View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۵، شماره ۴/ مهر و آبان ۱۳۹۲/ ۳۴-۲۶

مقاله پژوهشی

ارزیابی سمیت سلولی و تغییر بیان پروتئینی ایجاد شده توسط نانوذرات نقره در اسپرم و بیضه موش صحرایی

دکتر سعید حبیبیان[1*]، دکتر فرنوش شادنوش[1]، دکتر مهران عربی[2]، دکتر بهناز صفار[3]

[1]گروه فارماکولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [2]گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [3]گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۹ اصلاح نهایی: ۹۱/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۹

چکیده:

زمینه و هدف: **اگرچه امروزه به طور گسترده از نانو ذرات نقره در صنعت و پزشکی استفاده می گردد، اما هنوز اطلاعات اندکی درباره سمیت نقره خصوصاً بر سیستم تولید مثلی نر وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سمی و تغییراتی که به واسطه نانو ذرات نقره در پروتئین های داخل سلولی، در دستگاه تولید مثلی نر ایجاد می گردد، انجام شد.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ٤ گروه مساوی تقسیم شدند. در گروه های تجربی ۲،۱ و ۳ نانو نقره به صورت خوراکی به مدت ٤۵ روز متوالی به ترتیب با غلظت ppm ۱، ۱۰ و ۲۰ داده شد. موش های صحرایی گروه ٤ (گروه شاهد) نیز اتیلن گلیکول با غلظت ppm۲۰ را به مدت ٤۵ روز از راه دهان (گاواژ) دریافت کردند. نتایج بدست آمده از مطالعات روش سنجش میزان انتشار DNA (DNA Diffusion Assay) با آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند؛ نتایج حاصله از انجام الکتروفورز نیز با استفاده از نرم افزار Image J مقایسه شدند.**

یافته ها: **نتایج بررسی رخداد آپوپتوز به روش DNA diffusion assay در گروه های تجربی نشان دهنده افزایش معنی دار در تعداد اسپرم هایی داشت که آپوپتوز در آن ها رخ داده بود (P<۰/۰۵). همچنین نتایج بررسی تغییر بیان پروتئین ها در سلول های بیضه، افزایش بیان پروتئین های داخل سلولی را با افزایش غلظت نانوذرات در مقایسه با گروه شاهد نشان داد.**

نتیجه گیری: **بر اساس نتایج این مطالعه نانو ذرات نقره می توانند موجب القای آپوپتوز در اسپرم و تغییر بیان پروتئین های سلولی در بیضه های موش های صحرایی شوند.**

واژه های کلیدی: آپوپتوز، اسپرم، الکتروفورز، موش صحرایی، نانو نقره.

مقدمه:

پیشرفت سریع نانو تکنولوژی و تنوع کاربردهای آن موجب شده است که مواد با ابعاد نانو بطور وسیعی مورد استفاده قرار گیرند. نانو ذرات نقره در بین نانو ذرات مختلف بیشترین مصرف را دارند، بطوریکه ۳۰ درصد محصولات حاوی نانو مواد دارای نانو ذرات نقره هستند (۱). امروزه نانو ذرات نقره به دلیل خصوصیات بیولوژیکی خاص در جنبه های مختلف زندگی کاربردهای متفاوتی دارند (۲). به عنوان مثال در پزشکی بـــرای تـــرمیم سوختگی و زخم ها، بانداژهای آغشته به نانو ذرات نقره بسیار خوب عمل می کنند. استفاده در ابزار و ادوات دندان پزشکی و مواد مخصوص پرکردن دندان و پروتزهای دندانی، کاربرد در وسایل جراحی و پروتزهای استخوانی، مواد و ابزار جلوگیری کننده از آبستنی، مواد ضد عفونی کننده و شوینده و درمان بیماری های عفونی مقاوم به آنتی بیوتیک ها از موارد دیگر استفاده از این ذرات در پزشکی می باشند (۳،۲). در صنعت نیز نانو ذرات نقره

***نویسنده مسئول:** شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه فارماکولوژی، تلفن: ۰۳۸۱-٤٤٢٤٤٢٧،
E-mail: habibian_dehkordi@yahoo.com

