

بررسی اثرات نانو ذرات نقره بر بافت‌شناسی بیضه و هورمون‌های محور هیپوفیز - بیضه در موش‌های کوچک آزمایشگاهی

محمد سعید حیدر نژاد^{۱*}، گلی قاسمی^۲، جهانگیر کبوتری کتج^۳

گروه جانورشناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: نانو ذرات نقره قادرند از غشاهای بیولوژیکی عبور نمایند. لذا، این پژوهش جهت تأثیر نانو ذرات نقره بر بافت‌شناسی بیضه و هورمون‌های محور هیپوفیز - بیضه در موش‌های کوچک آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش نر بالغ سالم نژاد Balb/c با میانگین وزنی $28/5 \pm 3$ گرم به‌طور تصادفی در سه گروه ۱۲ تایی قرار گرفتند. گروه شاهد گروه تیمار ۱ که نانو ذرات نقره با غلظت ۲۰ قسمت در میلیون و گروه تیمار ۲ که نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون دریافت کردند. در روزهای ۲۱، ۴۰ و ۶۰، چهار سر از موش‌های هر گروه را با ماده بی‌هوشی (۱۰ میلی‌لیتر کتامین، ۰/۵ میلی‌لیتر آسپیرومازین، ۲ میلی‌لیتر دیازپام و کمتر از ۰/۵ میلی‌لیتر زایلین) به مقدار کمتر از ۰/۱ میلی‌لیتر به کمک سرنگ انسولین با تزریق عضلانی بی‌هوش کرده و عمل خون‌گیری به‌طور مستقیم از قلب آن‌ها صورت گرفت. تغییرات وزن بدن موش‌ها و بیضه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و ثبت شد. مقاطع بافتی از بیضه‌ها تهیه و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین مطالعه شدند. خون‌گیری مستقیم از ناحیه بطن به عمل آمد. نتایج به کمک ANOVA و نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: میانگین وزن بدن موش‌ها اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$). تغییرات هیستوپاتولوژیک قابل‌توجهی در مورفولوژی بیضه در گروه تیمار با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون نسبت به تیمار با غلظت ۲۰ قسمت در میلیون مشاهده شد ($P < 0/05$). سطح LH سرم در گروه تیمار یک ۸٪ و در گروه تیمار دو به میزان ۳۱٪ نسبت به شاهد افزایش یافت. اما غلظت هورمون FSH موجود در سرم خون در گروه‌های تیمار با نانو ذرات نقره با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون تغییر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان نداد ($P > 0/05$).

نتیجه‌گیری: استفاده از نانو ذرات نقره می‌تواند سبب تغییرات هورمونی و بافتی در بیضه جنس نر شود و نهایتاً بر عملکرد سیستم تولید مثلی نر و میزان باروری آن اثر منفی بگذارد.

واژه‌های کلیدی: بیضه، نانو ذرات نقره، LH، FSH، موش.

مقدمه:

مطالعات نشان می‌دهند، قرار گرفتن در معرض نانو ذرات نقره در شرایط آزمایشگاهی، سبب کاهش گلوکوتایون (GSH)، افزایش سطح ROS، پراکسیداسیون لیپید و افزایش بیان ژن‌های مسئول ROS می‌شود (۲، ۱). بعضی گزارش‌ها در زمینه‌های پزشکی و بیولوژیکی ثابت کرده‌اند که بسیاری از وسایل پزشکی نقره دار، یون

در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات نقره به‌طور قابل‌توجهی گسترش یافته و نگرانی‌هایی در مورد اثر این مواد بر سلامت انسان و محیط‌زیست را به وجود آورده است. گزارش شده است که القای گونه‌های فعال اکسیژن (Oxygen Species Reactive= ROS) مکانیسم عمومی سمیت سلولی ایجادشده توسط نانو ذرات است و

* نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه شهرکرد- گروه جانورشناسی- تلفن: ۰۹۱۷۳۰۸۳۸۱۰، E-mail: m_heydarnejad@yahoo.com

اسپرماتوزوها از بیضه می‌شود. این فرایند دقیق با هماهنگی و واکنش میان سلول‌های سرتولی، سلول‌های جنسی و نیز سلول‌های لایدیگ انجام می‌شود (۱۲). نانو ذرات نقره با داشتن اندازه‌ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر، اثرات مخربی بر روی بیضه دارند، به طوری که مستقیماً بر روی سلول‌های جنسی و یا به‌طور غیرمستقیم بر روی سلول‌های سرتولی اثر می‌گذارند (در گارسیا اصلی). این ذرات به‌راحتی می‌توانند با عبور از غشاهای بیولوژیک و جدارهای بسیار ریز مویرگی و نیز سد خونی بیضه خود را به اپیتلیوم لوله‌های منی ساز برسانند (۱۳).

اخیراً مطالعات *in vitro* نشان می‌دهند که رابطه مستقیمی میان نانو ذرات نقره و سمیت اسپرماتوگونی وجود دارد و به طوری که این نانو ذرات با نفوذ به بیضه عملکرد آن‌ها را مختل می‌کنند (۱۴). وزن بدن با وزن (وزن) بیضه‌ها ارتباط نزدیکی دارد و خود وزن بیضه کاملاً با حفظ، تکثیر و تمایز سلول‌های جنسی مرتبط است (۱۵). با توجه به استفاده گسترده از نانو ذرات نقره (Ag-NPs) به دلیل ویژگی ضد میکروبی آن در عرصه‌های صنعتی، پزشکی و لوازم‌خانگی و واکنش این نانو ذرات با دستگاه‌های زنده، بررسی اثرات این نانو ذرات بر روی محیط‌زیست و سلامت انسان ضروری به نظر می‌رسد (۱۶). با توجه به اهمیت سیستم تولیدمثلی در بقای نسل موجودات زنده و نفوذ نانو ذرات به بافت‌های تولیدمثلی، این امر به‌ویژه در مورد سمیت‌شناسی سیستم تولیدمثلی لازم است، زیرا این ذرات می‌توانند بر عملکرد سیستم تولیدمثلی و همچنین تکوین جنین تأثیر داشته باشند (۷).

تحقیقات نشان داده است که برخی از نانو ذرات قادر به عبور از سلول‌های اپیتلیوم و غشاهای سلولی و حتی سد خونی مغزی و سد خونی بیضه‌ای می‌باشند و در نتیجه می‌توانند بر فیزیولوژی سلول در بدن جانور اثرگذار باشند (۸،۳). مطالعه‌ای نشان می‌دهد که نانو ذرات برای بسیاری از اندام‌ها، از جمله بیضه‌ها سمی هستند (۴). حضور نانو ذرات نقره در بیضه‌ها بعد از تجویز عمومی یا تنفس‌نگرانی در مورد اثر این نانو ذرات بر بیضه و باروری را به وجود آورده است (۹) و

های نقره آزاد می‌کنند که وارد خون می‌شوند و در کبد، کلیه، ریه و مغز انباشته‌شده و باعث سمی شدن و در نهایت منجر به مرگ آن‌ها می‌شوند (۴،۳).

