر آبی و بخش قطعه میانی قرمز یا صورتی رنگ می‌شود. پس از رنگ آمیزی اسپرم، اشکال طبیعی و غیرطبیعی اسپرم، در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی $\times 100$ مورد بررسی قرار گرفتند. اشکال غیرطبیعی اسپرم شامل اسپرم‌هایی با دو سر بزرگ، سر کوچک، سر گرد، بدون آکروزوم، سر سنجاقی، دم بلند یا کوتاه، بدون دم و یا دم پیچ خورده و قطره سیتوپلاسمی می‌باشند.

مطالعه حرکت (motility) اسپرم‌ها بر اساس معیارهای World Health Organization (WHO) انجام گردید. برای بررسی تحرک اسپرم‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه را در مرکز Makler chamber قرار داده و پس از گذاشتن درپوش توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 40$ مشاهده و شمارش گردید. در این بررسی، تعداد ۲۰۰ سلول مورد شمارش قرار گرفته و از این تعداد درصد تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) مشخص شد (۲۵ و ۲۶). در این بررسی، اسپرم‌ها را به گروه‌های متحرک با حرکت پیش رونده سریع (نوع a)، متحرک با حرکت پیش رونده آهسته (نوع b)، اسپرم‌های متحرک به فرم درجا (نوع c) و بدون تحرک (نوع d) گروه‌بندی شدند.

نتایج

در بررسی وزن موش‌ها قبل و بعد از تیمار با نانوذرات نقره، تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌ها مشاهده نگردید. مقایسه میانگین تعداد اسپرم‌ها بین گروه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). به طوری که حیوانات گروه مطالعه سوم، که بیشترین دوز مصرفی نانوذرات نقره را دریافت کرده بودند، کمترین میانگین تعداد اسپرم در مقایسه با گروه کنترل و حتی در مقایسه با گروه‌های مورد مطالعه اول و گروه دوم را دارا بودند (جدول ۱).

پروتامین جابه‌جا شده تا کروماتین اسپرم متراکم شود. اسپرم‌هایی با نقصان پروتامین توسط CMA3 رنگ می‌گیرند و ضمن بررسی با میکروسکوپ فلورسنت به رنگ زرد درخشان دیده می‌شوند. این اسپرم‌ها در واقع اسپرم‌هایی با کروماتین نابالغ محسوب می‌گردند. بنابراین رنگ آمیزی کرومومایسین یک روش حساس و مفید برای بررسی وضعیت تراکم کروماتین و بررسی محتوای پروتامین به طور غیر مستقیم می‌باشد.

آنالیز آماری: برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار آماری SPSS 17 استفاده شد. میانگین تمام پارامترها به صورت $Mean \pm SD$ و سطح معنی‌دار $p < 0.05$ نشان داده شد. مقایسه میانگین غلظت کیفیت پارامترهای اسپرمی در بین تمام گروه‌ها با استفاده از تست ANOVA و بین دو گروه با آزمون Tukey مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم در گروه‌های 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 ($\times 10^6/ml$)	27 \pm 3.5	23.66 \pm 8	21.00 \pm 3.6	17.00 \pm 3.5	*0.004	0.897	*0.008	0.053
اسپرم‌های زنده (%)	64.6 \pm 3.7	61.1 \pm 4.8	51.8 \pm 7.5	52.4 \pm 8.32	*0.029	0.027	0.661	0.219
حرکت پیش‌رونده سریع (%)	35.83 \pm 4.49	49 \pm 8.14	37.6 \pm 4.33	18.16 \pm 5.45	*0.000	*0.005	*0.000	*0.000
حرکت پیش‌رونده آهسته (%)	33.5 \pm 2.34	22.33 \pm 5.64	15.6 \pm 2.51	22.33 \pm 5.68	*0.000	*0.019	1.000	*0.019
متحرک به فرم درجا (%)	19.16 \pm 4.7	16.83 \pm 3.54	28.2 \pm 3.11	44 \pm 5.83	*0.000	*0.001	*0.000	*0.000
اسپرم‌های بی حرکت (%)	11.5 \pm 2.88	11.66 \pm 3.38	18.4 \pm 5.22	17 \pm 3.28	*0.009	*0.007	*0.022	0.541
اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی (%)	70.83 \pm 5.47	69.17 \pm 3.6	64.67 \pm 3.8	64.17 \pm 5.6	0.192	0.262	*0.027	0.973