کاربردهای زیادی دارند. از جمله در پارچه بافی برای بافت پارچه ها و دیگر منسوجات مقاوم به بو، در کارخانه های ساخت وسایل خانگی از جمله ماشین های لباسشویی و ظرفشویی، در ساخت وسایل و ابزار الکترونیکی مانند کامپیوتر، گوشی های تلفن ثابت و همراه، تلویزیون، ساخت جواهرات و آلات زینتی و آرایشی، ساخت رنگ ها، دستگاه های تهویه کننده هوا و دستگاه های تصفیه کننده آب استفاده می شوند. در صنایع غذایی نیز برای بسته بندی مواد غذایی، جهت حفاظت از مواد غذایی و برای افزایش ماندگاری و ذخیره مواد غذایی کاربرد دارند (۴،۲،۱).

نانو ذرات نقره معمولاً کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر و شامل ۱۵۰۰۰-۲۰ اتم نقره هستند (۵). اندازه در حد نانومتر به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم خصوصیات فیزیکی (اندازه، شکل، بار الکترواستاتیک) و شیمیایی (پوشش سطحی، نوع عنصر یا ترکیبی خاص و میزان حلال بودن) ویژه و منحصر به فردی به ماده می دهد که در ابعاد بزرگتر آن ماده فاقد آن خصوصیات فیزیکو شیمیایی است (۶). پس نقره در ابعاد نانو دسترسی بیشتری به بافت ها، سلول ها و مولکول های بیولوژیک در بدن موجودات زنده دارد (۵) و استفاده وسیع آن احتمالاً می‌تواند سلامت انسان و حتی سایر جانورانی را که در معرض قرار می‌گیرند، مورد مخاطره قرار داده و آسیب‌هایی از قبیل تحلیل بافت و بروز اختلال در عملکرد بافت های مختلف را موجب شود. بنابراین بررسی اثرات سمی این نانو ذرات و مطالعه این اثرات در مدل حیوانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و تعمیم نتایج این گونه پژوهش‌ها به انسان می‌تواند، هشدار دهنده باشد و استفاده منطقی از نانو ذرات در تمامی حوزه‌ها را مطرح نماید. دستگاه تناسلی یکی از محل های اثر این ذرات در بدن بوده و این ذرات قادر به عبور و ورود به اسپرم از طریق یکسری تولیدات از جمله ابزارها و مواد پیشگیری کننده از آبستنی و ضد عفونی کننده ها بوده (۳) و ممکن است اثرات سمی بر روی سلول های اسپرم داشته و باعث القای تغییرات سلولی در بافت بیضه و اسپرم اپیدیدیمی گردد (۵). همانگونه که قبلاً توضیح داده شد، نانو ذرات نقره استفاده های بسیار زیادی دارند و این استفاده وسیع ممکن است، موجب ورود نانو ذرات نقره از راه دهان به بدن شوند، لذا در تحقیق حاضر تأثیر نانو ذرات نقره وارد شده از راه دهان بر توانایی ادامه حیات، مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis) و بیان پروتئین در اسپرم بررسی می گردد.

روش بررسی:

این تحقیق تجربی بر روی ۲۴ سر موش صحرایی بالغ با نام علمی *Ratus norvegicous* allivius نژاد ویستار و جنس نر، با میانگین ۲۰ ± ۲۰۰ گرم انجام گردید. به منظور تطبیق با شرایط محیط جدید، حیوانات به مدت ۲ هفته در دما، نور و حرارت مناسب لانه نگهداری و سپس تحت تیمار قرار گرفتند. تغذیه موش‌های صحرایی با استفاده از مواد غذایی آماده استاندارد شامل ۲۰ درصد پروتئین، ۵۰ درصد نشاسته، ۱۰ درصد سلولز، ۱۵ درصد چربی و ویتامین‌ها بود. حیوانات برای انجام مطالعه در طول دوره آزمایش به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

حیوانات به طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی شامل: گروه های ۱، ۲ و ۳ تجربی که محلول نانو نقره را به ترتیب با غلظت ppm ۱، ۱۰ و ۲۰ به مدت ۴۵ روز از راه دهان (گاواژ) دریافت کردند و گروه ۴ که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند و تنها اتیلن گلیکول با غلظت ppm ۲۰ را به مدت ۴۵ روز از راه دهان (گاواژ) دریافت نمودند.

