

مطالعه اثر استریولوژیکی و بیوشیمیایی ال کارنیتین بر بافت بیضه پس از القای سمیت توسط نانوذرات نقره در موش سوری

سید محمدعلی شریعت‌زاده^{*}، مهدیه عمادی^۲، سمیرا مقدسی^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: با توجه به اثر نانوذرات نقره در القای استرس اکسیداتیو و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ال کارنیتین، هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ال کارنیتین بر کاهش اثرات نامطلوب نانوذرات نقره بر بافت بیضه موش بود.

روش بررسی: در این پژوهش تجربی ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی 32 ± 2 گرم به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل، گروه نانوذرات نقره (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)، گروه ال کارنیتین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز)، گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین. پس از ۳۵ روز تیمار به شکل گاواژ، موش‌ها تشریح شده و سرم و نمونه اسپرمی تهیه گردید. وزن بدن و بیضه، تحرک، تعداد اسپرم، حیات و مورفولوژی اسپرم، سطح هورمون تستوسترون و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام و مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی هیستوپاتولوژیک بیضه به وسیله رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین انجام شد. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی نیز گزارش گردید. در پایان سطح معناداری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد و با کمک آزمون‌های آماری SPSS-ANOVA یک‌طرفه و Tukey مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نانوذرات نقره بر روی وزن موش اثر نداشته است و تغییر معناداری را نشان نداد ($p > 0/05$) گروه تیمار شده با ال کارنیتین کاهش معناداری در وزن نسبت به گروه کنترل را نشان داد ($p < 0/05$) پارامترهای اسپرمی در گروه نانوذرات نقره کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p < 0/05$). حجم کل بیضه و حجم لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های آزمایشی اختلاف معناداری را نشان نداد ($p > 0/05$). حجم بافت بینابینی در گروه نانوذرات نقره افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل داشت، همچنین در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین کاهش معناداری در مقایسه با گروه نانوذرات نقره مشاهده شد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: ال کارنیتین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت طبیعی با کاهش استرس اکسیداتیو، از آسیب‌های دستگاه تولیدمثلی نر و بافت بیضه القاشده توسط نانوذرات نقره جلوگیری کرد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، ال کارنیتین، استرس اکسیداتیو، استریولوژی، بیضه

ارجاع: شریعت‌زاده سید محمدعلی، عمادی مهدیه، مقدسی سمیرا. مطالعه اثر استریولوژیکی و بیوشیمیایی ال کارنیتین بر بافت بیضه پس از القای سمیت توسط نانوذرات نقره در موش سوری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۹): ۹۴۰۰-۹۳۸۶.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

۲- کارشناسی ارشد سلولی و تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۸۱۶۲۹۰۲۶، پست الکترونیکی: s-shariatzadeh@araku.ac.ir، صندوق پستی: ۳۸۱۵۶۸۸۱۳۸

مقدمه

مشکلات باروری در انسان‌ها روز به روز در حال افزایش است. در واقع ناباروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن یکی از مشکلات اصلی است که زندگی زوج‌های جوان را مختل کرده است. ناباروری و عدم توانایی فرد برای انجام طبیعی فرآیند تولیدمثل و صاحب فرزند شدن به عنوان یکی از تجربیات تلخ و دردآور زندگی است که با توجه به شرایط اجتماعی می‌تواند برای زوجها تبدیل به یک بحران اساسی شود (۱). ناباروری به عنوان عدم توانایی بچه‌دار شدن بعد از حداقل یکسال ازدواج بدون استفاده از وسایل پیشگیری اطلاق می‌شود. در حدود ۱۲-۸ درصد از زوجها دچار ناباروری هستند، که در حدود ۳۵ درصد ناباروری‌ها مربوط به مردان و ۲۵ درصد مربوط به زنان است (۲). بسیاری از تحقیقات اثرات مضر عوامل محیطی از جمله مواد سمی، تشعشعات و آفت‌کش‌ها روی ناباروری مردان را نشان داده و مشخص کرده است که آفت‌کش‌ها و مواد سمی می‌توانند باعث کاهش اسپرم در مردان شود (۳،۴). با توجه به تحقیقات صورت گرفته مواد شیمیایی و سمی با باروری مردان مرتبط است. یکی از این مواد شیمیایی نانوذرات نقره است. نانوذرات نقره یکی از ارزشمندترین محصولات نانو تکنولوژی است که در دنیای امروز در علوم مختلف همانند پزشکی و بیولوژی به کار برده می‌شود. در حوزه پزشکی در مواردی همچون پوششی برای ترمیم زخم‌ها، دندانپزشکی و تهیه ابزار جراحی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). نانوذرات نقره پرکاربردترین نانوذرات است و میزان مصرف آن سالانه ۵۵ تن است. علت اصلی کاربرد گسترده نانوذرات نقره خواص ضد میکروبی آن است. این نانوذرات دارای خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی می‌باشد (۶). نانوذرات با توجه به خطرات احتمالی برای سلامت انسان خطرناک هستند و با توجه به عبور نانوذرات از طریق موانع بیولوژیکی و نفوذ به بافت‌های تولیدمثلی این امر به خصوص در مورد سمیت‌شناسی تولیدمثلی ضروری است، زیرا این ذرات بر عملکرد سیستم تولیدمثلی و توانایی زنده ماندن اسپرم و تکوین جنین اثرگذار است بنابراین هر گونه کاستی در این زمینه بر بقای نسل و

باروری اثرگذار می‌باشد (۷). مطالعات انجام شده بر روی مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که نانومواد نقره توانایی عبور از سد خونی بیضه را دارند و در سلول‌های سوماتیک و ژرمینال بیضه جمع‌آوری می‌گردند. تجمع قابل توجهی از این مواد در سلول‌های سرتولی و هسته‌های اسپرماتوسیت گزارش گردیده است. امروزه محققان بر این باورند که غنی کردن محیط اطراف اسپرم با آنتی‌اکسیدان‌ها، احتمالاً منجر به حفاظت اسپرماتوزو در برابر آسیب‌های القاشده با استرس اکسیداتیو می‌شود (۸). سیستم آنتی‌اکسیدانتی بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد بسیار کارآمد است و در واقع مواد آنتی‌اکسیدانتی با غیرفعال کردن و حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، از سمیت بافت جلوگیری می‌کند (۹). در واقع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند باعث محافظت اسپرماتوزو در برابر ROS تولیدشده توسط اسپرماتوزوای غیرطبیعی، ممانعت از قطعه‌قطعه شدن DNA، بهبود کیفیت مایع منی در افراد سیگاری، کاهش آسیب سرما به اسپرماتوزو، ممانعت از بلوغ اسپرم نابالغ و افزایش حرکت اسپرماتوزو شوند (۱۰). ال کارنیتین برای اولین بار از گوشت گاو جدا گردید و این ماده از مشتقات اسید آمینه لیزین و متیونین می‌باشد. ال کارنیتین در برخی مواد غذایی مانند گوشت طیور، ماهی و برخی فراورده‌های لبنی وجود دارد (۱۱). برای بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند در میتوکندری، ال کارنیتین ضروری است. اسیدهای چرب قبل از آن که به میتوکندری وارد شوند باید فعال شوند مولکول‌های زنجیره بلند استیل کوآ بدون وجود ال کارنیتین توانایی عبور از غشای داخلی میتوکندری را ندارند. بعد از وارد شدن به داخل میتوکندری بتا اکسیداسیون و تولید آدنوزین تری فسفات شروع می‌گردد (۹،۱۲). ال کارنیتین یک شبه ویتامین است که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپاپتوزیس در سیستم تناسلی نر می‌باشد و در واقع ال کارنیتین در تنظیم عملکرد سلول‌های سرتولی یک تنظیم‌کننده اساسی است و در رفع نواقص اسپرم موثر شناخته شده است (۱۳). با توجه به اینکه نانوذرات نقره در زندگی روزمره کاربردهای فراوانی دارد و اثرات آن بر ناباروری غیر