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

بیشتر بوده، ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه ۲ مشاهده نشد. مقایسه میانگین درصد حرکت پیش‌رونده آهسته اسپرم‌ها نیز، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد. میانگین درصد حرکت پیش‌رونده آهسته در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری بیشتر بوده است. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه ۳ و ۲ مشاهده

مقایسه میانگین درصد حرکت پیش‌رونده سریع اسپرم‌ها بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد. میانگین درصد اسپرم‌هایی با حرکت پیش‌رونده سریع در گروه مورد مطالعه ۳ به طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود. از طرفی درصد حرکت پیش‌رونده سریع در گروه مورد مطالعه ۱ در مقایسه با سایر گروه‌ها و حتی گروه کنترل به طور معنی‌داری

اسپریمها، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان داد. در این میان گروه مورد مطالعه دوم و سوم کمترین درصد اسپریم‌های زنده را در مقایسه با گروه کنترل داشتند. البته تفاوت معنی‌داری بین درصد اسپریم‌های زنده در گروه کنترل و گروه اول مشاهده نگردید (جدول ۱).

جدول ۲ و شکل‌های ۱ و ۲ نشان دهنده تغییرات ساختار کروماتین در گروه‌های مختلف می‌باشد. آنالیز داده‌های رنگ‌آمیزی آنیلین بلو نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده دوزهای متوسط و بالای نانوذرات نقره وجود داشته و بیشترین درصد اسپریم‌های نابالغ مربوط به گروهی که ۲۰۰ میکرولیتر نانوذره نقره را دریافت کرده بودند، می‌باشد. در رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، فقط گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر نانوذره نقره تفاوت معنی‌داری را با سایر گروه‌ها نشان دادند ($p < 0.001$) ولی در گروه ۵۰ میکرولیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه داده‌های مربوط به رنگ‌آمیزی کرومومایسین A3 نشان داد که در بین گروه‌های مختلف دریافت کننده دوز و همچنین بین این گروه‌ها و گروه کنترل کرده بودند، تفاوت به‌صورت معنی‌دار بود.

نشده. همچنین درصد اسپریم‌های با حرکت آهسته در گروه مورد مطالعه ۳ و ۱ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۲ بوده است. مقایسه میانگین درصد حرکت اسپریم‌ها به‌فرم غیرطبیعی درجا نیز، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد. میانگین درصد حرکت غیرطبیعی به‌فرم درجا در گروه ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است. درحالی که گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کمترین میانگین درصد اسپریم‌های متحرک به‌فرم درجا در مقایسه با گروه ۲ و گروه ۳ داشت. تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه ۱ مورد مطالعه مشاهده نشد. اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد اسپریم‌های بی‌حرکت بین گروه‌ها مشاهده شد. گروه مورد مطالعه ۲ و ۳ به‌طور معنی‌داری دارای بیشترین درصد اسپریم‌های بی‌حرکت در مقایسه با گروه‌های کنترل و گروه مورد مطالعه ۱ بودند. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه ۲ و ۳ دیده نشد (جدول ۱). مقایسه مورفولوژی اسپریم‌ها بین گروه‌های مختلف نشان داد که درصد اسپریم‌های غیرطبیعی در گروه‌های مورد مطالعه، به‌ویژه گروه‌های دریافت کننده دوزهای بالاتر نانوذرات نقره بیشتر بوده، هر چند که این اختلاف چندان معنی‌دار نبوده است (جدول ۱). مقایسه آنالیز میانگین درصد قابلیت حیات