نانو ذرات نقره مورد استفاده در این تحقیق (خریداری شده از شرکت Plasmachem آلمان) دارای میانگین اندازه ۳۰ نانومتر، غلظت ppm ۸۰۰۰ و حلال اتیلن گلیکول بودند. در پایان دوره موش‌ها ابتدا با استفاده از کلروفوم در دسیکاتور بی‌هوش و سپس کشته شدند. بیضه‌ها به همراه اپیدیدیم مربوطه خارج و به محلول سرم فیزیولوژی برای بررسی تغییرات سلولی منتقل شدند.

از روش DNA Diffusion Assay برای بررسی آپوپتوز استفاده شد. این روش یک روش آسان و قابل

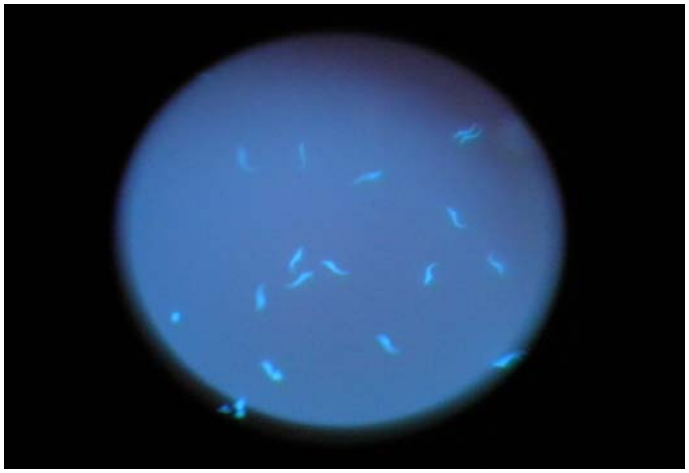
اعتماد برای ارزیابی بروز آپوپتوز در سلول‌های پستانداران است. این آزمایش به روش انجام شده توسط Apte و همکاران به انجام رسید (۷). در این روش، تعداد سلول‌های با DNA آسیب دیده، مورد شمارش قرار می‌گیرند. اصول کار به این صورت است که چنانچه در اطراف هسته‌های سلول‌های رنگ‌آمیزی شده هاله ای مشاهده گردد، به معنی آسیب به DNAی سلول و تولید سلول‌های آپوپتیک است.

برای بررسی تغییرات بیان پروتئین ها ابتدا بافت های مورد مطالعه وزن و سپس در پلیتی قرار داده شدند. چهار برابر وزن هر بافت به آن ها محلول بافر فسفات (PBS) حاوی یک قرص ممانعت کننده از فعالیت آنزیم پروتئاز (Protease inhibitor) اضافه شد. با کمک دو تیغ بیستوری بافت ها به قطعات کوچکی (کمتر از ۰/۵ میلی متر مکعب) تقسیم شدند. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر اقدام به هموژنیز کردن نمونه ها شد. در مرحله بعد غشای سلولی سلول ها با استفاده از دستگاه سونیکیتور (Sonicator) تخریب شد تا پروتئین های داخل سلولی آزاد شوند. طول موج مورد استفاده ۱۴-۱۰ هرتز برای مدت ۵ ثانیه بود. لازم به توضیح است که تمام مراحل ذکر شده بر روی یخ انجام گرفت. محلول سونیکیت شده سریعاً در دور ۱۰۰۰۰ برای مدت ۲۰ ثانیه سانتریفوژ شد. محلول رویی برای ارزیابی غلظت پروتئین موجود در آن جدا گردید. ارزیابی غلظت پروتئین ها به روش استاندارد فولین (Standard folin method) انجام شد (۸). الکتروفورز پروتئین ها نیز به روش SDS-PAGE معرفی شده توسط Laemmli انجام گرفت (۹). بطور خلاصه از هر نمونه مقدار ۲۰ میکرولیتر (حاوی ۵۰ میکروگرم پروتئین) در هر یک از چاهک های ژل آگاروز قرار داده شد. در یکی از چاهک ها نیز مقدار ۲ میکرولیتر از مارکر پروتئین قرار داد و اقدام به تفکیک پروتئین ها شد. در نهایت با استفاده از برنامه نرم افزاری (Image J) ضخامت باندهای پروتئینی هر نمونه مشخص و با هم مقایسه شدند.