با توجه به عبور نانو ذرات نقره از طریق غشاهای بیولوژیکی و نفوذ به بافت‌های تولیدمثلی، این امر به‌ویژه در مورد سمیت‌شناسی سیستم تولیدمثلی لازم است، زیرا این ذرات می‌توانند بر عملکرد دستگاه تولیدمثلی و توانایی زنده ماندن اسپرم و همچنین تکوین جنین تأثیر داشته باشند و هرگونه کاستی در این زمینه می‌تواند بر باروری و بقای نسل اثرگذار باشد (۵). نانو ذرات می‌توانند از طریق سلول‌های اپیتلیوم و غشاهای زیستی عبور نمایند و در نتیجه می‌توانند بر فیزیولوژی هر سلول در بدن جانور تأثیر بگذارند (۶،۱). نانو ذرات علاوه بر عبور از سد خونی مغزی، قادر به عبور از سد خونی بیضه‌ای (BTB) و توزیع در غدد جنسی گنادها هستند (۷). این ذرات می‌توانند پس از عبور از سد خونی بیضه‌ای در بیضه‌ها رسوب کنند و باعث اثرات مضر بر سلول‌های اسپرم شوند (۸). مکانیسم چگونگی نفوذ نانو ذرات به سد خونی بیضه‌ای ممکن است در ارتباط با تخریب در سد خونی بیضه‌ای ناشی از پاسخ التهابی باشد که ممکن است به‌نوبه خود توسط نانو ذرات القا شود (۹).

Takeda و همکاران، مجموعه دانه‌های پراکنده‌شده در لوله‌های آسیب‌دیده در سراسر بافت بیضه را مشاهده کردند و نشان دادند که نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، تأثیر منفی بر روند اسپرماتوزن دارند و تغییرات هیستوپاتولوژیکی ایجادشده در بیضه موش سوری را القا می‌کنند (۱۰). اثر نانو ذرات نقره بر اسپرماتوگونی جدانشده از بیضه موش ۶ روزه نشان داد که این نانو ذرات به مقدار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌توانند باعث نکروز و آپوپتوز در این سلول‌ها شوند. کاهش عملکرد میتوکندری و قابلیت زنده ماندن سلول‌ها پس از انکوباسیون با استفاده از نانو ذرات نقره در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد توجه قرار گرفت (۱۱). به‌طورکلی اسپرماتوزن فرایند پیچیده‌ای از تکثیر سلول‌های جنسی است که منجر به تولید و آزاد شدن

به میزان ۱ میلی‌لیتر به روش خوراکی (گاواژ) تجویز می‌گردید.

تغییرات وزن بدن موش‌ها و بیضه‌های آن‌ها، در روز اول آزمایش قبل از تیمار وزن موش‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال (مدل JPR) اندازه‌گیری و ثبت شد. در روزهای ۲۱،۷ و ۴۰ چهار سر از موش‌های هر گروه را پس از استریل کردن همه وسایل و محیط کار با ماده بیهوشی (۱۰ میلی‌لیتر کتامین، ۰/۵ میلی‌لیتر آسپیرومازین، ۲ میلی‌لیتر دیازپام و کمتر از ۰/۵ میلی‌لیتر زایلازین) (شرکت نانو ابزار پارس) به مقدار کمتر از ۰/۰۱ میلی‌لیتر به کمک سرنگ انسولین با تزریق عضلانی بی‌هوش کرده و عمل خون‌گیری به‌طور مستقیم از قلب آن‌ها صورت گرفت، بیضه‌ها به‌صورت جداگانه با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شدند. سپس نمونه‌گیری‌های لازم انجام شد.

بیضه موش‌ها جهت تثبیت بافتی در داخل محلول بوئن قرار گرفت. پس از تهیه مقاطع بافتی و قالب‌گیری از نمونه‌ها، برش‌های بافتی ۵ میکرونی از آن‌ها تهیه گردید و بعد از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین و تهیه لام‌های میکروسکوپی، نمونه‌های لام میکروسکوپی جهت مطالعه سلول‌های بافت بیضه آماده شد.

در هر روز نمونه‌گیری، موش‌ها با ترکیب ماده بیهوشی به کمک سرنگ انسولین با تزریق عضلانی تحت بی‌هوشی قرار گرفتند، خون‌گیری مستقیم از ناحیه بطن راست به عمل آمد و خون موش‌ها برای تهیه سرم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده، سرم خون به‌وسیله سمپلر جدا شده و به میکروتیوپ منتقل شده و تا زمان سنجش‌های هورمونی در دمای ۲۰- سانتی‌گراد جهت سنجش هورمونی نگهداری شد. غلظت سرمی هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH با استفاده از کیت‌های سنجش هورمونی مخصوص اندازه‌گیری تستوسترون به روش Enzyme-Linked Immunosorbent= ELISA) انجام گرفت. (Product code: EIA37K 2303) ساخت شرکت Monobind آمریکا، (Product code: LH 0613) و LH و

سمیت آن بر کاهش تعداد سلول‌های لایدیگ بیضه گزارش شده است (۱۷). سمیت نانو ذرات نقره کلونیدی در مقایسه با سوسپانسیون نانو ذرات نقره در مطالعه بر روی دافنی مشخص شد (۱۸).

با این حال نمی‌توان به‌تنهایی با بررسی وزن بیضه از عملکرد آن مطمئن بود. به طوری که عوامل هورمونی و بافتی را نیز باید در نظر داشت. به عنوان مثال، نشان داده شده است که تزریق درون‌جلدی نانو ذرات نقره در جوندگان سبب واکنش شدن لوله‌های منی ساز و تغییرات در سطح هورمون تستوسترون می‌شود (۱۹). سطح هورمون‌های تستوسترون FSH و LH همگی اهمیت حیاتی برای اسپرماتوژنز دارند (۱۷).

مطالعات نشان داده‌اند که حداقل محدوده غلظتی که نانو ذرات نقره منجر به تأثیر سمی می‌شوند بین ۱۰ قسمت در میلیون تا ۵۰ قسمت در میلیون است (۱۷، ۲۰). با توجه به اهمیت تولید اسپرم در بقای نسل و نیز مدارک و شواهد ناکافی و متناقض در رابطه با اثر نانو ذرات نقره بر روی عملکرد سیستم تولیدمثلی نر، این پژوهش در جهت تأثیر نانو ذرات نقره بر وزن بدن، وزن بیضه‌ها به همراه تغییرات بافتی و هورمونی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی انجام شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش نر بالغ سالم نژاد Balb/c با میانگین وزنی 28.5 ± 3 گرم به‌طور تصادفی در سه گروه ۱۲ تایی (یک گروه شاهد و دو گروه تیمار) قرار گرفتند. الف) گروه کنترل: این گروه هیچ ماده‌ای دریافت نمی‌کرد و از آب استفاده می‌کردند. ب) گروه تیمار ۱: این گروه نانو ذرات نقره با غلظت ۲۰ قسمت در میلیون دریافت می‌کرد. ج) گروه تیمار ۲: این گروه نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون دریافت می‌کرد.

در هر دو گروه تیمار نانو ذرات نقره با غلظت ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون در یک دوره ۴۰ روزه و روزانه یک‌بار در زمان مشخصی

نقره با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون نسبت به وزن گروه شاهد در روزهای ۲۱ و ۴۰ بر اساس آزمون LSD کاهش وزن معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱) (نمودار شماره ۱). علاوه بر آن مشخص شد که میانگین وزن بدن در دوز ۵۰ قسمت در میلیون نسبت به گروه تیمار با دوز ۲۰ قسمت در میلیون در روز ۴۰ بعد از تیمار به میزان بیشتری کاهش یافته که میزان این کاهش بر اساس آزمون LSD بین دو گروه تیمار معنی دار بود ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱) (نمودار شماره ۱).