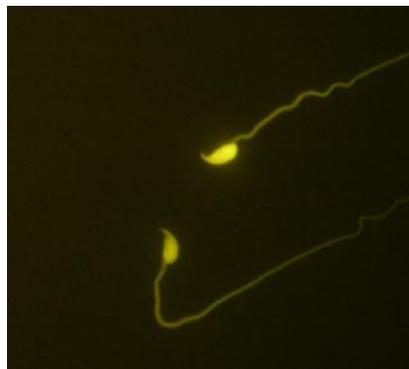
جدول ۲: مقایسه میانگین اسپریم‌هایی با کروماتین نابالغ در گروه‌های مختلف

رنگ آمیزی کروماتین	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
تولوئیدین بلو	10.7 ± 1.3	10 ± 1.1	15.9 ± 1.3	20 ± 3.5	0.264	0.278	0.000	0.055
آنیلین بلو	8.5 ± 1.1	9 ± 0.7	11.4 ± 1.2	14.5 ± 2.1	0.062	0.076	0.021	0.042
کرومومایسین A3	25 ± 6.4	28.2 ± 3.5	46.5 ± 2.1	68.5 ± 5.7	0.021	0.035	0.000	0.001

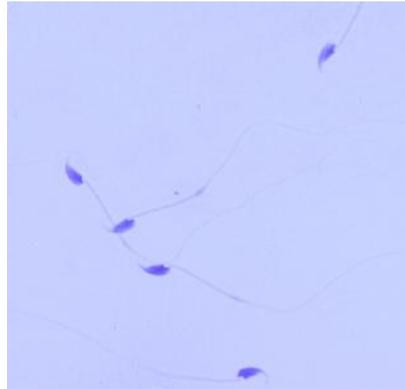
گروه دریافت کننده دوز ۵۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره = a

گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره = b

گروه دریافت کننده دوز ۲۰۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره = c



شکل ۱: رنگ‌آمیزی کرومومایسین A3 اسپریم. گروه تحت تیمار با نانو ذرات نقره دارای درصد بیشتری از اسپریم با رنگ زرد درخشان به‌همراه نقص پروتئین می‌باشند (بزرگنمایی $100 \times$).



شکل ۲: رنگ آمیزی آنیلین بلو اسپرم. گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره دارای درصد بالایی از اسپرم‌های بنفش رنگ با هیستون اضافی می‌باشند (بزرگنمایی $100\times$).

بحث

معنی داری بالاتر از گروه کنترل بوده است. لازم به ذکر است که در این پژوهش تغییری در تعداد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی بین گروه‌ها مشاهده نشد (۳۱).

همان‌طور که در بخش مقدمه عنوان گردید، نانوذرات فلزی دارای اثرات مخربی بر سیستم‌های بیولوژیکی و بافت‌های مختلف بدن می‌باشند. در پژوهشی که توسط رضایی زارچی و همکاران (۱۲)، بر روی ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ انجام گرفت نشان داده شد که نانوذرات نقره ۷۰ نانومتری در دوز بالا، اثرات پاتولوژیکی (خون‌ریزی، آپوپتوزیس و نکروزیس) بیشتری را در بافت ریه نسبت به مصرف دوزهای پایین ایجاد می‌نماید. در این مطالعه اثر نانوذرات نقره بر بافت ریه قابل ملاحظه بود و تغییرات حاصله نشانگر آسیب‌های سلولی و بافتی بودند. در مطالعه‌ای دیگر، رضایی زارچی و همکاران (۱۱)، اثر نانوذرات نقره بر سلول‌های خونی موش را بررسی نمودند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره در دوزهای بالا (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) منجر به مهار فرآیند لختگی توسط پلاکت‌ها در خون و در نتیجه افزایش زمان خون‌ریزی می‌شود. علاوه بر این نتایج آن‌ها نشان داد 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. مقصود احمد و همکاران (۳۲)، در مطالعه‌ای آسیب‌های DNA را در سلول‌های پستانداران بررسی نمودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که نانوذرات نقره پوشش دار آسیب‌شدیدتری را نسبت به نانوذرات بدون پوشش ایجاد نموده و ذرات پوشش‌پلی ساکاریدی به‌طور ویژه به‌میزان بیشتر توزیع شده بودند، در حالی‌که تراکم ذرات بدون پوشش محدود به سطوح در دسترس و غشای اندام‌ها می‌باشد.