قابل چشم‌پوشی است، در این پژوهش بر آن شدیم اثر استریولوژیکی و بیوشیمیایی ال کارنیتین بر بافت بیضه موش‌های نژاد NMRI تیمار شده با نانوذرات نقره را مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

به منظور انجام این پژوهش تجربی ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به میانگین وزنی 32 ± 2 گرم به شکل تصادفی از خانه حیوانات دانشگاه اراک تهیه شد و نگهداری گردید. موش‌ها در اتاق حیوانات دانشگاه اراک در شرایط کنترل شده (دوره روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی) و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۶۰-۴۰ درصد رطوبت قرار داده شدند. برای سازگاری با محیط جدید، ضمن دسترسی راحت به آب و غذای مناسب و مطابق با قوانین نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی، به مدت ۲ هفته موش‌های موردنظر در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند تا سازگاری ایجاد گردد و استرس در حیوانات از بین برود. در مدت زمان تیمار نیز موش‌ها در شرایط استاندارد نگهداری شدند و اصول کار آزمایشگاهی با حیوانات مطابق اصول کمیته ملی اخلاق حمایت از حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها بر اساس وزن به ۴ گروه تقسیم شدند یعنی میانگین وزنی در ۴ گروه برابر است: (۱). گروه کنترل (۲). گروه تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن/ روز) به شکل گاواژ (۳). گروه تیمار با ال کارنیتین (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/ روز) به شکل گاواژ (۴). گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین به شکل گاواژ (۱۲). تیمار در کلیه گروه‌ها ۳۵ روز انجام گرفت.

تشریح حیوانات: بعد از پایان یافتن مدت زمان تیمار یعنی ۳۵ روز، کل موش‌ها تشریح گردیدند. برای تشریح، موش‌ها با کتامین زایلازین (۱ میلی گرم کتامین و ۰/۱ میلی گرم زایلازین) بیهوش شدند. پس از آن ناحیه شکم موش با استفاده از وسایل جراحی، شکافته گردید. خون‌گیری از بطن راست قلب موش به طور مستقیم توسط یک سرنگ استریل انجام شد. بعد از آن به منظور جداسازی سرم خون به وسیله دستگاه سانتریفیوژ و به مدت زمان ۱۵ دقیقه و دور 13000RPM سانتریفیوژ گردیده و

سرم جدا شده جهت بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی به فریزر ۸۰- انتقال داده شد و نگهداری گردید. بعد از آن اسکروتوم باز شده و ناحیه دمی اپیدیدیم بیضه چپ را با قیچی استریل جدا کرده و به پلیت محتوی ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت (- cat no. H-1318-1) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده تا پس از گذشت مدت زمان ۵ دقیقه برای بررسی پارامترهای اسپرمی مورد استفاده قرار گیرد. اسمیرهایی از نمونه‌های اسپرم موش مطابق رنگ‌آمیزی اتوزین-نیگروزین تهیه گردید. به این منظور محلول نیگروزین ۱۰ درصد و اتوزین ۱ درصد در نرمال سالین تهیه شده و سپس ۲۰ میکرولیتر اتوزین و ۱۰ میکرولیتر اسپرم در میکروتیوپ ریخته و ترکیب شده و بعد از آن ۳۰ ثانیه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس ۳۰ میکرولیتر رنگ نیگروزین نیز به آن اضافه شد و بعد از آن اسمیر از نمونه اسپرم‌ها تهیه شدند. بیضه چپ جهت بررسی‌های استریولوژی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تعداد اسپرم: طبق دستورالعمل WHO شمارش اسپرم انجام گردید. سوسپانسیون اسپرمی شامل ۱۰۰ میکرولیتر از اسپرم محیط کشت و ۹۰۰ میکرولیتر از فیکساتیو اسپرمی تهیه شد. فیکساتیو اسپرمی از فرمالین ۳۵ درصد و بیکربنات سدیم تهیه گردید. برای انجام شمارش لام نئوبار مورد استفاده قرار گرفت. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرمی روی لام نئوبار ریخته شد. اسپرم‌های طبیعی شامل ناحیه سر، تنه و دم که در چهار گوشه مربع و مرکز مربع مرکزی وجود داشتند، توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 400× شمارش شدند. همچنین اسپرم‌هایی که با لبه سمت چپ و بالای مربع‌ها برخورد کرده بودند نیز شمارش شدند (۱۴، ۱۵).

ارزیابی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم: اسمیرهای تهیه شده از اتوزین- نیگروزین (در زمان تشریح تهیه شد) برای بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. با بزرگنمایی 1000× میکروسکوپ نوری و شمارش ۲۰۰ اسپرم، درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی گزارش شد. ناهنجاری‌های اسپرم در سر، گردن، زائده‌سیتوپلاسمی و دم مشاهده می‌شود (۱۵).

بررسی تحرک اسپرم: مطابق بر دستورالعمل WHO بررسی

تحرک اسپرم انجام گرفت. برای انجام این کار به مدت ۱۰ دقیقه، کل وسایل لازم شامل لام نئوبار و لامل و سمپلر در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون محیط کشت بر روی لام نئوبار ریخته شد و سپس با بزرگنمایی $\times 400$ میکروسکوپ نوری، تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. ۵ میدان دید به شکل اتفاقی انتخاب گردیده و ۲۰۰ اسپرم موش برای نشان دادن تحرک بررسی گردید و درصد اسپرم‌های دارای حرکت ساکن، غیرپیش‌رونده، پیش‌رونده محاسبه گردید. اسپرم‌های ساکن فاقد هر نوع حرکت هستند و اسپرم‌های پیش‌رونده به شکل فعال در یک مسیر خطی مستقیم یا دایره‌ای شکل بزرگ حرکت می‌کنند. اسپرم‌های غیرپیش‌رونده در یک مسیر دایره‌ای شکل کوچک حرکت نموده و فقط یک حرکت کوچک دارند و به سمت جلو حرکتی ندارند (۱۵).

ارزیابی قابلیت حیات اسپرم: برای بررسی سلامت غشای

هسته، حیات اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. اسمیرهایی که در زمان تشریح تهیه شدند مورد استفاده قرار گرفتند به این صورت که در بزرگنمایی $\times 1000$ میکروسکوپ نوری برای هر موش ۲۰۰ اسپرم شمارش گردید. اسپرم‌هایی که سر صورتی تیره داشتند، اسپرم مرده در نظر گرفته شدند زیرا با آسیب غشا هسته رنگ اتوزین توانایی نفوذ به سیتوپلاسم هسته را به دست آورده است اما اسپرم‌هایی با سر سفید رنگ، اسپرم زنده در نظر گرفته شدند زیرا به علت یکپارچه بودن غشا هسته و سالم بودن آن رنگ اتوزین اجازه ورود به سیتوپلاسم هسته را نداشته است. در پایان نتیجه شمارش به شکل درصد حیات یعنی اسپرم‌های زنده گزارش شد (۱۵).

بررسی‌های استریولوژیکی: جهت بررسی‌های

استریولوژیکی، پس از خارج کردن بیضه چپ از بدن و وزن نمودن آن، حجم بیضه به روش غوطه‌ورسازی محاسبه شد. پس از آن بافت بیضه در فیکساتیو تازه تهیه شده MDF (Modified Davidson Fluid) به مدت زمان ۷ روز فیکس گردیده شد و طی این مدت ۲ بار فیکساتیو عوض شد (۱۴).