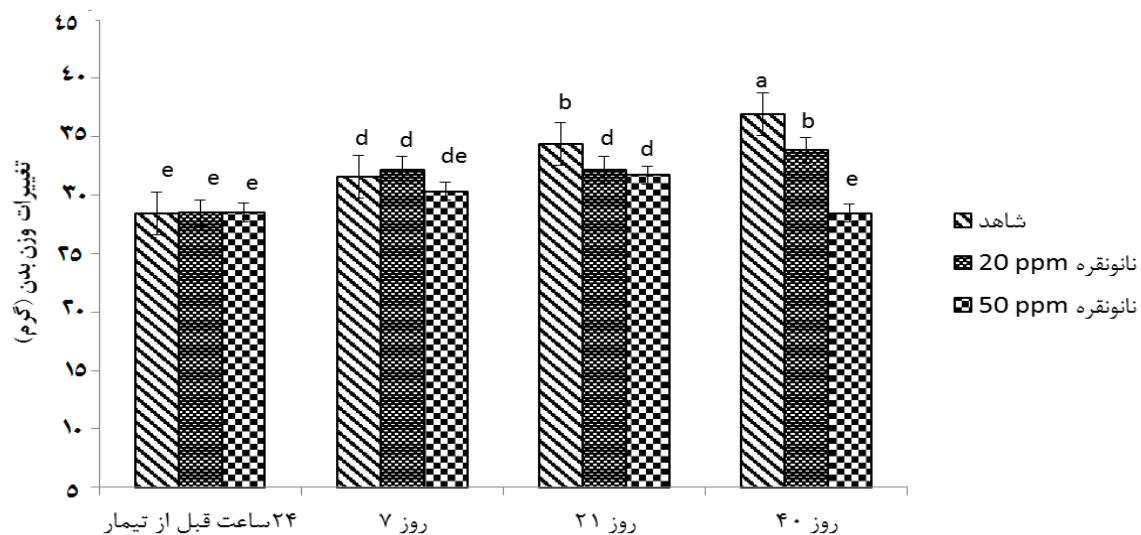
با استفاده از آزمون t میزان تغییرات وزن بدن حیوانات کاهش اندکی در وزن گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون نسبت به وزن قبل از آزمایش نشان داده شد، ولی این تغییرات وزن نسبت به گروه شاهد معنی دار نبود، در مقابل مقایسه میانگین وزن بدن موش‌ها در گروه شاهد بعد از آزمایش نسبت به وزن آن‌ها در ۲۴ ساعت قبل از تیمار بر اساس آزمون t و نیز آزمون LSD افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱-۳) (نمودار شماره ۱-۳).

FSH (Product code: FS 0613) ساخت شرکت پادتن علم ایران.

نتایج به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل و نیز مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های تیمار از آزمون LSD استفاده شد. از آزمون t زوجی (Paired Sample t test) برای مقایسه وزن موش‌ها در ابتدا و انتهای آزمایش در هر گروه استفاده و اختلاف معنی داری بین گروه‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

چند روز اول پس از تزریق از نانو ذرات نقره Ag-NPs نشانه‌هایی مانند بی‌اشتهایی، افزایش پرخاشگری و کاهش وزن بدن در گروه‌های تیمار شده دیده شد، وزن اولیه بدن حیوانات در تمام گروه‌ها به‌طور میانگین مشابه بود و میانگین وزن بدن موش‌ها قبل از آزمایش بین گروه‌ها اختلاف آماری معنی داری را نشان نداد. بررسی مقایسه میانگین وزن بدن موش‌ها بعد از آزمایش در هر دو گروه تیمار شده با نانو ذرات



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین وزن بدن موش آزمایشگاهی در گروه‌های تیمار و شاهد در روزهای مختلف بعد

از تیمار با دو غلظت ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون از نانو ذرات نقره

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی دار آماری ندارند. حروف متفاوت با یکدیگر تفاوت معنی داری با هم دارند.

اندازه گیری وزن بیضه راست و چپ موش ها
 کاهش اندکی را در هر دو گروه تیمار با غلظت
 ۵۰ قسمت در میلیون (تیمار با غلظت بیشتر) و ۲۰ قسمت
 در میلیون (تیمار با غلظت کمتر) در روز ۲۱ و ۴۰ بعد از
 تیمار نسبت به گروه شاهد نشان داد. هرچند این کاهش
 در غلظت ۵۰ قسمت در میلیون بیشتر بود ولی این مقدار
 از لحاظ آماری معنی دار نبود و هیچ تفاوت معنی داری
 در هیچ غلظتی دیده نشد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین وزن بیضه های چپ و راست در تیمارهای مختلف نانو نقره در زمان های مختلف نمونه گیری

گروه های تحت مطالعه	زمان نمونه گیری	وزن بیضه راست (میلی گرم)	وزن بیضه چپ (میلی گرم)
شاهد	روز ۷	۱۱۴a ± ۱/۴	۱۱۵a ± ۱/۸
	روز ۲۱	۱۱۳/۵a ± ۱/۷	۱۱۴a ± ۲/۳
	روز ۴۰	۱۱۶a ± ۲/۲	۱۱۶a ± ۱/۸
نانو نقره ۲۰ قسمت در میلیون	روز ۷	۱۱۳/۵a ± ۱/۴	۱۱۳a ± ۱/۸
	روز ۲۱	۱۱۲/۵a ± ۱/۹	۱۱۲a ± ۲/۶
	روز ۴۰	۱۱۱/۷۵a ± ۱/۵	۱۱۳/۵a ± ۱/۹
نانو نقره ۵۰ قسمت در میلیون	روز ۷	۱۱۴a ± ۱/۶	۱۱۴a ± ۲/۷
	روز ۲۱	۱۱۲a ± ۱/۸	۱۱۳a ± ۲/۱
	روز ۴۰	۱۱۱a ± ۲/۴	۱۱۲a ± ۱/۹

در هر ستون میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی دار آماری ندارند؛ داده ها به صورت (میانگین ± انحراف معیار) بیان شده است.

این مشاهدات علائم بافت کاملاً طبیعی بیضه موش را نشان می دهد (تصویر شماره ۱).