اگرچه نانوذرات نقره به‌صورت گسترده در محصولات مصرفی به‌کار می‌رود، اطلاعات سم‌شناسی کافی در مورد آن‌ها در دسترس نمی‌باشد. یکی از مسیرهای ورود نانوذرات، دهانی یا خوراکی است که ممکن است در مورد بسیاری از محصولات مصرفی مثل خمیردندان‌ها، بطری‌های قابل بازیافت، پستانک بچه، لوازم آشپزخانه و اسباب بازی‌ها مهم باشد.

در بررسی متون مطالعه‌ای مبنی بر اثر این نانوذرات نقره بر ساختار کروماتین اسپرم مشاهده نگردید و لذا نتایج این مطالعه برای اولین بار گزارش می‌گردد. در این پژوهش، ما تلاش کردیم تا اثرات پاتولوژیک نانوذرات نقره ۴۰ نانومتری با دوزهای مختلف را بر پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، قابلیت حیاتی، حرکت و مورفولوژی اسپرم‌ها، همچنین بر روی پارامترهای ساختار کروماتین و DNA اسپرم موش سوری بررسی نماییم. سمیت نانو ذره نقره که به‌صورت خوراکی در دوزهای ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌لیتر (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) به موش‌ها داده شد، در مقایسه با گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه تاثیرات منفی نانو ذرات نقره بر پارامترها، ساختار کروماتین و DNA اسپرم موش را نشان داد. همچنین بررسی داده‌ها نشان داد که تغییرات ایجاد شده توسط این نانو ذرات در پارامترها و همچنین ساختار کروماتین اسپرم وابسته به دوز مصرفی می‌باشد. در راستای یافته‌های تحقیق حاضر، در مطالعه‌ای نسبتاً 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 گروه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره به‌میزان

تستوسترون، هورمون لوتینی (LH) و هورمون محرک فولیکولی (FSH) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه‌های مورد مطالعه به ویژه گروه‌های دریافت کننده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذرات نقره به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود. از طرفی غلظت هورمون تستوسترون و هورمون LH به‌ترتیب به‌طور معنی‌داری کم و زیاد شد، هر چند تغییر معنی‌داری در غلظت FSH مشاهده نشده بود. از طرفی کاهش معنی‌داری در تعداد، مورفولوژی طبیعی و درصد اسپرم‌های متحرک مشاهده گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما قابل مقایسه بودند. گروه تحقیقاتی Miresmaeili (۲۰) نیز در مطالعه‌ای که با هدف ارزیابی نقش نانو ذرات نقره بر واکنش آکروزومی و سلول‌های اسپرماتوگونی، بر روی موش‌های صحرایی که نانو ذرات نقره ۷۰ نانومتری به‌صورت خوراکی دریافت کرده بودند، انجام شد، نشان دادند که نانو ذرات نقره اثرات منفی بر واکنش آکروزومی اسپرم داشته و همچنین به‌طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوسیت‌های اولیه می‌شود ولی بر تعداد سلول‌های سرتولی تأثیر معنی‌داری ندارد. لازم به‌ذکر است که با توجه به اثرات بیولوژیکی مشابهی که توسط نانو ذرات نقره و نانو ذرات روی بر سلول‌ها و بافت‌هایی نظیر بیضه اعمال می‌شود می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مکانیسم عمل این دو نوع نانو ذره فلزی مشابه می‌باشد (۱۹، ۳۳ و ۳۴).