فیکساتیو MDF از ترکیب ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۳۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷ درجه، ۱۵ میلی‌لیتر الکل مطلق و ۵ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال تهیه شد. پس از پایان یافتن مرحله تثبیت بافتی، برای برش‌گیری IUR از بافت بیضه، روش Orientator مورد استفاده قرار گرفت. بعد از آن با استفاده از دستگاه پاساژ، پاساژ بافتی انجام گردید. سپس از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شد و توسط دستگاه میکروتوم برش‌های ۵ و ۲۰ میکرونی از این بلوک‌ها تهیه گردید و بعد از آن با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین اسلایدها جهت بررسی استریولوژی آماده شد. برای محاسبه میزان چروکیدگی بافتی دو یا سه برش تروکار از برش‌های IUR قبل از پاساژ بافتی تهیه و شعاع آن‌ها اندازه گرفته شد. سپس بعد از مراحل پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی شعاع آن‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد و میزان چروکیدگی محاسبه گردید. برای محاسبه حجم کل بیضه، حجم بیضه در میزان چروکیدگی ضرب شد (۱۸-۱۶). برای محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی به‌طور میانگین ۵ میدان دید از هر اسلاید ۵ میکرونی با میکروسکوپ DP Olympus 12 و بزرگنمایی ۱۰۰ انتخاب شد و با قرار دادن بافت و نقاط برخورد کرده به لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی شمارش شد و بدین ترتیب چگالی حجمی هر یک برآورد شد. سپس با ضرب چگالی حجمی هر یک در حجم نهایی بیضه حجم هر یک محاسبه شد (۱۷).

بررسی‌های بیوشیمیایی: سرم خون از قلب موش تهیه و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و برای بررسی‌های بیوشیمیایی و اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید، سطح تستوسترون و ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام مورد استفاده قرار گرفت. **بررسی میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم:** ابتدا معرف واکنش شامل تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۵ درصد، تیوباریک‌اسید ۳۷۵ درصد و اسیدکلریدریک ۲۵ درصد تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سرم خون با ۲۰۰ میکرولیتر از معرف، مخلوط شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفتند. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از بن‌ماری، با آب سرد خنک شده و ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. بعد از آن مایع رویی

گرفتن سطح معنی‌داری $p < 0/05$ از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست آماری (test Tukey) جهت تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

در گروه ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل در وزن نهایی موش‌ها، کاهش وزن معناداری مشاهده شد ($p=0/03$). اما گروه تیمار با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل تغییر معناداری را نداشته است ($p=0/77$). وزن موش‌ها در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشته است ($P=0/96$). اختلاف معناداری در وزن بیضه چپ در بین ۴ گروه آزمایشی مشاهده نشده است ($p=0/19$) (جدول ۱).
تعداد اسپرم: در گروه نانوذرات نقره، میانگین تعداد اسپرم نسبت به گروه کنترل و گروه ال کارنیتین دارای کاهش معناداری شده است ($p=0/001$) گروه نانوذرات نقره و ال کارنیتین در برابر گروه نانوذرات نقره دارای افزایش معناداری شده است ($p=0/004$). گروه ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشته است ($P=0/99$) (جدول ۲).

حیات اسپرم: میانگین حیات اسپرم در گروه نانوذرات نقره در مقایسه با میانگین گروه کنترل و گروه ال کارنیتین کاهش معناداری را نشان داد ($p=0/001$). همچنین درصد حیات اسپرم در گروه تیمار همزمان نسبت به گروه نانوذرات نقره افزایش معناداری را نشان داد ($p=0/03$). در گروه ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد ($p=0/39$). در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشته است ($p=0/59$) (جدول ۲).

مورفولوژی طبیعی اسپرم: میزان مورفولوژی طبیعی در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل و ال کارنیتین کاهش معناداری داشته است ($p=0/001$). در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین در مقایسه با گروه نانوذرات نقره میزان مورفولوژی طبیعی افزایش معناداری داشته است ($p=0/001$) (جدول ۲).

تحرك اسپرم: درصد اسپرم‌های پیش‌رونده در گروه تیمار با نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل و ال کارنیتین کاهش

جدا گردیده و جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی که $10^6 \times 1/56$ می‌باشد محاسبه شد و بر حسب نانومول بر لیتر (nmol/l) گزارش شد (۱۹،۲۰).

بررسی میزان تستوسترون سرم خون: سنجش مقدار تستوسترون با روش الایزا و مطابق دستورالعمل کیت تهیه شده انجام شد.

CatNo.3725-300A.Accubind

ELISA.Monobind.USA

برای سنجش میزان تستوسترون سرم، ابتدا نمونه‌ها در چاهک ریخته شد و بعد از آن محلول تستوسترون و آنتی‌تستوسترون اضافه گردید و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از آن چاهک‌ها با آب دیونیزه شستشو شده و سوبسترا به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس محلول متوقف کننده اضافه گردید و واکنش متوقف شد و جذب آن با دستگاه الایزا در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید (۲۱).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام (Total Antioxidant capacity): با استفاده از کیت Naxifer™ Total Antioxidant capacity Assay Kit میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان بر اساس روش FRAP سنجیده شد. تغییر رنگ به‌دست آمده به‌وسیله میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری گردید و در نهایت برای به‌دست آوردن مقدار کمی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از استاندارد و نمودار حاصل استفاده گردد. ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه استاندارد تهیه شده در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس به همه خانه‌های حاوی نمونه و یا استاندارد، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار آماده شده اضافه گردید و سپس جذب نوری نمونه‌ها بعد از ۵ دقیقه در طول موج ۵۹۳ (بین ۵۷۰ تا ۶۳۰) نانومتر قرائت گردید (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا از آزمون آماری Smirnov-Kolmogorov و Wilk-Shapiro به منظور نرمال بودن داده‌ها و آزمون آماری Levene جهت برابری واریانس‌ها استفاده شد. در ادامه با در نظر

حجم کل بافت بیضه، لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی

حجم کل بیضه: حجم کل بافت بیضه در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معناداری را نشان نداد ($p=0/58$).

حجم لوله منی‌ساز: حجم لوله منی‌ساز هیچ تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد ($p=0/77$).

حجم بافت بینابینی: حجم بافت بینابینی در گروه نانوذرات نقره افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل داشت، همچنین حجم بافت بینابینی در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین کاهش معناداری در مقایسه با گروه نانوذرات نقره داشته است ($p=0/036$). حجم بافت بینابینی در گروه ال کارنیتین کاهش معناداری در مقایسه با گروه نانوذرات نقره داشته است ($p=0/005$). (جدول ۳).

بررسی‌های بیوشیمیایی

بررسی میزان مالون دی‌آلدئید: میزان مالون دی‌آلدئید در گروه نانوذرات نقره افزایش معناداری در مقابل گروه کنترل ($p=0/023$) و گروه ال کارنیتین ($p=0/018$) را نشان داد. گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین در مقایسه با گروه نانوذرات نقره کاهش معناداری داشته است و به گروه کنترل تقریباً نزدیک شده است ($p=0/01$). (جدول ۴).

بررسی میزان آنتی اکسیدان تام: ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC) در گروه نانوذرات نقره در برابر گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد ($p=0/001$). مقدار TAC در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین افزایش معناداری در برابر گروه نانوذرات نقره نشان می‌دهد ($p=0/001$). (جدول ۴).