تغییرات هیستوپاتولوژیک قابل توجهی در مورفولوژی بیضه در گروه تیمار با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون و در روز ۴۰ (مدت زمان کامل اسپرماتوزن موش) در مقایسه با گروه شاهد مانند جدا شدن سلول های اسپرماتوسیت از اپیتلیوم لوله های اسپرم ساز، ریزش سلول های زایا و قرار گرفتن این سلول ها در لومن لوله های اسپرم ساز و واکنش شدن لوله های اسپرم ساز و ایجاد فضای خالی گسترده در این لوله ها، کاهش تعداد لوله های اسپرم ساز، افزایش فاصله بین لوله های اسپرم ساز و فضای بین سلولی گسترده تر، به هم ریختگی نظم سلولی در ردیف دودمان سلولی زایا،

اثر نانو ذرات نقره در غلظت های ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون بر بافت بیضه با استفاده از مشاهده اسلایدهای بافتی تهیه شده از بافت بیضه چپ که در محلول بوئن فیکس شده بود، با استفاده از میکروسکوپ نوری، تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه در گروه های درمانی و گروه شاهد بررسی شد. مطالعه ناشی از مقایسه برش های بافتی به دست آمده در نمونه های مربوط به گروه شاهد نشان داد که در گروه شاهد، لوله های اسپرم ساز به طور منظم و مشخص به همراه بافت لایدیگ به صورت طبیعی با سیتوپلاسم صورتی و هسته درشت، نظم سلولی در ردیف دودمان سلولی زایا و تعداد فراوان سلول های زایا در لوله های اسپرم ساز و فضای بین سلولی طبیعی مشاهده گردید،

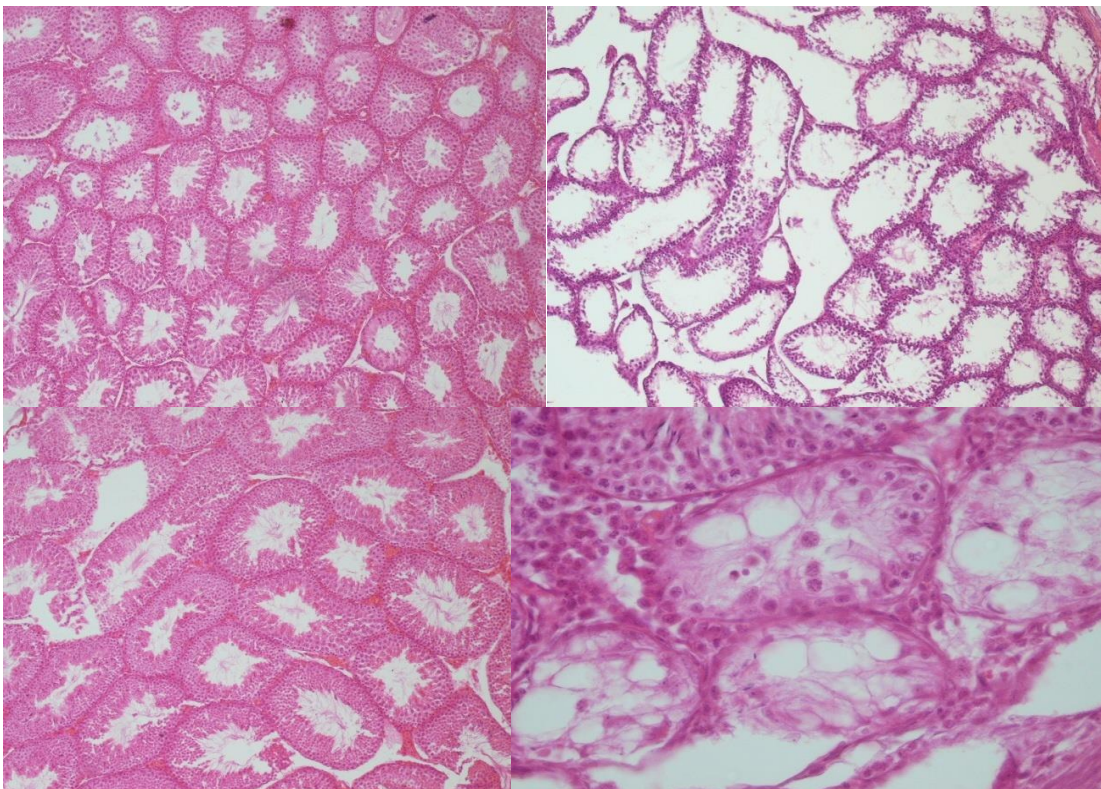
بی رنگی در سیتوپلاسم سلول های لایدیگک و واکوئله شدن این سلول ها مشاهده شد.

علاوه بر آن چنین آسیب هایی در گروه تیمار ۲۰ قسمت در میلیون هم مشاهده شد، ولی میزان شدت این آسیب ها به طور متوسط نسبت به تغییرات پاتولوژیک تیمار با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون کمتر بود. همچنین با توجه به مشاهده اسلایدها در ۵ فیلد میکروسکوپی و مقایسه تعداد

لوله های اسپرم ساز در این فیلدها مشخص شد که به طور متوسط قطر لوله های اسپرم ساز همراه با ضخامت اپی تلیوم آن در گروه تیمار ۵۰ قسمت در میلیون کاهش یافته است. آسیب های بافتی مشخصی در روز ۷ در هر یک از گروه های تیمار نسبت به گروه شاهد نشان نداده نشد و آسیب دیده شده در روز ۲۱ در هر دو گروه بیشتر واکوئله شدن لوله های اسپرم ساز بود.

الف

ب



ج

د

تصویر شماره ۱: تأثیرات هیستولوژیک نانو ذرات نقره بر بیضه

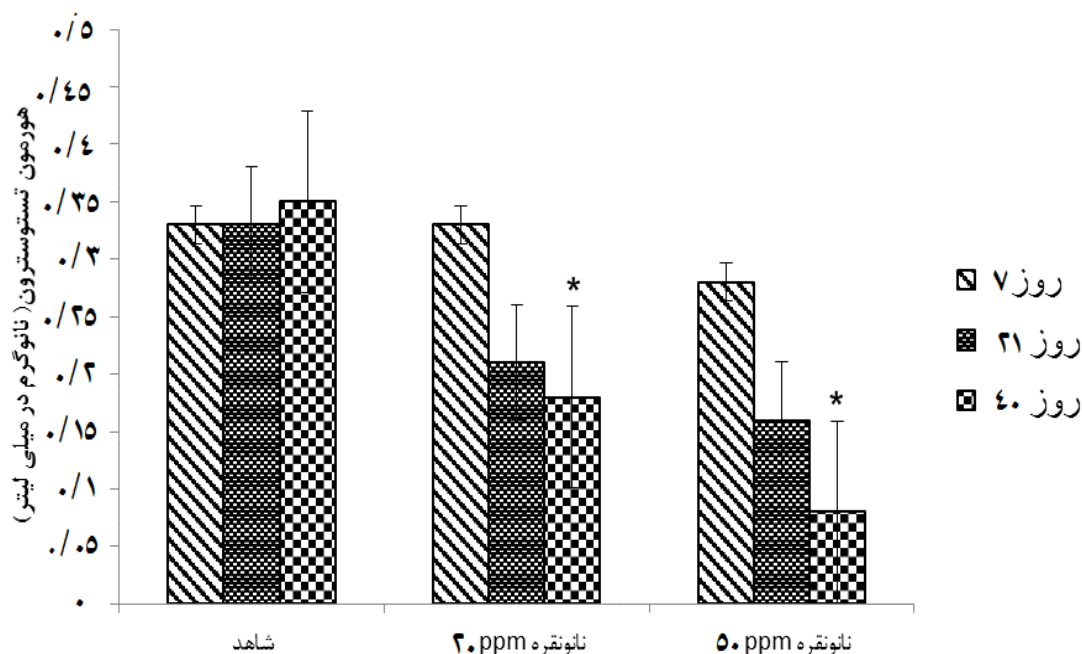
الف: بخشی از مقطع عرضی بافت بیضه گروه تیمار با نانو ذرات نقره غلظت ۵۰ قسمت در میلیون، نشان دهنده بی نظمی سلولی در رده سلول های زایا و کاهش رده های سلولی زایا در لوله های اسپرم ساز و افزایش فاصله بین لوله های اسپرم ساز پس از رنگ آمیزی H and E بزرگ نمایی (۱۰×)؛ ب: بخشی از مقطع عرضی بافت بیضه گروه شاهد نشان دهنده چند لوله اسپرم ساز طبیعی با نظم خاص سلولی و تعداد فراوان رده های سلولی زایا پس از رنگ آمیزی H and E بزرگ نمایی (۱۰×)؛ ج: بخشی از مقطع عرضی بافت بیضه گروه تیمار با نانو ذرات نقره غلظت ۵۰ قسمت در میلیون، نشان دهنده ریزش سلول های زایا و قرار گرفتن این سلول ها در لومن لوله های اسپرم ساز. وجود واکوئل هایی در اپیتلیوم زایا، کاهش اسپرم های بالغ و تخریب چند لوله اسپرم ساز، رنگ آمیزی H and E بزرگ نمایی (۴۰×)؛ د: بخشی از مقطع عرضی بافت بیضه گروه شاهد نشان دهنده چند لوله اسپرم ساز طبیعی با نظم رده های سلولی زایا و قرار گرفتن آن ها در اپی تلیوم زایا پس از رنگ آمیزی H and E بزرگ نمایی (۱۰×).