در بیان مکانیسم ایجاد ضایعات DNA و کروماتین اسپرم به‌دلیل مصرف نانو ذرات نقره می‌توان گفت که مطالعات نشان دهنده افزایش رادیکال‌های آزاد توسط نانو ذرات فلزی همچون نانو ذرات نقره می‌باشند (۳۴). با توجه به اینکه نانو ذرات نقره با مکانیسم‌های متعددی سبب افزایش سطح رادیکال‌های آزاد می‌گردند، بنابراین انتظار می‌رود که درصد اسپرم‌هایی با کروماتین و DNA آسیب دیده و جهش یافته نیز در حیوانات مورد آزمایش افزایش یابد. لازم به‌ذکر است که این وضعیت می‌تواند سبب بروز آسیب‌های متعددی در نسل‌های آینده شود (۱۶). گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (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 نوکلئوتیک را مورد حمله قرار داده و با آسیب شدید

مطالعات متعددی اثر نانو ذرات فلزی را بر توانایی باروری و عمل کرد اسپرم را مورد بررسی قرار داده اند. در تایید نتایج تحقیق حاضر، Talebi و همکاران (۳۳)، در یک مطالعه اثر نانو ذرات اکسید روی با سه غلظت ۵، ۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر اسپرماتوژنز موش را بررسی نمودند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد که نانو ذرات اکسید روی موجب آسیب رساندن به بافت بیضه شده و این آسیب‌ها وابسته به دوز مصرفی نانو ذرات می‌باشند. حضور واکنش‌هایی در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی که نشانگر آسیب مستقیم به این سلول‌ها بوده و همچنین تشکیل سلول‌های بسیار بزرگ چند هسته‌ای- که عمدتاً از سلول‌های اسپرماتوگونی که ارتباطشان را با سلول‌های سرتولی از دست داده‌اند از نتایج تحقیق مذکور می‌باشند. همچنین در طی بررسی پارامترهای اسپرم، شامل تعداد، تحرک و درصد اسپرم‌های با اشکال غیر طبیعی، در گروه‌هایی که نانو ذرات اکسید روی با دوز بالا را مصرف کرده بودند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود. میر شکرایی و همکاران (۱۸)، در یک آزمایش *in vitro* که بر روی اسپرم ۸ راس قوچ نژاد بختیاری انجام دادند، اثر کلئید نانو ذرات نقره را بر پارامترهای اسپرم قوچ مورد بررسی قرار دادند. بر طبق نتایج این آزمایش، کلئید نانو ذرات نقره بر خصوصیات اسپرم به‌خصوص پارامترهای تحرک اثرات منفی داشته که این امر می‌تواند شاهدهی بر این ادعا باشد که نانو ذرات نقره می‌تواند میزان باروری اسپرم متاثر سازد.

گروه تحقیقاتی Gromadzka-Ostrowska (۱۷)، اثرات حاد تجویز داخل وریدی یک دوز واحد از نانو ذرات نقره را بر روند اسپرماتوژنز و مورفولوژی لوله‌های منی‌ساز موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های اپی‌دیدیمی در موش‌های صحرایی تحت تیمار صورت گرفته و این اثرات وابسته به دوز و وابسته به زمان می‌باشند. همچنین تزریق نانو ذرات نقره سبب افزایش سطح آسیب به DNA در سلول‌های زاینده گردیده که با تست کامت قابل اندازه‌گیری می‌باشد. بررسی‌های بافت‌شناسی، تغییرات مورفولوژی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌های موش‌های صحرایی دریافت کننده ۲۰۰ نانومتری به‌مراتب بیشتر از تغییرات مورفولوژیکی در گروه مصرف کننده نانو ذرات نقره ۲۰ نانومتری گزارش گردید. در مطالعه ای دیگر که توسط Baki و همکاران (۱۹) صورت پذیرفت، اثرات نانو ذرات نقره بر تعداد سلول‌های اسپرم، تعداد سلول‌های لایدیگ و سطح هورمون‌های جنسی