بررسی میزان تستوسترون سرم خون: هورمون تستوسترون در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل ($p=0/006$) و گروه ال کارنیتین کاهش معناداری داشته است ($p=0/035$). در گروه تیمار همزمان نسبت به گروه نانوذرات نقره افزایش معناداری دیده می‌شود ($p=0/045$). (جدول ۴).

معناداری داشته است ($p=0/001$). در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین در صداسپرم‌های پیش‌رونده در مقایسه با گروه نانوذرات نقره افزایش معناداری داشته است ($p=0/001$) (جدول ۲). در گروه نانوذرات نقره میانگین اسپرم‌های بدون حرکت و ساکن در مقایسه با گروه‌های دیگر، افزایش معناداری را نشان داد ($p=0/001$). اسپرم‌های ساکن در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین در مقایسه با گروه نانوذرات نقره کاهش معناداری داشته است و به گروه کنترل نزدیک شده است ($p=0/001$) (جدول ۲). در گروه تیمار با ال کارنیتین درصد اسپرم‌ها با حرکت درجا در گروه ال کارنیتین در مقایسه با گروه نانوذرات نقره کاهش معناداری داشته است ($p=0/01$). ولی در مقایسه با گروه کنترل و گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین تفاوت معناداری مشاهده نشد ($p=0/68$) (جدول ۲).

بررسی‌های استریولوژیکی

بررسی کیفی هیستوپاتولوژیک بیضه: در گروه تیمار با نانوذرات نقره لوله‌های منی‌ساز کاهش یافته و بافت بینابینی دچار افزایش شده بود (علامت ستاره). اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز دچار ساختار نامنظم شده و پیوستگی خود را از دست داده‌اند همچنین ارتفاع اپیتلیوم‌زایی نیز کاهش را نشان داد (علامت فلش). اسپرم‌ها در لوله منی‌ساز نسبت به گروه کنترل و دیگر گروه‌ها کاهش داشته است. در گروه تیمار همزمان آثار تخریبی نانوذرات نقره توسط ال کارنیتین تقریباً اصلاح شده بود. لوله‌های منی‌ساز چیدمانی تقریباً مشابه گروه کنترل داشتند و حجم فضای بینابینی کاهش داشته است. اپیتلیوم زایی لوله‌های منی‌ساز از ساختار نرمال و طبیعی برخوردار بودند. در گروه ال کارنیتین لوله‌های منی‌ساز همانند گروه کنترل بوده و دچار آسیب یا تغییری نشده است (شکل ۱).

جدول ۱: بررسی اثر نانوذرات نقره (500 mg/kg.bw/d) و ال کارنیتین (100mg/kg.bw/d) در مدت ۳۵ روز بر روی میانگین وزن موش و وزن بیضه

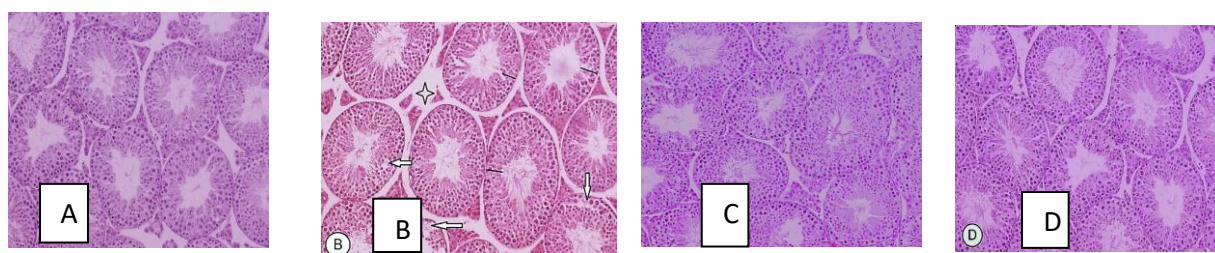
متغیرها	کنترل	نانوذرات نقره	ال کارنیتین	نانوذرات نقره و ال کارنیتین
تعداد موش‌ها	n=۶	n=۶	n=۶	n=۶
وزن اولیه بدن (گرم)	۳۲/۶۳±۲/۱ ^a	۳۲/۸۳±۱/۲۱ ^a	۳۳/۵۱±۱/۶۲ ^a	۳۲/۳۵±۱/۱۲ ^a
وزن ثانویه بدن (گرم)	۳۶/۲۶±۱/۵۴ ^a	۳۵/۴۱±۱/۵۳	۳۵/۵۳±۱/۸۵ ^b	۳۵/۸۶±۱/۷۷ ^a
وزن بیضه چپ (گرم)	۰/۱۱۹±۰/۰۰۵ ^a	۰/۱۱۳±۰/۰۰۴ ^a	۰/۱۲۰±۰/۰۰۶ ^a	۰/۱۱۴±۰/۰۰۴ ^a

داده‌های آماری به وسیله آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون‌های مقایسه‌ای Tukey test مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین نتایج به شکل $\text{mean} \pm \text{sd}$ ذکر شده است. تفاوت در میان گروه‌ها در سطح معناداری کمتر از $p < 0/05$ در نظر گرفته شده است. در هر ردیف حروف a,b,c معناداری در سطح $(p < 0/05)$ را نشان می‌دهد.

جدول ۲: بررسی اثر نانوذرات نقره (500 mg/kg.bw/d) و ال کارنیتین (100mg/kg.bw/d) به مدت ۳۵ روز بر روی پارامترهای اسپرم موش نژاد NMRI

پارامترهای اسپرم	کنترل	نانوذرات نقره	ال کارنیتین	نانوذرات نقره و ال کارنیتین
تعداد اسپرم (sperm count) (10 ⁶ /ml)	۱۱/۳۷±۱/۳۷ ^a	۶/۰۸±۰/۹۵ ^{b**}	۱۱/۵±۰/۹۷ ^a	۸/۶۲±۱/۱۳ ^c
حرکت پیش‌رونده (PR) (درصد)	۶۱/۲۷±۲/۶۵ ^a	۴۸/۷۰±۲/۶۵ ^{b**}	۹۶/۱۰±۲/۹۳ ^{c*}	۵۷/۹۵±۳/۹۷ ^a
حرکت غیرپیش‌رونده (NP) (درصد)	۲۱/۷۱±۳/۳۸ ^a	۲۲/۳۰±۲/۶۹	۱۶/۷۰±۲/۴۵ ^b	۲۱/۲۷±۱/۲۶ ^a
بدون حرکت (IM) (درصد)	۱۷/۰۱±۵/۴۰ ^{ab}	۲۸/۹۸±۳/۳۹ ^{c**}	۱۴/۰۷±۴/۲۴ ^a	۲۰/۹۳±۳/۶۲ ^b
قابلیت حیات اسپرم (درصد)	۷۲/۷۹±۷/۳۳ ^{ab}	۸۵/۱۶±۶/۸۹ ^{c**}	۷۶/۶۳±۲/۰۸ ^a	۶۷/۵۷±۴/۵۰ ^b
مورفولوژی طبیعی اسپرم (درصد)	۸۸/۷۵±۱/۸۶ ^a	۷۷/۶۹±۲/۹۷ ^{b**}	۸۹/۱۸±۱/۸۶ ^a	۸۴/۹۶±۱/۹۵ ^c

داده‌های آماری به وسیله آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون‌های مقایسه‌ای Tukey test مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین نتایج به شکل $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ذکر شده است. تفاوت در میان گروه‌ها در سطح معناداری کمتر از $p < 0/05$ در نظر گرفته شده است. در هر ردیف حروف a,b,c معناداری در سطح $(p < 0/05)$ را نشان می‌دهد.
* (یک ستاره) و ** (دو ستاره) به ترتیب نشانگر تفاوت معنی‌داری $p < 0/01$ و $p < 0/001$ است.