با استفاده از نرم‌افزار آماری SIGMA STAT و توسط آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey، نتایج بدست آمده از مطالعات DNA Diffusion Assay مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند، از نظر آماری اختلاف نتایج بین گروه های تحت بررسی در سطح $P<۰/۰۵$ معنی دار قلمداد گردید. نتایج حاصله از انجام الکتروفورز نیز به صورت توصیفی گزارش شدند.

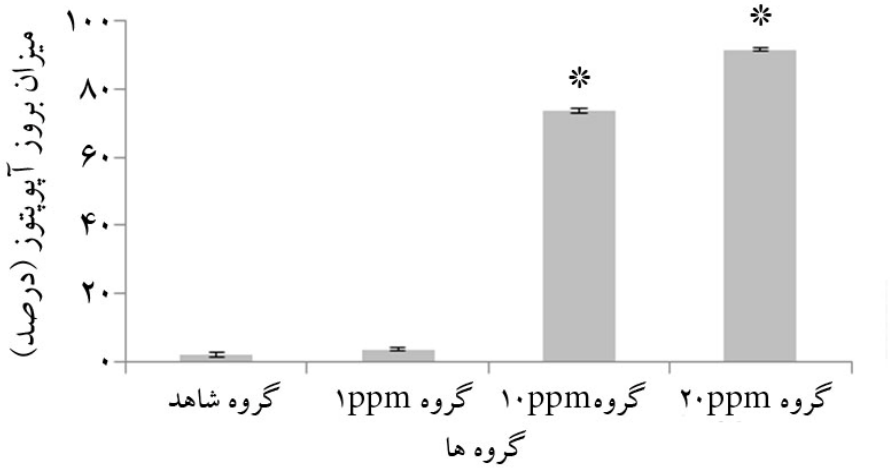
یافته ها:

بررسی رخداد آپوپتوز در اسپرم های موش های صحرایی در گروه شاهد نشان دهنده هاله در اطراف هسته تعداد کمی از اسپرم ها (۰/۶۵ ± ۲/۳) بود که این نشان دهنده وجود حالت طبیعی و نرمال در اسپرم‌های گروه شاهد بوده است (تصویر شماره ۱).

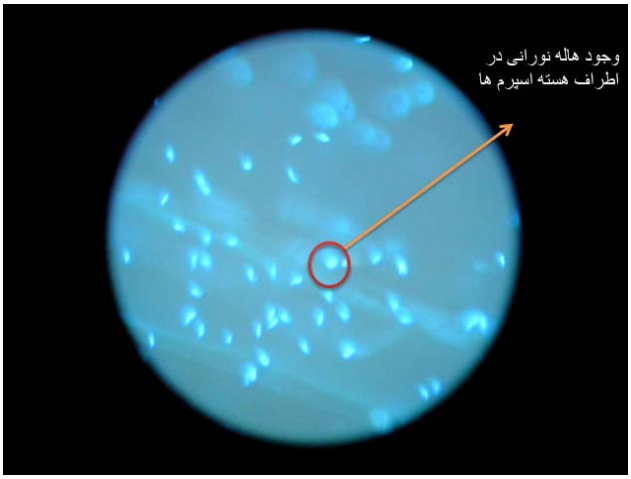


تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی اسپرم موش های صحرایی نر با استفاده از روش DNA Diffusion Assay در گروه شاهد.
هیچگونه هاله نورانی در اطراف هسته ها مشاهده نمی شود که نشان دهنده حالت طبیعی در هسته اسپرم هاست.