کنترل و نیز نسبت به روز ۷ در گروه های درمانی شده است ($P < 0/05$) (نمودار شماره ۲).

همچنین از مقایسه میانگین مقدار هورمون تستوسترون موجود در سرم خون در بین گروه های تیمار یک (غلظت ۲۰ قسمت در میلیون) و تیمار دو (غلظت ۵۰ قسمت در میلیون) مشخص شد که کاهش مقدار این هورمون در بین این دو گروه از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0/05$).

نتایج آنالیز داده های مربوط به مقایسه میانگین

اثر نانو ذرات نقره بر مقدار هورمون تستوسترون سرم با استفاده از آزمون LSD نشان داد که سطح سرمی این هورمون در تیمار ۱ ۲۷٪ و در تیمار دو به میزان ۴۹٪ نسبت به شاهد کاهش یافته است. پس مشخص شد که نانو ذرات نقره با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون سبب کاهش معنی دار غلظت هورمون تستوسترون در روزهای ۲۱ و ۴۰ نسبت به گروه

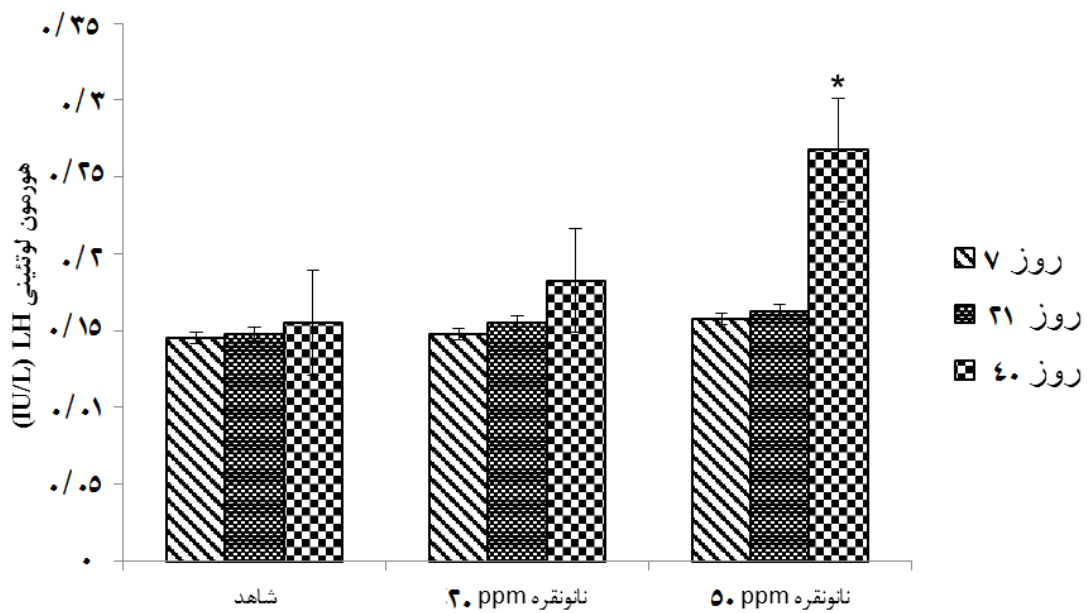


نمودار شماره ۲: نشان دهنده اثرات متقابل زمان و تیمار نانو نقره بر تغییرات غلظت سرمی هورمون تستوسترون

*: کاهش معنی دار غلظت سرمی هورمون تستوسترون در تیمار نانو ذرات نقره با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون در روزهای ۲۱ و ۴۰ نسبت به گروه کنترل و نیز نسبت به روز ۷ در گروه های درمانی ($P < 0/05$)؛ بر اساس آزمون LSD.

مقایسه میانگین میزان هورمون LH موجود در سرم خون در زمان های مختلف اندازه گیری و در دوزهای مشخص در تیمار نانو ذرات نقره، بین تیمار دوز ۲۰ قسمت در میلیون و گروه شاهد و همچنین بین دو گروه تیمار با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون نانو ذرات نقره از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشت ($P < 0/05$).

بررسی آماری داده های به دست آمده از مقدار هورمون LH موجود در سرم خون نشان داد که سطح LH سرم در گروه تیمار یک ۸٪ و در گروه تیمار دو به میزان ۳۱٪ نسبت به شاهد افزایش یافته است که این افزایش در دوز ۵۰ قسمت در میلیون در روز ۴۰ نسبت به گروه شاهد معنی دار بود ($P < 0/05$) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: نشان دهنده اثرات متقابل زمان و تیمار نانو نقره بر تغییرات غلظت سرمی هورمون LH در

گروه های شاهد و تیمار با دو غلظت متفاوت از نانو ذرات نقره

*: افزایش معنی دار میزان هورمون LH سرم خون نسبت به گروه شاهد ($P < 0.05$)؛ بر اساس آزمون LSD.

۵۰ قسمت در میلیون، غلظت FSH تغییر معنی داری در زمان ها و دوزهای مشخص نسبت به گروه شاهد نشان نداد ($P > 0.05$) (جدول شماره ۲).

بر اساس مقایسه مقادیر میانگین حاصل از غلظت هورمون FSH موجود در سرم خون در گروه‌های تیمار با نانو ذرات نقره با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین غلظت سرمی هورمون FSH در تیمارهای مختلف نانو نقره در زمان های مختلف

نمونه‌گیری

هورمون FSH	زمان نمونه‌گیری	گروه‌های تحت مطالعه
$0.13a \pm 0.01$	روز ۷	شاهد
$0.12a \pm 0.02$	روز ۲۱	
$0.12a \pm 0.01$	روز ۴۰	
$0.11a \pm 0.02$	روز ۷	نانو نقره ۲۰ قسمت در میلیون
$0.11a \pm 0.02$	روز ۲۱	
$0.10a \pm 0.03$	روز ۴۰	
$0.11a \pm 0.02$	روز ۷	نانو نقره ۵۰ قسمت در میلیون
$0.10a \pm 0.03$	روز ۲۱	
$0.08a \pm 0.02$	روز ۴۰	

در هر ستون میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی دار آماری ندارند؛ داده ها به صورت (میانگین \pm انحراف معیار) بیان شده است.