شکل ۱: تصویرهای میکروسکوپی از تاثیر نانوذرات نقره (500mg/kg.bw.d) و ال کارنیتین (100mg/kg.bw.d) بر روی بافت بیضه موش‌های NMRI به مدت ۳۵ روز.

(A). در گروه کنترل، لوله‌های منی‌ساز دارای ساختار منظم هستند و اپیتلیوم زایشی نیز مرتب است و در لومن تراکم اسپرم بالا است. (B). در گروه نانوذرات نقره، لوله‌های منی‌ساز آرایش نامنظم داشته و حجم فضای بینابینی افزایش یافته است (علامت ستاره) و ارتفاع اپیتلیوم زایشی کم شده است. (C). در گروه تیمار ال کارنیتین، لوله‌های منی‌ساز آرایش طبیعی دارند. (D). در گروه تیمار همزمان تقریباً لوله‌های منی‌ساز آرایش طبیعی و منظم دارند. تصاویر در ضخامت ۵ میکرون و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین تهیه گردیده است [بزرگنمایی $\times 200$].

جدول ۳: بررسی اثر نانوذرات نقره (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز) و ال کارنیتین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز) به مدت ۳۵ روز بر روی میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز، حجم بافت بینابینی (mm^3) در موش‌های NMRI

متغیرها	کنترل	نانوذرات نقره	ال کارنیتین	نانوذرات نقره و ال کارنیتین
حجم کل بیضه بیضه (mm^3)	$92/31 \pm 6/32^a$	$87/30 \pm 7/58^a$	$89/18 \pm 3/24^a$	$90/09 \pm 4/8^a$
حجم لوله‌های منی‌ساز (mm^3)	$80/49 \pm 5/7^a$	$74/59 \pm 8/1^a$	$77/04 \pm 4/7^a$	$78/82 \pm 4/3^a$
حجم بافت بینابینی (mm^3)	$10/88 \pm 0/84^a$	$12/65 \pm 0/30^b$	$10/52 \pm 1/40^a$	$10/35 \pm 1/23^a$

داده‌های آماری به وسیله آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون‌های مقایسه‌ای Tukey test مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین نتایج به شکل $\text{mean} \pm \text{sd}$ ذکر شده است. تفاوت در میان گروه‌ها در سطح معناداری کمتر از $0/05$ ($p < 0/05$) در نظر گرفته شده است. در هر ردیف حروف a.b.c معناداری در سطح $0/05$ ($p < 0/05$) را نشان می‌دهد.

* (یک ستاره) و ** (دو ستاره) به ترتیب نشانگر تفاوت معنی‌داری $p < 0/01$ و $p < 0/001$ است.

جدول ۴: بررسی اثر نانوذرات نقره (500 mg/kg.bw/d) و ال کارنیتین (100mg/kg.bw/d) به مدت ۳۵ روز بر روی میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو و میزان تستوسترون سرم در موش‌های نر نژاد NMRI

متغیرها	کنترل	نانوذرات نقره	ال کارنیتین	نانو ذرات نقره و ال کارنیتین
غلظت مالون‌دی‌آلدئید (nmol/l)	$3/36 \pm 0/66^a$	$5/12 \pm 1/15^b$	$2/64 \pm 1/32^a$	$3/30 \pm 0/43^a$
ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (μmol/l) TAC	$0/70 \pm 0/05^{ab}$	$0/30 \pm 0/02^{c**}$	$0/89 \pm 0/25^a$	$0/67 \pm 0/07^b$
تستوسترون سرم (ng/ml)	$1/25 \pm 0/31^a$	$0/31 \pm 0/025^{b*}$	$1/05 \pm 0/65^a$	$1/01 \pm 0/46^a$

داده‌های آماری به وسیله آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون‌های مقایسه‌ای Tukey test مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین نتایج به شکل $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ذکر شده است. تفاوت در میان گروه‌ها در سطح معناداری کمتر از $0/05$ ($p < 0/05$) در نظر گرفته شده است. در هر ردیف حروف a.b.c معناداری در سطح $0/05$ ($p < 0/05$) را نشان می‌دهد.

* (یک ستاره) و ** (دو ستاره) به ترتیب نشانگر تفاوت معنی‌داری $p < 0/01$ و $p < 0/001$ است.

بحث

در این پژوهش پارامترهای اسپرمی، وزن بیضه، وزن موش، حجم کل بیضه و حجم بافت بینابینی و حجم لوله‌های منی‌ساز، غلظت مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام و هورمون تستوسترون مورد بررسی قرار گرفتند. در این قسمت نتایج به دست آمده تفسیر می‌گردند. پارامترهای اسپرمی یعنی تعداد، تحرک، مورفولوژی طبیعی و قابلیت حیات اسپرم در گروه نانوذرات نقره کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. در تحقیقات shariat zadeh و همکارانش در سال ۲۰۲۱، بر روی ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI و تیمار با نانوذرات نقره در دوز 500 mg/kg/day و آلفالپوپویک‌اسید در

دوز 100mg/kg/day به مدت ۳۵ روز و تجویز به شکل دهانی نشان داد که در گروه نانوذرات نقره، اسپرم‌هایی با حرکت پیشرونده در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشته است. همچنین میانگین درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است. تعداد اسپرم نیز در گروه نانوذرات نقره در برابر گروه کنترل کاهش معناداری داشته است (۲۳). بر اساس تحقیقات Razi و همکاران وی در سال ۲۰۲۱، تیمار موش نر بالغ با نانوذرات نقره در ابعاد ۴۰ نانومتر و در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر و به صورت دهانی در مدت زمان ۵ هفته نشان داده شد گروهی که بالاترین دوز مصرفی را دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل

کاهش معناداری در تعداد اسپرم داشته‌اند. هم‌چنین با افزایش دوز مصرفی، درصد اسپرم‌هایی با حرکت پیشرونده سریع، کاهش معناداری نشان داد. با افزایش دوز مصرفی میزان اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی افزایش یافت. هم‌چنین با افزایش دوز نانوذرات نقره، قابلیت حیات نیز کاهش داشته است (۲۴). بنابراین نانوذرات نقره با تشدید استرس اکسیداتیو سبب کاهش کیفیت اسپرم می‌شود. برای بلوغ و ظرفیت یابی و تحرک اسپرم و هم‌چنین واکنش آکروزومی و اتصال به زوناپلاسیدا و تخمک، میزان نرمال رادیکال آزاد لازم است اما با ایجاد استرس اکسیداتیو سبب آسیب به اسپرم می‌شود. نانوذرات نقره با جمع شدن در اپیدیدیم از بلوغ اسپرم‌ها ممانعت کرده و بر روی تعداد اسپرم اثرگذار است (۲۵). در واقع ال کارنیتین با برداشتن گلوکز به وسیله سلول‌های سرتولی بر تحریک بلوغ اسپرم اثر می‌گذارد. ال کارنیتین میزان فاگوسیتوز گامت‌ها را کاهش داده و به این طریق تعداد اسپرم را افزایش می‌دهد. بالاترین میزان ال کارنیتین در اپیدیدیم است که در بلوغ و تحرک اسپرم‌ها نقش دارد. ال کارنیتین انتشار آنزیم‌های سلولی و اکسیژن مصرفی را مهار می‌کند و به این شکل قابلیت زنده ماندن سلول را افزایش می‌دهد. در حقیقت ذخیره آندروژنیک ال کارنیتین آزاد در اسپرم بالغ و انزال یافته ضمانتی برای قابلیت زنده ماندن اسپرم می‌باشد (۲۶). در این پژوهش حجم بافت بینابینی در گروه نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد اما حجم کل بیضه و لوله‌های منی‌ساز دچار تغییرات معناداری نشده است. در سال ۲۰۱۹، El-sharkawy و همکارانش نشان دادند که با تیمار نانوذرات نقره در ابعاد ۳۴-۹ نانومتر در طولانی‌مدت ۶ ماه به صورت ۲ بار در هفته بر روی موش‌های نر و با دوز ۵ و ۱۰ mg/kg.bw منجر به ایجاد تغییرات پاتولوژیک بیضه می‌شود. سلول‌های سرتولی واکوئله شده و آتروفی لوله‌های منی‌ساز را نشان داد. سلول‌های اسپرماتوگونی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی را داشته است. در سال ۲۰۲۰، mohamadi و همکارانش اثر مکمل ال کارنیتین در جیره جوجه خروس‌های نابالغ را مورد بررسی قرار دادند. به این شکل