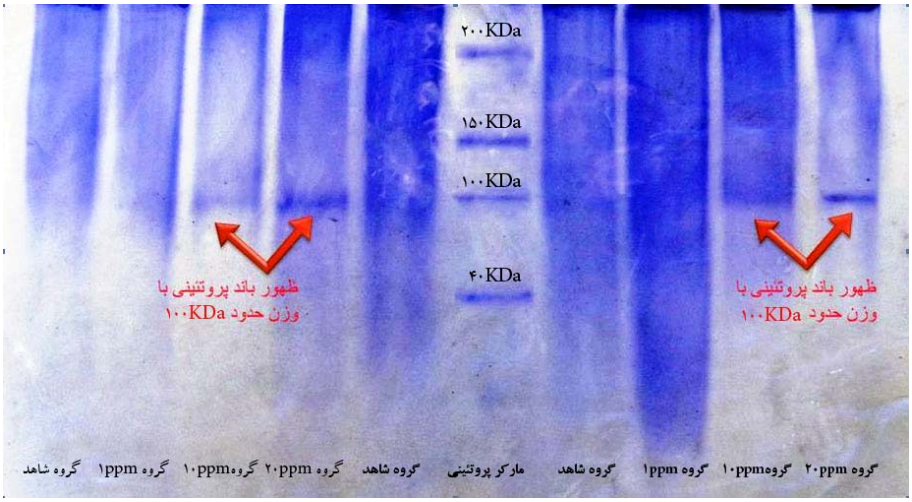
نتایج مطالعات آپوپتوز، ناشی از تاثیر نانو ذرات نقره بر سلول های اسپرم در گروه تجربی دریافت کننده نانو ذرات نقره با دوز ppm ۱ نشان دهنده افزایش درصد هاله ها از ۰/۶۵ ± ۲/۳ به ۰/۴۲ ± ۳/۷ بود. در غلظت های ppm ۱۰ و ppm ۲۰ میزان افزایش هاله ها در اطراف هسته ها نسبت به گروه شاهد به ترتیب ۰/۶۷ ± ۷۳/۵۵ و ۰/۴۵ ± ۹۱/۲۶ درصد بود که از لحاظ آماری معنی‌دار می باشد (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۱). مطالعات میکروسکوپی اسپرم هایی با هاله نورانی در اطراف هسته آن ها در گروه های تجربی نشان دادند که نشانگر آسیب وارد شده به DNA می باشد و این هاله در گروه تجربی ۳ بیشتر از دو گروه دیگر تجربی مشاهده شد (تصویر شماره ۲).



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان بروز آپوپتوز در گروه های مختلف بر حسب درصد
**تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ با گروه شاهد و گروه تجربی اول*



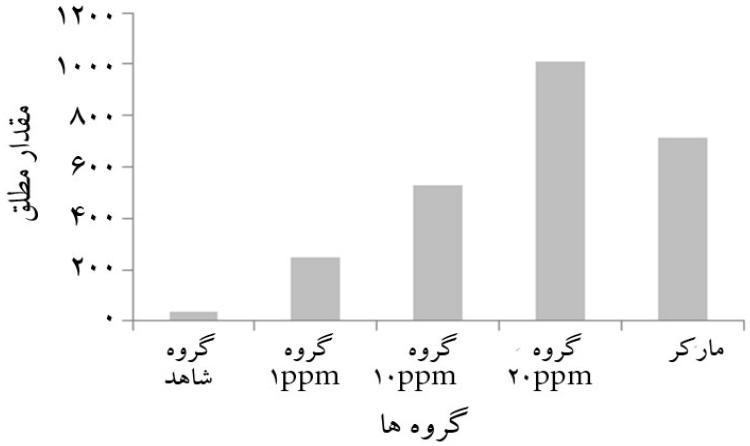
تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپی اسپرم موش های صحرایی نر پس از تجویز دهانی نانو ذرات نقره در گروه های تجربی
وجود هاله نورانی در اطراف هسته اسپرم ها در گروه های تجربی دریافت کننده نانو ذرات نقره با دوز ۲۰ppm که نشان دهنده رخداد آپوپتوز در این اسپرم هاست.



تصویر شماره ۳: مقایسه تغییرات بیان پروتئین های داخل سلول های بیضه در گروه های تجربی دریافت کننده نـانو ذرات نقره با گروه شاهد.

ظهور باند پروتئینی با وزن ۱۰۰ کیلو دالتون نشان دهنده بیان این نوع پروتئین ها بوده است.