2. Koch Karl C. Nanostructured materials: processing, properties and potential applications (second edition). New York: William Andrew publications. 2007: 278-280.
3. Goddard WA, Brenner D, Lyshevski SE, Iafate GJ. Handbook of nanoscience engineering, and technology (third edition). USA: CRC Press; 2002: 22-47.
4. Damge C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P, Devissaguet JP. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J. Control. Release.* 1990; 13: 233-239.
5. Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir IS. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Dig. J. Nanomat. Biostructures.* 2008; 3: 115 – 122.
6. Balogh L, Swanson DR, Tomalia DA, Hagnauer GL, et al. Dendrimers—silver complexes and nanocomposites as antimicrobial agents. *Nano Lett.* 2001; 1:18-21.
7. Hong KH, Park JL, Sul IH, Ho Youk JI, et al. Preparation of antimicrobial poly (vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *J. Polym. Sci.* 2006; 44: 2646-2474.
8. Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am. J. Infect. Control.* 1999; 27(4): 344-350.
9. Sun RW, Chen R, Chung NP, Ho CM, et al. Silver nanoparticles fabricated in HEPES buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells, *Chem. Commun.* 2005; 40: 5059-5061.
10. Ostiguy C, Lapointe G, Trottier M, , Ménard L, et al. Health Effects of Nanoparticles Second ed. Quebec: IRSST; 2006: 21-29.
11. Rezaei-Zarchi S, Taghavi-Foumani MH, Razavi Sheshdeh SAR, Negahdary M. The effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats. *Sci J Iran Blood Transfus Organ.* 2013; 10(2): 147-153.
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.
14. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, et al. Twenty-eight day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver

ساختار و عملکرد سلولی نهایتاً سبب مرگ زودرس سلولی می‌گردند (۳۵). در مطالعه حاضر نیز اگرچه میزان رادیکال‌های آزاد مورد اندازه‌گیری قرار نگرفت ولی با توجه به مطالعات قبلی ما و دیگر محققین می‌توان علت اصلی ناهنجاری‌های کروماتین و DNA اسپرم را استرس اکسیداتیو دانست.

نتیجه‌گیری

تحقیق ما نشان داد که موش‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره به‌طور چشم‌گیری دارای اسپرم‌هایی با کیفیت پائین‌تر در مقایسه با گروه کنترل بوده و این کاهش وابسته به دوز می‌باشد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که مسمومیت با نانوذرات نقره سبب تولید اسپرم‌هایی با کروماتین نابالغ گردیده که این امر به‌نوبه خود می‌تواند سبب کاهش پتانسیل باروری گردد.

لذا، اثر نانوذرات نقره بر روی پارامترهای اسپرمی و کاهش قدرت باروری می‌تواند به‌عنوان یکی از موضوعات اساسی در نظر گرفته شده و به‌عنوان یک زنگ خطر برای نسل‌های آینده محسوب گردد. اگرچه امروزه با پیشرفت تکنیک‌های مختلف، اغلب مردان نابارور می‌توانند صاحب فرزند شوند، اما احتمال اینکه اسپرم غیر طبیعی (مثلاً اسپرمی که در یک یا چند ژن خاص دچار جهش شده باشد) به‌صورت مصنوعی در بارورسازی تخمک شرکت نماید، وجود دارد. بنابراین بررسی و محدودیت استفاده از نانوذرات نقره در زمینه‌های مختلف از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به‌عنوان یکی از فاکتورهای اساسی موثر بر توانایی باروری مورد بررسی قرار گیرد. تحقیقات بیشتر، درک مکانیسم دقیق روند تأثیر نانوذرات بر بافت‌های مختلف را روشن خواهد ساخت.

تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاری‌های بی‌شائبه اساتید و همکاران پژوهشکده علوم پایه و فناوری نانو تکنولوژی دانشگاه پیام‌نور، مرکز درمانی و تحقیقاتی ناباروری و گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد که در مراحل مختلف این تحقیق همکاری داشتند.

منابع

1. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles—a review. *Tropic. Pharm. Res.* 2006; 5(1): 561-573.