که ۱۲ قطعه خروس را در مدت زمان ۲۲ هفته را با سطوح صفر و ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم ال کارنیتین در ۶ تکرار مورد بررسی قرار دادند. نشان داده شد که سلول‌های سرتولی به شکل معناداری افزایش داشته است. بنابراین بر میزان بافت بینابینی موثر است. شاخص اسپرماتوژنز به طور معناداری نیز افزایش یافته بود (۲۷). در واقع با کاهش سلول‌های جنسی توسط نانوذرات نقره، افزایش بافت بینابینی رخ می‌دهد. نانوذرات نقره سبب ایجاد استرس اکسیداتیو شده و به این روش سلول‌های جنسی را از بین می‌برد و سبب کاهش حجم اپی‌تلیوم زایشی می‌گردد. تاثیرات نانوذرات نقره به دوز مصرفی و مدت زمان تیمار و نوع تجویز و نوع حیوان وابسته است. در تجویز خوراکی جذب نانوذرات به کندی رخ می‌دهد و به این دلیل نتوانست در مدت زمان ۳۵ روز بر روی حجم بیضه و لوله‌های منی‌ساز تاثیری داشته باشد و حجم آن را کاهش نداد (۲۸). حجم بافت بینابینی در گروه تیمار هم‌زمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین، به سطح گروه کنترل نزدیک شده بود و در واقع ال کارنیتین توانسته بود با اثر آنتی‌اکسیدانی خود از ایجاد استرس اکسیداتیو جلوگیری کند و در نتیجه مانع از بین رفتن سلول‌های لیدینگ شود و به این طریق حجم بافت بینابینی در این گروه به سطح گروه کنترل رسیده بود. وزن موش‌های گروه ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل دچار کاهش شده است. در وزن موش‌های گروه نانوذرات نقره تفاوت معناداری نشان داده نشده است. در بین ۴ گروه، تفاوت معناداری در وزن بیضه مشاهده نشد. مطابق تحقیقات Shariatzadeh و همکارانش در سال ۲۰۲۰، تیمار موش‌های نر نژاد NMRI با نانوذرات نقره با ابعاد ۴۰ نانومتر و در دوز ۵۰۰ mg/kg/day در مدت زمان ۳۵ روز، در وزن موش‌ها پس از پایان دوره تیمار اختلاف معناداری مشاهده نشده است اما میانگین وزن بیضه در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد (۲۹). نانوذرات نقره سبب تغییر در وزن موش و بیضه نمی‌شود و تنها سبب ایجاد تغییر در عملکرد بیضه می‌شود. بنابراین می‌توان این گونه استدلال کرد که نانوذرات نقره در مدت زمان کوتاه بر عملکرد دستگاه گوارش اثرگذار نیست و به

ال کارنیتین و مونوسدیم گلوتامات، در هر دو دوز ال کارنیتین سبب کاهش قابل توجهی در سطح MDA نسبت به گروه مونوسدیم گلوتامات شده است (۳۱). بنابراین نانوذرات نقره با کاهش سیالیت غشا اسپرم و همچنین پارامترهای اسپرمی سبب تشدید اثرات پراکسیداتیوی در مایع سمینال می‌شود. در واقع نانوذرات نقره با ایجاد اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری‌ها و تحریک تولید ROS در بافت‌های متفاوت سبب پراکسیداسیون لیپیدی در غشا می‌گردد (۳۲). در این پژوهش در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین میزان مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه نانوذرات نقره کاهش داشته است و سطح مالون‌دی‌آلدئید به گروه کنترل رسیده است. ال کارنیتین با مداخله اسید آراشیدونیک تشکیل‌دهنده فسفولیپو و همچنین پروتئین کیناز باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۳). میزان TAC در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین نسبت به گروه نانوذرات نقره میزان TAC افزایش معناداری را نشان داد. مطابق تحقیقات Shariat zadeh و همکارانش در سال ۲۰۲۰، تیمار موش‌های نر نژاد NMRI با نانوذرات نقره در ابعاد ۴۰ نانومتر و در دوز ۵۰۰ mg/kg/day در مدت زمان ۳۵ روز، کاهش معناداری در ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل نشان داده شد (۲۹). مطابق تحقیقات koohpeyma و همکارانش در سال ۲۰۲۲، تجویز همزمان ال کارنیتین در دوز 200mg/kg.b.w و 100 و مونوسدیم گلوتامات در دوز 3g/kg بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ و به‌صورت تجویز خوراکی در مدت زمان ۶ ماه نشان داد که در گروه تیمار همزمان ال کارنیتین و مونوسدیم گلوتامات، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل دچار افزایش معنادار شد. در گروه تیمار با ال کارنیتین میزان آنتی‌اکسیدان در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته است اما از لحاظ آماری این افزایش معنادار نبوده است (۳۱). در واقع نانوذرات نقره تنش استرس اکسیداتیو را ایجاد کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های داخل بدن را کاهش می‌دهد. مطابق

این دلیل سبب ایجاد تغییر در وزن بدن و بیضه نمی‌شود (۲۵). در گروه ال کارنیتین کاهش وزن معنادار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شده اما بر وزن بیضه اثرگذار نبوده است. ال کارنیتین در وزن بیضه بی‌اثر بود اما به دلیل نقش ال کارنیتین در متابولیسم چربی‌ها سبب کاهش وزن در موش شده است. ال کارنیتین موجب کاهش تجمع لیپید در عضله شده و باعث کاهش درصد چربی بدن می‌گردد (۲۶). در این پژوهش نشان داده شد که میزان MDA در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافته است. در سال ۲۰۱۹، بر اساس تحقیقات El-sharkwy و همکارانش نشان داده شد که تیمار موش صحرایی نر با نانوذرات نقره در ابعاد ۳۴-۹ نانومتر و در دوزهای 5/36 mg/kg.bw و 13/4 mg/kg.bw و به‌صورت تجویز دهانی و در مدت زمان ۶ ماه، سبب افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه شده و میزان فعالیت SOD را کاهش داده است (۲۷). تحقیقات shariat zadeh و همکارانش در سال ۲۰۲۱، بر روی ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI و تیمار با نانوذرات نقره در دوز 500 mg/kg/day و آلفالیپویک‌اسید در دوز 100mg/kg/day به مدت ۳۵ روز و تجویز به شکل دهانی نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشته است (۲۳). Abdel-Emam و همکارانش در سال ۲۰۲۱، اثر درمانی ال کارنیتین بر ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار که تحت سمیت استات سرب بودند را مورد بررسی قرار دادند. دوز ال کارنیتین ۱۰۰ mg/kg بوده و به شکل تجویز دهانی و تیمار در مدت زمان ۴۰ روز انجام شد. نتیجه نشان داد در گروه تیمار همزمان میزان MDA در مقایسه با گروه تیمار با استات سرب کاهش یافته و میزان TAC افزایش یافته است (۳۰). بر اساس تحقیقات koohpeyma و همکارانش در سال ۲۰۲۲، تجویز همزمان ال کارنیتین در دوز 200mg/kg.b.w و 100 و مونوسدیم گلوتامات در دوز 3 g/kg به موش‌های صحرایی نر بالغ و به‌صورت تجویز خوراکی در مدت زمان ۶ ماه نشان داد که در گروه تیمار همزمان