نتایج ارزیابی تغییرات بیان پروتئین در سلول های بافت بیضه هایی که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شده بود، حاکی از عدم تغییر در روند بیان پروتئین های داخل سلولی بوده است، ولی مقایسه ژل های مربوط به گروه های تجربی با گروه شاهد نشان داد که تغییراتی در اندازه ی باندهای پروتئینی در محدوده حدود ۱۰۰ کیلو دالتون به وجود آمده است که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره باند های پروتئینی ظاهر شده در ژل به صورت پر رنگ تر و واضح تر مشاهده شد که این موضوع نشان دهنده افزایش بیان این نوع از پروتئین های داخل سلولی با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بوده است (تصویر شماره ۲) و بیشترین بیان پروتئین در گروه تجربی ۳ مشاهده گردید (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مقایسه میزان بیان باند پروتئینی در محدوده ۱۰۰ کیلو دالتون در گروه های مختلف بر حسب مقدار مطلق

بحث:

در تحقیق حاضر اثرات تجویز خوراکی نانو ذرات نقره با غلظت های متفاوت ppm ۱، ppm ۱۰ و ppm۲۰ بر مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) سلول های اسپرم و تغییرات در بیان پروتئین های داخل سلولی در بافت بیضه بررسی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در گروه شاهد اتیلن گلیکول در غلظت ppm ۲۰ هیچ تأثیری بر اسپرم موش های صحرایی ندارد. در موافقت با نتایج بدست آمده، Wang و همکاران نشان دادند که حداقل غلظت اتیلن گلیکول که بتواند بر روی اسپرم موش های صحرایی اثر سمی داشته باشد ۶۰۰mg/kg است. در همین مطالعه نشان داده شد که اتیلن گلیکول در غلظت های mg/kg ۱۰۰ و ۳۰۰ هیچ تاتیری بر روی اسپرم ندارد (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده آن است که خوراندن نانو ذرات نقره موجب القا آسیب DNA و پیشبرد روند آپوپتوز در اسپرم های موش صحرایی می شود. افزایش در تعداد اسپرم های آپوپتاتیک که واجد هاله ی در اطراف هسته خود هستند، به صورت معنی‌دار بوده و با افزایش غلظت نانو ذرات نقـــره بیشتر می شود. وجود هاله در اطراف اسپرم ها معرف انتشار DNA از محل اصلی خود به اطراف بوده است که پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ فلورسنت قابل رویت بودند. از آنجایی که نانو ذرات مورد استفاده قادر به عبور از غشاء سلولی بوده و در کمترین زمان ممکن، امکان انتقال به سیتوپلاسم و سپس هسته را دارند، لذا ایجاد آسیب در DNA به عنوان امری محتمل در نظر گرفته می شود. پژوهش های متعددی در زمینه اثرات نانو ذرات بر ساختار DNA وجود دارد که نشان دهنده ی اثرات منفی و مضر این ذرات بر ساختار ژنوم و همچنین بیان ژنی در سلول ها و بافت های مختلف موجودات زنده می باشد (۱۱). مطالعات سلولی نشان داده‌اند که بعضی از نانومواد ممکن است با DNA سلولی واکنش داده و منجر به التهاب و آسیب اکسیداتیو و اختلال در عملکرد سلول شوند (۱۲).

از طرفی گـــزارش شده است که نقره و نمک های نقره در تمام بدن توزیع و باعث تغییر نفوذپذیری غشاء سلول به پتاسیم و سپس سدیم شده و فعالیت پمپ سدیم–پتاسیم ATPase و میتوکندری را مختل می کنند (۱۳). همچنین در تحقیقی که بر روی مغز تعدادی موش که نانو ذرات نقره را دریافت کرده بودند، نشان داد که این نانو ذرات باعث القای استرس اکسیداتیو و دفاع آنتی اکسیدانی در قسمت هایی از مغز می گردند که این امر باعث تغییر در بیان ژن ها، القای آپوپتوز ونوروتوکسیتی (Neurotoxicity) در این سلول ها می گردد (۱۴).