- nanoparticles in Sprague–Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 2008; 20(6): 575–583.
15. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In Vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* 2005; 88(2): 412–9.
16. Braydich-Stolle LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, et al. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicological Sciences.* 2010; 116(2): 577–589.
17. 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.
18. 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.
19. Baki ME, Miresmaili SM, Pourentezari M, Amraii E, et al. Effects of silver nano-particles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. *Iran J Reprod Med.* 2014; 12(2): 139-144.
20. 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.
21. Huynh T, Mollard R, Trounson L. Selected genetic factors associated with male infertility. *Human Reprod Update.* 2002; 8(2): 183-198.
22. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Pourentezari M. Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. *Iran J Reprod Med.* 2013; 11(1): 53-60.
23. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol.* 2011; 45: 403-409.
24. Zare Z, Eimani H, Mohammadi M, Mofid M, et al. The effect of orally administered L-carnitine on testis tissue, sperm parameters and daily sperm production in adult mice. *Yakhte medical journal.* 2010; 11(4): 382-389.
25. World Health Organization (WHO) Laboratory manual for the examination of human and sperm-cervical mucus interaction. 4th Ed Cambridge university press; 1999.
26. 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; 70(6): 1148-55.
27. Cao XW, Lin K, Li CY, Yuan CW. A review of WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2011; 17(12): 1059-63.
28. Talebi AR, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *J Androl.* 2012; 44 (suppl.): 462-470.
29. Talebi AR, Khalili MA, Hossaini A. Assessment of nuclear DNA integrity of epididymal spermatozoa following experimental chronic spinal cord injury in the rat. *International journal of andrology.* 2007; 30: 163–169.
30. Mangoli E, Pourentezari M, Anvari M, Talebi AR, et al. The improvement of Sperm Parameters and Chromatin Quality by Vitamin C. *Researcher.* 2012; 4(11): 43-49.
31. 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): 251-258.
32. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2008; 233(3): 404-410.
33. Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis . *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30(9): 1203-9.
34. Razi A, Talebi AR, Poorrajab F, Rezaie zarchi S, et al. Effects of Silver Nanoparticles on Sperm Parameters, Serum and Seminal plasma Reactive Oxygen Species 2015; 5(4): 393-400.
35. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl.* 1995; 16(6): 464-468.

Effects of Different Doses of Silver Nanoparticles on Sperm Parameters, Chromatin Structure and DNA Integrity in Mice

Yavari M, M.Sc.¹, Talebi AR, Ph.D.^{*2}, Rezaie zarchi S, Ph.D.¹,
Razavi sheshdeh SAR, Ph.D. Student³

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

* Email corresponding author: Prof_talebi @ hotmail.com

Received: 19 Oct. 2014

Accepted: 7 Jul. 2015

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the negative effects of different doses of silver nanoparticles on fertility potential, chromatin structure and DNA integrity of epididymal sperm in mice.

Material and Methods: Twenty four male mice were divided into 4 groups (n=6) including one control and three experimental groups for orally administration of silver nanoparticles with three different doses (50, 100 and 200 µl/kg/day) for 5 weeks. Then, cauda epididymal spermatozoa were aspirated for analysis of sperm parameters using general microscopy methods and according to WHO criteria. Chromatin condensation, intensity of sperm chromatin abnormalities and protamine deficiency were assessed by three different cytochemical tests including aniline blue (AB), toluidine blue (TB) and chromomycin A3 (CMA3) tests respectively.

Results: Results showed that third group (treated with the highest silver nanoparticles dose), had the lowest sperm number, the lowest of sperm fast motility percentage and the lowest sperm percentage having normal morphology significantly in comparison with control and others groups. The II and III groups significantly showed differences in sperm chromatin condensation and deficiency comparing to other groups.

Conclusion: In this study the negative effect of silver nanoparticles on mice sperm parameters, sperm chromatin structure and DNA integrity were observed. It is believed that the negative effects of silver nanoparticles on sperm quality are significant and depend on used doses.

Keywords: Silver nanoparticles, Sperm parameters, Chromatin, DNA, Mice