بحث:

قبلی هستند که Sung و همکاران در مطالعه *in vivo* نیز نشان دادند که نانو ذرات نقره می توانند در اندام های مختلف توزیع شده و منجر به کاهش وزن بدن، تغییرات در پارامترهای بیوشیمیایی خون و التهاب شدند. اگرچه در این مطالعه کاهش وزن بدن موش نر در معرض نانو ذرات نقره مشاهده شد، ولی تفاوت وزنی معنی داری در وزن بیضه های چپ و راست مشاهده نشد (۲۱). در مطالعه حاضر تغییر معنی داری در وزن بیضه در گروه تیمار شده با نانو ذرات نقره با غلظت ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون مشاهده نشد.

در مطالعه شهاره و همکاران، اثر خوراکی نانو ذرات نقره بر مخاط روده کوچک، وزن بدن موش ها بررسی شد و در تمام گروه های تحت درمان با AgNPs کاهش معنی داری مشاهده گردید. با استفاده از میکروسکوپ نوری و همچنین میکروسکوپ الکترونی معلوم شد که نانو ذرات نقره ممکن است باعث آسیب ریز پرزهای سلول های اپیتلیال و همچنین غدد روده شوند. ممکن است این فرضیه مطرح شود که از دست رفتن پرزهای سلول های اپی تلیال باعث کاهش ظرفیت جذب اپیتلیوم روده و در نتیجه کاهش وزن شود (۲۲).

در این پژوهش، بررسی هیستوپاتولوژیک مقاطع بافتی بیضه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در موش های درمان شده در تجویز بلند مدت با نانو ذرات نقره در دوزهای مختلف (غلظت ۵۰ قسمت در میلیون و ۲۰ قسمت در میلیون)، تغییراتی از جمله واکنش شدن لوله های اسپرم ساز، کاهش رده های سلولی زایا در مراحل مختلف اسپرماتوژنز، بی نظمی در ترتیب سلول های زایا، نابود شدن تعدادی از لوله های اسپرم ساز که در فرایند اسپرماتوژنز دخالت دارند و وجود توده های سلولی در لومن لوله های اسپرم ساز مشاهده گردید. همچنین

یکی از مسیرهای قرار گرفتن در معرض نانو ذرات AgNPs مسیر خوراکی است که با توجه به استفاده از این ذرات در بسیاری از محصولات مصرفی مهم مانند خمیردندان، بطری های قابل استفاده مجدد، ظروف آشپزخانه و اسباب بازی ها نام می گیرد. در این مطالعه، به بررسی اثرات سمیت نانو ذرات نقره با تجویز خوراکی در دوزهای مختلف (غلظت های ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون) بر روی موش نر آزمایشگاهی نژاد Balb/c در مدت زمان ۴۰ روز (مدت زمان کامل چرخه اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم در اپیدیدیم موش نر) بر سیستم تولید مثلی نر موش آزمایشگاهی پرداخته شده است. حیوانات آزمایشگاهی به مدت ۴۰ روز با نانو ذرات نقره تیمار شدند. تغییرات وزن بدن و بیضه موش های تحت تیمار تغییرات غلظت سرمی هورمون های جنسی سیستم تولید مثلی نر و آسیب های بافت بیضه در موش سوری نر مورد بررسی قرار گرفت.

کاهش وزن در گروه تحت درمان با دوز بالاتر ۵۰ قسمت در میلیون در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. این کاهش وزن معنی دار در موش های تحت تیمار طولانی مدت با نانو ذرات نقره، نشان دهنده این است که شاید شرایط متابولیکی عمومی در حیوانات تحت درمان با نانو ذرات نقره طبیعی نبوده و نانو ذرات نقره تهیه شده در مقادیر تجویز شده در این تحقیق، در اشتها و میزان مصرف مواد غذایی حیوان ها و همچنین بر روند متابولیسم عمومی بدن با گذشت زمان تأثیر داشته اند.

نتایج این مطالعه با نتایج برخی مطالعات در این زمینه که بر روی نمونه های جانوری صورت گرفته است، مطابقت دارد. این نتایج مطابق با گزارش های

در مطالعه Kolasa و همکاران، مشخص شده که تغییرات مورفولوژیکی در اپیتلیوم لوله های اسپرم ساز در موش های با کمبود دی هیدروتستوسترون با تجزیه اتصالات بین سلولی ایجاد می شود. آن ها با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان دادند، بیان پروتئین های سازنده اتصالات محکم و پیوسته تغییر می کنند که یک عنصر مهم برای تشکیل سد خونی بیضه ای هستند (۲۳). تستوسترون نقش کلیدی در تکوین و رشد بافت های سیستم تولید مثلی نر از جمله بیضه دارد (۲۴). در مطالعه حاضر نشان داده شد که غلظت سرمی تستوسترون در موش های درمان شده با نانو ذرات نقره کاهش یافت.

در این مطالعه نمودار طبیعی سلول های اپیتلیوم ژرمینال لوله های اسپرم ساز در گروه های درمان شده با نانو ذرات نقره کاهش یافت. این تغییرات می تواند ناشی از تغییرات هورمونی باشد و در این گروه ها کاهش هورمون تستوسترون با تغییرات ریخت‌شناسی این اپیتلیوم همخوانی دارد. از آنجا که سلول های اسپرماتوژنیک بیضه دارای رسپتور آندروژنی هستند، به تغییرات این هورمون نیز بسیار حساس اند (۲۵).

بررسی آنالیز آماری در خصوص اثر نانو ذرات نقره بر روی غلظت سرمی هورمون تستوسترون نشان داد که نانو ذرات نقره با دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون سبب کاهش معنی داری در غلظت هورمون تستوسترون در روزهای ۲۱ و ۴۰ نسبت به گروه کنترل و نیز نسبت به روز ۷ در گروه های درمانی شده است ($P < 0/05$). این کاهش غلظت هورمون تستوسترون می تواند ناشی از اثر نانو ذرات نقره بر روی سلول های لایدیگ و در نتیجه کاهش تولید این هورمون باشد. نانو ذرات نقره می توانند بر فعالیت میتوکندری سلول های لایدیگ تأثیر گذاشته و در نتیجه فعالیت

دریافت بینابینی آن ها تغییراتی، مانند بی نظمی در ترتیب سلول های زایا، کاهش تعداد سلول های لایدیگ و کاهش اتصالات بین سلولی، مانند اتصالات محکم دیده شد.

در مطالعات قبلی که اثر نانو ذرات نقره را بر لوله های اسپرم ساز موش صحرایی و موش بررسی نموده اند، تغییرات بافتی بیضه و آسیب به سلول های زایا گزارش شده است که نتایج پژوهش های قبلی در مورد تغییر نمودار و بی نظمی در ترتیب سلول های زایا در برخی از لوله های اسپرم ساز آتروفی لوله های اسپرم ساز و دژنره شدن آن ها با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۱۷). نشان داده شده که نانو ذرات دی اکسید ریتانیوم می توانند از سد خونی بیضه ای عبور و به نمودار دانه هایی در سلول های سرتولی تجمع یابند. این به نوبه خود، باعث آسیب و به هم ریختگی لوله های اسپرم ساز می شود (۱۴-۱۱).