در مطالعه حاضر تغییر در روند بیان پروتئین های داخل سلول های بیضه به صورت افزایش بیان یک نوع از پروتئین های داخل سلولی بیضه با وزن مولکولی در حدود ۱۰۰ کیلو دالتون بوده است. لازم به توضیح است که با افزایش دوز نانو ذرات نقره دریافتی، شدت بیان پروتئین داخل سلولی مشاهده شده بیشتر گردید. افزایش بیان پروتئین‌های سلولی و افزایش رخداد آپوپتوز می تواند نشان دهنده یک عامل توکسیک در بدن باشد که باعث تحریک تولید یک سری پروتئین های داخل سلولی و تخریب در DNA هسته سلول ها و شروع مرگ برنامه ریزی شده در سلول ها شده است. نانو ذرات از جمله نانو ذرات نقره می توانند با بافت های مختلف باند شده و با تولید رادیکال های آزاد اکسیژنی اثرات سمی مخربی را باعث شوند که در نهایت منجر به مرگ سلولی می شود (۱۵).

از آنجا که نانو ذرات دارای نسبت سطح به حجم بزرگتری نسبت به اندازه های معمول نقره هستند، بنابراین از نظر شیمیایی فعال تر بوده و به میزان بیشتری به فرم یونیزه آن تبدیل می شوند (۱۴). علاوه بر این تحقیقات نشان می دهد که نقره در ابعاد نانو خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی غیر معمول را از خود نشان می دهد. نانو ذرات نقره می تواند باعث تولید انواع اکسیژن فعال شود که منجر به مسمومیت ناشی از استرس

اکسیداتیو می شود. تولید انواع اکسیژن فعال مکانیسم اصلی سمیت با نانو ذرات نقره است. مطالعات متعددی نشان داده است که سلول های مواجه شده با نانو ذرات نقره، فعالیت میتوکندری کمتری داشته، سلول چروکیده و شکل نامنظمی پیدا می کنند (۱۶).

با توجه به مطالعات قبلی و نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر این امر بسیار محتمل است که بدن موش صحرایی در مقابل شرایط سخت مجبور به تولید عوامل مهار کننده یا خنثی کننده رادیکال های آزاد گردد که این فعالیت به صورت افزایش میزان و اندازه ی برخی از باندهای پروتئینی در ژل های SDS-PAGE بدست آمده از هموژنیت بیضه خود را نشان می دهد. البته این نکته را نیز نباید از نظر دور داشت که این احتمال هم وجود دارد که افزایش میزان و اندازه ی باند پروتئینی مشاهده شده ممکن است ناشی از پروتئین های از نوع التهابی و محصول ژن های استرس اکسیداتیو سلول باشند. در سال ۲۰۰۹ Miura و Shinohara اثرات نانو ذرات نقره بر سلول های Hela را بررسی و گزارش کردند که نانو ذرات نقره دارای اثرات سیتوتوکسیک هستند و با افزایش بیان ژن های mt-2A و ho-1 موجب القای آپوپتوز در سلول های Hela می شوند (۱۷).

همان گونه که قبلاً ذکر شد در تحقیق حاضر، افزایش بیان پروتئین های سلولی و افزایش رخداد آپوپتوز دیده شد. در موافقت با این نتایج نشان داده شده است که نانو ذرات نقره اثرات سمی شدیدی بر روی دستگاه تولید مثل نر دارند. این گونه پیشنهاد شده است که این ذرات می توانند از سد خونی-بیضوی عبور کرده در بیضه جایگزین و برای سلول های اسپرم اثرات مخربی داشته باشند (۳). نانو ذرات نقره برای سلول های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی نیز سمی هستند. در مطالعه ای که توسط Braydich-Stolle و همکاران انجام شـــد، بر سمیت قابل توجه نانو ذرات بر روی سلول های بنیادی جنسی پستانداران در شرایط آزمایشگاهی و پتانسیل این ذرات در ایجاد تداخل کلی با سیستم تناسلی مرد تأکید شده است (۱۸).

نتیجه گیری:

از یافته های مطالعه حاضر می توان نتیجه گیری کرد که نانو ذرات نقره می توانند باعث بروز تغییراتی در بیان یک سری پروتئین های داخل سلولی در بافت بیضه و همچنین افزایش رخداد آپوپتوز در اسپرم های موش صحرایی گردند که شدت تغییرات ایجاد شده بستگی به غلظت یا دوز نانو ذرات تجویزی داشته و با افزایش غلظت بیشتر می شود.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش در قالب پایان نامه و با حمایت مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد اجرا شده است که بدینوسیله محققین مراتب تشکر و سپاس خود را اعلام می دارند.