نانوذرات نقره نشان داده شد. گروه ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداشته است. واقع ال کارنیتین با کاهش تخریب سلول‌های لیدیک می‌تواند سطح هورمون تستوسترون را افزایش دهد. پیشنهاد می‌شود مطالعات مولکولی تکمیل‌کننده صورت گیرد و همچنین تاثیر این دارو بر اعضای دیگر مانند کبد و کلیه و... انجام شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره در ابعاد کوچک ۲۰ نانومتر باعث القای استرس اکسیداتیو شده و در نتیجه مسمویت و اختلال در دستگاه تولیدمثلی نر را ایجاد می‌کند. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که نانوذرات نقره با کاهش کیفیت لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و همچنین ایجاد اختلال در فرایند اسپرماتوژنز در بیضه سبب آپاتوزیس سلول‌های لوله‌های منی‌ساز می‌گردند. همچنین اختلال در سطح هورمون جنسی تستوسترون دیده شد و در واقع کاهش داشته است. در کنار آسیب‌های وارد شده به بافت بیضه، پارامترهای اسپرم یعنی تعداد، تحرک، مورفولوژی و حیات اسپرم نیز دچار کاهش شده است. اما ال کارنیتین در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین، اثرات سمی ناشی از نانوذرات نقره را بهبود بخشیده و ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام را دچار افزایش نموده است. بنابراین از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری نمود. پس باید گفت که ال کارنیتین مانع آسیب‌های بافت بیضه شده و از تغییرات آن جلوگیری کرد. در واقع ال کارنیتین با ایجاد تعادل در سطح هورمون تستوسترون، پارامترهای اسپرمی را در برابر سمیت ناشی از نانوذرات نقره بهبود بخشید.

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی بوده است. از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق ما را یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

حامی مالی: معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک

تعارض در منافع: وجود ندارد.

پژوهش حاضر، در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره+ال کارنیتین در مقایسه با گروه نانوذرات نقره، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل افزایش معناداری را نشان داد. در واقع ال کارنیتین با حذف یون‌های آهن و رادیکال‌های آزاد سبب افزایش میزان آنتی‌اکسیدان کل می‌شود. همچنین با افزایش ATP فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در سلول بهبود می‌بخشد (۲۹). در این پژوهش، هورمون تستوسترون در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معناداری گردید. Olugbodi و همکارانش در سال ۲۰۲۰، اثر نانوذرات نقره را بر روی هورمون‌های جنسی و پارامترهای اسپرمی در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار دادند. به این ترتیب ۳۰ سر موش در مدت زمان ۲۸ روز به صورت پوستی نانوذرات نقره را در دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دریافت کردند. نتیجه نشان داد که هورمون تستوسترون در موش‌های دریافت‌کننده نانوذرات نقره متناسب با دوز دریافتی، نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است (۳۴). طبق تحقیقات koohepeyma و همکارانش در سال ۲۰۲۲، تجویز همزمان ال کارنیتین در دوز ۲۰۰ و ۲۰۰ mg/kg.b.w و همچنین مونسدیم گلوتامات در دوز ۳ g/kg به موش‌های صحرایی نر بالغ و به شکل تجویز خوراکی در مدت زمان ۶ ماه نشان داد که در گروه تیمار همزمان ال کارنیتین و مونسدیم گلوتامات در هر دو دوز، ال کارنیتین سبب افزایش تستوسترون به شکل معنادار نسبت به گروه مونسدیم گلوتامات شده است و گروه ال کارنیتین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشته است (۳۱). در واقع نانوذرات نقره بر روی بیان ژن Star موثر می‌باشد، این پروتئین در منتقل کردن کلسترول به غشا داخل میتوکندری و همچنین افزایش دادن استروئیدسازی موثر است. بنابراین این احتمال وجود دارد که نانوذرات نقره با کاهش دادن بیان این ژن از انتقال کلسترول به غشا داخلی میتوکندری ممانعت کرده و در نتیجه از تبدیل شدن کلسترول به پرگنولون جلوگیری کرده و به این ترتیب میزان تستوسترون کاهش می‌یابد (۳۵). در این پژوهش در گروه تیمار همزمان نانوذرات نقره و ال کارنیتین افزایش معنادار تستوسترون نسبت به گروه

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه اراک تایید شده است (کد اخلاق: IR.ARAKU.REC.1401.128).

مشارکت نویسندگان

دکتر سید محمدعلی شریعت‌زاده در ارائه ایده، دکتر سید محمدعلی شریعت‌زاده، سمیرا مقدسی، مهدیه عمادی در

طراحی مطالعه، دکتر سید محمدعلی شریعت‌زاده، سمیرا مقدسی، مهدیه عمادی در جمع‌آوری داده‌ها، سمیرا مقدسی، مهدیه عمادی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

References:

- 1-Pathak UI, Gabrielsen JS, Lipshultz LI. *Cutting-Edge Evaluation of Male Infertility*. Urol Clin North Am. 2020; 47(2): 129-38.
- 2-Bhasin S, de Kretser DM, Baker HW. *Clinical Review Pathophysiology and Natural History of Male Infertility*. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79(6): 1525-9.
- 3-Spira A, Multigner L. *The Effect of Industrial and Agricultural Pollution on Human Spermatogenesis*. Hum Reprod 1998; 13(8): 2041-2.
- 4-Petrelli G, Mantovani A. *Environmental Risk Factors and Male Fertility and Reproduction*. Contraception 2002; 65: 297-300.
- 5-Buzea C, Pacheco I, Robbie K. *Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity*. Biointerphases 2007; 2(4): MR17-71.
- 6-Gibbons B, Warner L. *The Role of Antimicrobial Silver Nanotechnology*. Medical Device and Diagnostic Industry Magazine 2005; 25: 164-9.
- 7-Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. *An Evidence-Based Environmental perspective of Manufactured Silver Nanoparticle in Syntheses and Applications a Systematic Review and Critical Appraisal of Peer-Reviewed Scientific Papers*. Sci Total Environ 2010; 408(5): 999-1006.
- 8-Morishita Y, Yoshioka Y, Satoh H, Nojiri N, Nagano K, Abe Y, et al. *Distribution and Histologic Effects of Intravenously Administered Amorphous Nanosilica Particles in the Testes of Mice*. Biochem Biophys Res Commun 2012; 420(2): 297-301.
- 9-Sudhahar V, Fukai T. *Antioxidant Supplementation and Therapies*. In: Tsukahara H, Kaneko K (eds). *Studies on Pediatric Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Springer, New York; 2014: 183-209.
- 10- Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. *Oxidative Stress on Mouse Embryo Development in Vitro*. Free Radic Biol Med 1992; 13(1): 47-53.
- 11- Lenzi A, Sgrò P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F. *A Placebo-Controlled Doubleblind Randomized Trial of The Use of Combined Lcarnitine and L-Acetyl-Carnitine Treatment in Men with Asthenozoospermia*. Fertil Steril 2004; 81(6): 1578-84.