تغییرات ریخت‌شناسی بیضه مانند کاهش قطر و ضخامت لوله های اسپرم ساز مانند در حیوانات درمان شده با نانو ذرات نقره ۵۰ قسمت در میلیون، ۴۰ روز پس از استفاده از نانو ذرات نقره مشاهده شد. از این رو، فرایند اسپرماتوژنز در نتیجهی تخریب لوله های اسپرم‌ساز می شود که کاهش پارامترهای مورد بررسی در مطالعه تأییدکننده این موضوع است. بسیاری از مطالعات *in vivo* نشان داده اند، مواد شیمیایی، قارچ کش‌ها، هیپوکسی و فلزاتی مانند کروم، کادمیوم و یا سرب، قطر سلول های اپیتلیال لوله های اسپرم ساز را کاهش می دهند (۱۷).

Garcia و همکاران، در مطالعه اثر نانو ذرات نقره بر سلول های لایدیگ نشان دادند که نانو ذرات نقره باعث تغییرات قابل توجهی در مورفولوژی اپیتلیوم لوله های اسپرم ساز و هسته سلول های لایدیگ می شوند (۱۱، ۱۳).

آن، آپوپتوز این سلول ها و در نهایت مرگ سلول های لیدینگ می باشد (۲۴،۶). بنابراین کاهش تعداد سلول های لیدینگ می تواند باعث کاهش تولید تستوسترون شود. نتایج حاصل از تأثیر نانو ذرات نقره بر غلظت سرمی هورمون LH در این مطالعه نشان دهنده افزایش معنی دار غلظت این هورمون در دوز ۵۰ قسمت در میلیون در روز ۴۰ نسبت به گروه کنترل می باشد (۰/۰۵ $P \leq$). هرچند غلظت LH در دوز ۵۰ قسمت در میلیون تغییر معنی داری نشان نداد (۰/۰۵ $P \geq$). این افزایش معنی دار غلظت سرمی هورمون LH، در گروه تجربی ۲ (غلظت ۵۰ قسمت در میلیون) می تواند ناشی از کاهش هورمون تستوسترون باشد، به طوری که کاهش تستوسترون به صورت خودتنظیمی منفی بر هیپوتالاموس تأثیر گذاشته و میزان ترشح LHRH را افزایش داده و سبب افزایش تولید LH شده است. از طرف دیگر نانو ذرات نقره می توانند باعث افزایش محصولات نیتریک اکساید شوند. نیتریک اکساید باعث افزایش cGMP می شود. افزایش cGMP می تواند سبب افزایش پروتئین کیناز G (PKG) شود که سبب افزایش ترشح LHRH از هیپوتالاموس و در نهایت افزایش LH می شود (۲۹). بررسی اثر نانو ذرات نقره بر افزایش قابل توجه LH نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

این مطالعه نشان داد که غلظت هورمون FSH در گروه های تیمار شده با نانو ذرات نقره ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون نسبت به گروه شاهد کاهش جزئی نشان داد، ولی کاهش غلظت این هورمون معنی دار نبود. این کاهش جزئی غلظت هورمون FSH نمی تواند در ارتباط با GnRH باشد، زیرا LH افزایش یافته است. این کاهش می تواند در ارتباط با آزادسازی هورمون اینهیبین از سلول های رده سرتولی باشد. با توجه به نتایج حاصل از غلظت هورمون FSH شاید مکانیسم فیدبکی فقط توسط استروئیدهای بیضه اعمال نمی شود بلکه اینهیبین، اکتیوین و فولیستاتین هم با تأثیر نقش مرکزی بر روی تولید GnRH در تنظیم غلظت

ترشحی آن را کم کنند. از طرفی نانو ذرات نقره باعث افزایش مولکول های اکسیژن واکنش پذیر نظیر سوپراکسیداز شده و باعث افزایش اکسیداسیون مولکول هایی نظیر پروتئین ها می گردند که باعث مرگ سلولی می شوند (۲۶).

نتایج تحقیقات نشان داده که درمان با استفاده از نانو ذرات نقره به صورت داخل وریدی مقدار تستوسترون و دی هیدروتستوسترون اندازه گیری شده در روز ۷ و ۲۸ پس از تزریق را کاهش داده است (۱۷). برخی از مطالعات نشان می دهند که نانو ذرات می توانند باعث کاهش رونویسی mRNA پروتئین تنظیم کننده حاد استروئیدساز بیضه شوند که این کاهش توانایی زنده ماندن سلول های لیدینگ و تولید هورمون های استروئیدی را تحت تأثیر قرار می دهد (۲۷). اثرات مضر نانو ذرات با ویژگی ضد آندروژنی آن نیز شناخته شده که این خاصیت ضد آندروژنی آن می تواند مسئول افزایش بروز اختلالات در عملکرد سیستم تولید مثلی نر مانند آسیب بافتی بیضه باشد (۲۶).

پروتئین تنظیم کننده حاد استروئیدساز در تنظیم انتقال کلاسترول به غشای داخلی میتوکندری و افزایش تولید هورمون های استروئیدی نقش دارد (۲۸)؛ بنابراین فرض دیگر آن است که نانو ذرات نقره می توانند در بیان ژن Star تأثیر داشته باشند و این امکان وجود دارد که نانو ذرات نقره با کاهش بیان ژن پروتئین Star مانع انتقال کلاسترول به غشای داخلی میتوکندری شده و در نهایت از تبدیل کلاسترول به پرگنولون جلوگیری کند و باعث کاهش میزان تستوسترون شود. همچنین کاهش بیان ژن ۱۷-بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (17 β -HSD) که نقش اساسی در مراحل سنتز تستوسترون و تبدیل آندروستندیون به تستوسترون دارد، می تواند باعث کاهش تولید این هورمون شود (۲۷).

در مطالعه Taylor و همکاران، مشخص شده است که نانو ذرات نقره مانند نانو ذرات دیگر می توانند باعث تخریب DNA سلول های لیدینگ شوند که نتیجه

FSH نقش دارند و ممکن است که عدم‌تغییر معنی دار FSH ناشی از اثرات تعدیلی این عوامل باشد.

و سایر اندامک های سلولی و نیز اسیدهای نوکلئیک مانند DNA استفاده شود.

با توجه به نقش نانو ذرات نقره در محصولات مصرفی و لوازم پزشکی این ذرات یکی از عوامل مضر برای سیستم تولید مثلی و به دنبال آن موثر بر ناباروری محسوب می شوند که لازم است سمیت غلظت این نانو ذرات در مصارف روزانه دقیقاً ارزیابی و کنترل شود.