منابع:

1. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW. Nano-silver: A review of available data and knowledge gaps in human and enviromental risk assessment. Nanotoxicol. 2009; 3(2): 109-38.

2. Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, et al. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. Biomaterials. 2006; 27(32): 5512-7.

3. McAuliffe ME, Perry MJ. Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review. Nanotoxicol. 2007; 1(3): 204-10.

4. Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, XU XGN. In vitro imaging of transport and biocompatibility of single Silver nanoparticles in early development of Zebra fish embryos. ACS Nano. 2007; 1: 133-43.

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

6. Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta. 2005; 51(5): 956-60.

7. Apte AA, Manarikar RS, Ghole VS. Application of DNA diffusion assay in earthworm coelomocytes. Environ Toxicol. 2008; 23(2): 278-83.

8. Lowery OH, Rosebrough NJ. Farr AL. Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1): 265-75.

9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-5.

10. Wang RS, Ohtani K, Suda M, Nakajima T. Inhibitory effect of ethylene glycol monoethyl ether on rat sperm motion. Ind Health. 2006; 44(4): 665-8.

11. Xia G, Chen B, Ding J, Gao C, Lu H, Shao Z, et al. Effect of magnetic Fe3O4 nanoparticles with 2-methoxyestradiol on the cell-cycle progression and apoptosis of myelodysplastic syndrome cells. Int J Nanomedicine. 2011; 6: 1921-7.

12. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the Nanolevel. Science. 2006; 311(5761): 622-7.

13. Armitage SA, White MA, Wilson HK. The determination of silver in whole blood and its application to biological monitoring of occupationally exposed groups. Ann Occup Hyg. 1996; 40(3): 331-8.

14. Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25nanoparticles. Toxicol Lett. 2009; 187(1): 15-21.

15. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. Nano Lett. 2006; 6(8): 1794-807

16. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol in Vitro. 2005; 19(7): 975-83.

17. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apaptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 390(3): 733-7.

18. Bradich- 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.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2013 Oct, Nov; 15(4): 26-34. ***Original article***

Evaluation of the cytotoxicity and protein expression alteration induced by nanoparticles of silver in the rat sperm and testis

Habibian S (PhD)[1]*, Shadnoush F (PhD)[1], Arabi M (PhD)[2], Safar B (PhD)[3]
[1]Pharmacology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Biology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; [3]Genetic Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 20/Oct/2012 Revised: 19/Jan/2013 Accepted: 7/Feb/2013

Background and aims: Despite increasing application of silver nanoparticles in industry and medicine, there is still little information about their potential toxicity, particularly to male genital system. Therefore, the present study was carried out to investigate the cytotoxicity and protein expression alteration induced by nanoparticles of silver in the male rat genital system.
Methods: In this experimental study, 24 male wistar rats were randomly divided in 4 equal groups. In experimental group one, two, and three, nanosilver was given orally for 45 consecutive days at the doses of 1, 10 and 20 ppm respectively. Rats in group four (control group) received 20 ppm ethylene glycol orally for 45 consecutive days. Results from DNA diffusion assay studies were analyzed statistically using ANOVA, and Tukey test. Also results of the electrophoresis were compared using Image J software.
Results: DNA diffusion assay results about apoptosis showed a significant increase in the experimental group in the number of sperms that occurred apoptosis ($P<0.05$). Furthermore, the assessment results of an alteration in protein expression of testis cells showed an increase in expression of intracellular proteins with nanoparticles concentration increasing compared to control group.
Conclusion: Based on the present study, it can be concluded that nanoparticles of silver can increase the incidence of apoptosis in rat sperm and cause alteration in protein expression in rat testis.

Keywords: **Apoptosis, Electrophoresis, Nanosilver, Rat, Sperm.**

Cite this article as: Habibian S, Shadnoush F, Arabi M, Safar B. Evaluation of the cytotoxicity and protein expression alteration induced by nanoparticles of silver in the rat sperm and testis. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Oct, Nov; 15(4): 26-34.

[*]**Corresponding author**
Pharmacology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 0098384424427, E-mail: habibian_dehkordi@yahoo.com