- 12- Neuman SL, Lin TL, Heste PY. *The Effect of Dietary Carnitine on Semen Traits of White Leghorn Roosters*. Poult Sci 2002; 81(4): 495-503.
- 13- Palmero S, Bottazzi C, Costa M, Leone M, Fugassa E. *Metabolic Effects of L-Carnitine on Prepubertal Rat Sertoli Cells*. Horm Metab Res 2000; 32(3): 87-90.
- 14- Lafuente D, Garcia T, Blanco J, Sánchez D, Sirvent J, Domingo J. *Effects of Oral Exposure to Silver Nanoparticles on the Sperm of Rats*. Reprod Toxicol 2016; 60: 133-9.
- 15- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. *Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid*. Toxicol path 2002; 30(4): 524-33.
- 16- Wick MR. *The Hematoxylin and Eosin Stain in Anatomic Pathology—An Often-Neglected Focus of Quality Assurance in the Laboratory*. Semin Diagn Pathol 2019; 36(5): 303-11.
- 17- Bancroft JD, Layton C. *The Hematoxylin and Eosin*. Edighth edition 2019: 1-573.
- 18- Noorafshan AJAoA-AA. *Stereology As a Valuable Tool in the Toolbox of Testicular Research*. Ann Anat 2012; 16: 57-66.
- 19- Buege JA, Aust SD. *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol 1978; 52: 302-10.
- 20- Esterbauer H, Cheeseman KH. *Determination of aldehydic lipid peroxidation product; Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods Enzymol 1990; 186: 407-21.
- 21- Saremi A, Changizi Ashtiani S, Kalantari A. *The Combination of Vitamin E Supplementation and Intensive Exercise on Testicular Oxidative Stress and Spermatogenesis in Male Rats*. Sport Physiology 2014; 6(23): 43-54.
- 22- Cömert ED, Gökmen V. *Evolution of Food Antioxidants as A Core Topic of Food Science for A Century*. Food Res Int 2018; 10: 576-93.
- 23- Benzie IF, Strain JJ. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power the FRAP Assay*. Anal Biochem 1996; 239: 70-6.
- 24- Shariatzadeh M, Soleimani Mehranjani, Solgi F, Maleki P. *Stereological Study of te Protective Effect of Alpha Lipoic Acid on the Testis after Treatement with Silver Nanoparticles in the Nmri Mouse*. Studies in Medical Sciences 2021; 31(12): 944-55. [persian]
- 25- Razi A, Talebi AR, Poorrajab F, Rezaie Zarchi S, Razavi Sheshdeh SAR, Shahmoradi Razi HR. *Effects of Silver Nanoparticles on Sperm Parmeters and Reactive Oxygen Species in the Mouse Serum and Seminal Fluid*. Cell & tissue 2015; 5(4): 393-400. [persian]
- 26- Ema M, Okuda H, Gamo M, Honda K. *A Review of Reproductive and Developmental Toxicity of Silver Nanoparticles in Laboratory Animals*. Reprod Toxicol 2017; 67: 149-64.
- 27- Zare Z, Eimani H, Mohammadi M, Mofid M, Dashtnavard H. *The Effect of Orally Administered Lcarnitine on Testis Tissue Sperm Parameters and Daily Spermproduction in Adult Mice*. Yakhteh medical 2010; 11(4): 382-89. [persian]

- 28- Elsharkawy EE, Abd El-Nasser M, Kamaly HF. *Silver Nanoparticles Testicular Toxicity in Rat*. Environ Toxicol Pharmacol 2019; 70: 103194.
- 29- Zhang X-F, Choi Y-J, Han JW, Kim E, Park JH, Gurunathan S. *Differential Nanoreprotoxicity of Silver Nanoparticles in Male Somatic Cells and Spermatogonial Stem Cells*. Int J Nanomedicine 2015; 10: 1335.
- 30- SHariatzadeh SMA, CHERghi E, Bakhshi MR. *The Study of Protective Effect of Royal Jelly on the Testis Tissue after Silver Nanoparticles-Induced Toxicity in the NMRI Mice*. Feyz 2020; 24: 282-92. [persian]
- 31- Abdel-Emam R, Esraa A. *Ameliorative Effect of L-Carnitine on Chronic Lead-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats*. Veterinar Medicine and Science 2021; 7: 1426-35.
- 32- Koohpeyma F, Gholizadeh F, Hafezi H, Hajiaghau M, Siri M, Allahyari SH, et al. *The Protective Effect of Lcarnitine on Tesosterone Synthesis Pathway and Spermatogenesis in Monosodium Glutamate Induced Rats*. BMC Complement Med Ther 2022; 22: 269. [persian]
- 33- Moghanlo H, Shariatzadeh SMA. *Beneficial Effects of Spirulina Platensis on Mice Testis Damaged by Silver Nanoparticle*. Andrologia 2022; 54(11): e14606.
- 34- Kiani M, Parto P. *Protective Effect of Lcarnitine on the Sperm Parameters of Adult Mice Treated with Ciprofloxacin*. J Ardabil Univ Med Sci 2018; 17: 392-401.
- 35- Olugbodi J, David O, Oketa E, Lawal B, Okoli B, Mtunzi F. *Silver Nanoparticles Stimulates Spermatogenesis Impairments and Hematological Alterations in Testis and Epididymis of Male Rats*. J Molocules 2020; 28: 2-16

Study of the Stereological and Biochemical Effects of L-Carnitine on Testicular Tissue after Toxicity Induction by Silver Nanoparticles in Mice

Seyed Mohammad Ali Shariat Zadeh^{*1}, Mahdiah Emadi¹, Samira Moghadasi¹

Original Article

Introduction: This study aimed to examine how L-carnitine's antioxidant properties could counteract the oxidative stress caused by silver nanoparticles, specifically looking at their harmful effects on rat testicular tissue.

Methods: In this experimental study involved 24 adult male NMRI mice that weighed 32 ± 2 grams each. They were divided into 4 groups of 6 mice in each group. The groups were as followed: a control group, silver nanoparticles group (500 mg/body weight/day), L-carnitine group (100 mg/kg body weight/day), and silver nanoparticles and L-carnitine treatment group. Following 35 days of treatment administered via gavage, the mice were dissected, serum and sperm samples were prepared. Body and testicular weight, motility, sperm count, sperm viability and morphology, testosterone levels, and total antioxidant capacity and malondialdehyde levels were evaluated. Histopathological examination of the testicles was performed using hematoxylin-eosin staining. The number of spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli cells was also reported. Finally, the significance level was considered $p < 0.05$ and analyzed using one-way SPSS-ANoVA and Tukey statistical tests.

Results: Silver nanoparticles had no effect on the weight of the mice and exhibited no significant change ($p > 0.05$). The L-carnitine-treated group showed a notable decrease in weight compared to the control group ($p < 0.05$). Sperm parameters in the silver nanoparticles group showed a significant decrease compared to the control group ($p < 0.05$). The total testicular volume and seminiferous tubule volume did not show significant differences in the experimental groups ($p > 0.05$). The volume of interstitial tissue in the silver nanoparticles group significantly increased compared to the control group, while a significant decrease was observed in the silver nanoparticles and L-carnitine simultaneous treatment group compared to the silver nanoparticles group ($p < 0.05$).

Conclusion: L-carnitine, as a natural antioxidant, prevented damage to the male reproductive system and testicular tissue induced by silver nanoparticles by reducing oxidative stress.

Keywords: silver nanoparticles, carnitine, oxidative stress, stereology, testis

Citation: Shariat Zadeh S.M, Emadi M, Moghadasi S. **Study of the Stereological and Biochemical Effects of L-Carnitine on Testicular Tissue after Toxicity Induction by Silver Nanoparticles in Mice.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2025; 33(9): 9386-9400.

¹Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09181629026, email: s-shariatzadeh@araku.ac.ir