نتیجه‌گیری:

استفاده از نانو ذرات نقره حتی با حداقل دوز سمی (دوزهای ۲۰ قسمت در میلیون و ۵۰ قسمت در میلیون) می تواند سبب تغییرات هورمونی و بافتی در بیضه جنس نر شود و نهایتاً بر عملکرد سیستم تولید مثلی نر و میزان باروری آن اثر بگذارد. به منظور تکمیل نتایج حاصل از این تحقیق و پیشبرد تحقیقات آینده پیشنهادت زیر ارائه می گردد: سمیت نانو ذرات نقره با غلظت و مشخصات مورد مطالعه بر روی بافت ها و اندام های دیگر نیز بررسی شود؛ از میکروسکوپ الکترونی برای بررسی آسیب های سلولی بافت های سیستم تولید مثلی نر مانند آسیب به غشا، میتوکندری ها

تشکر و قدردانی:

از کلیه افرادی که به هر نحو با انجام این تحقیق ما را حمایت کردند. به ویژه پرسنل محترم آزمایشگاه فارماکولوژی دانشگاه شهرکرد تشکر و قدردانی می گردد. این تحقیق بخشی از پایان نامه مصوب سال ۹۳ دانشگاه شهرکرد، گروه جانوری می باشد.

منابع:

1. AshaRani P, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*. 2008; 3(2): 279-90.
2. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 7(1): 20-2.
3. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M-C. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci*. 2005; 88(2): 412-9.
4. Hendi A. Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing. *J King Saud Univ Sci*. 2011; 23(1): 47-52.
5. Park E-J, Park K. Induction of Oxidative Stress by Silver Nanoparticles in Cultured Leydig Cells. *Journal of Environ Toxicol*. 1986; 22(1): 57-64.
6. Taylor U, Barchanski A, Kues W, Barcikowski S, Rath D. Impact of metal nanoparticles on germ cell viability and functionality. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47(s4): 359-68.
7. Kashiwada S. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Perspect*. 2006; 114(11): 1697.
8. Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza-Trevino EN, Rodriguez-Padilla C. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J Nanobiotechnology*. 2010; 8(1): 15.
9. Chen Y. Introduction to nanotechnology history, definition, methodology, applications, and challenges. *Nano Engin Radiat Lab*. 2012; 2: 1-35.
10. Takeda K, Suzuki K-i, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci*. 2009; 55(1): 95-102.
11. Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol*. 2010; 30(3): 343-52.
12. Valipoor A, Amiri G, Parivar K, Modaresi M, Taheri J, Kazemi A, et al. A comparative study about toxicity of CdSe quantum dots on reproductive system development of mice and controlling this toxicity by ZnS coverage. *Nanomed J*. 2015; 2(4): 261-8.

13. Garcia TX, Costa GM, Franca LR, Hofmann M-C. Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reprod Toxicol*. 2014; 45: 59-70.
14. Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 242(3): 263-9.
15. Cha K, Hong H-W, Choi Y-G, Lee MJ, Park JH, Chae H-K, et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett*. 2008; 30(11): 1893-9.
16. Zare Z, Eimani H, Mohammadi M, Mofid M, Dashtnavard H. The Effect of orally administered L-carnitine on testis tissue, sperm parameters and daily sperm production in adult mice. *Yakhteh Med J*. 2010; 11(4): 382-9.
17. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett*. 2012; 214(3): 251-8.
18. Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *J Nanobiotechnology*. 2012; 10(1): 14.
19. Yeung BH, Wan HT, Law AY, Wong CK. Endocrine disrupting chemicals: Multiple effects on testicular signaling and spermatogenesis. *Spermatogenesis*. 2011; 1(3): 231-9.
20. Sardari RRR, Zarchi SR, Talebi A, Nasri S, Imani S, Khoradmehr A, et al. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *Afr J Microbiol Res*. 2012; 6(27): 5587-93.
21. Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2008; 108(2): 452-61.
22. Shahare B, Yashpal M, Gajendra. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicol Mech Meth*. 2013; 23(3): 161-7.
23. Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rozewicka L, Wiszniewska B. DHT deficiency perturbs the integrity of the rat seminiferous epithelium by disrupting tight and adherens junctions. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011; 49(1): 62-71.
24. Hu Jx, Li Yf, Li J, Pan C, He Z, Dong Hy, et al. Toxic effects of cypermethrin on the male reproductive system: With emphasis on the androgen receptor. *J Appl Toxicol*. 2013; 33(7): 576-85.
25. Yoisungnern T, Choi Y-J, Han JW, Kang M-H, Das J, Gurunathan S, et al. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Sci Rep*. 2015; 5(11): 170-3.
26. Rahman MS, Lee JS, Kwon WS, Pang MG. Sperm proteomics: road to male fertility and contraception. *Int J Endocrinol*. 2013; 22(5): 36-47.
27. Sleiman HK, Romano RM, Oliveira CA, Romano MA. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats. *J Toxicol Environ Health*. 2013; 76(17): 1023-32.
28. Lan Z, Yang W-X. Nanoparticles and spermatogenesis: How do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. *Nanomedicine*. 2012; 7(4): 579-96.
29. Orazizadeh M, Khorsandi L, Absalan F, Hashemitabar M, Daneshi E. Effect of beta-carotene on titanium oxide nanoparticles-induced testicular toxicity in mice. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31(5): 561-8.

Effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) on testis histology and hormones of pituitary-testicular axis in small laboratory mice (*Mus musculus*)

Heydarnejad MS^{1*}, Ghasemi G², Kaboutari Kataj J³

¹Zoology Dept., University of Shahrekod, Shahrekod, I.R. Iran; ²Animal Physiology Dept., University of Shahrekod, Shahrekod, I.R. Iran; ³Veterinary Dept., University of Shahrekod, Shahrekod, I.R. Iran.

Received: 4/Oct/2016 Accepted: 27/Dec/2016

Background and aims: Regarding Ag-NPs are able to pass through biological membranes. So, this study aimed to investigate effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) on testis histology and hormones of pituitary-testicular axis in small laboratory mice (*Mus musculus*).

Methods: In this experimental study, a group of 36 BALB/c adult male mice (average weights; 28.5±3 g) were randomly divided into three groups; one control and two treatment groups (n=12 each). The treated groups 1 and 2 received 20 and 50 ppm concentrations of Ag-NPs, respectively. Sampling was done on days 7, 21 and 40 of the experiment. Four groups of mice in each group were anesthetized by anesthetic substance (10 m/L ketamine, 0.5 m/L acepromazine, 2 m/L diazepam and xylazine less than 0.5 m/L) in amounts less than 0.01 m/L by insulin syringe with muscle injections. Blood sampling was obtained directly from the ventricle and serum samples were rotated for 10 min at 3000 rpm. A digital balance was used to weigh changes of body weight and biomass of the testes. Histological slides were prepared from the testes and then stained by H and E staining method. The data were analyzed by one-way Anova using SPSS.

Results: The average of mice body weight did not show any significant difference. However, remarkable histological changes were found in the 50-ppm Ag-NPs treated group than to 20 ppm treated group. Serum level of LH increased 8% and 31% in the treated groups one and two, respectively. However, serum level of FSH did not show any significant difference between both treatment groups and the control.

Conclusion: The use of Ag-NPs can lead to hormonal and histological changes in the male testis and consequently affects the male reproductive system and fertility.

Keywords: Testis, Ag-NPs, FSH, LH, Mice.

Cite this article as: Heydarnejad MS, Ghasemi G, Kaboutari Kataj J. Effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) on testis histology and hormones of pituitary-testicular axis in small laboratory mice (*Mus musculus*). J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 19(6): 24-37.

***Corresponding author:**

Zoology Dept., University of Shahrekod, Shahrekod, I.R. Iran. Tel: 00989173083810,
E-mail: m_heydarnejad@yahoo.com