(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

اثرات نانوذرات نقره بر خصوصیات کمی و کیفی اسپرم بلدرچین ژاپنی

- **سعید تقی‌پور**: گروه علوم دامی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران
- **رضا وکیلی***: گروه علوم دامی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران

تاریخ دریافت: آبان ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: بهمن ١٣٩٨

چکیده

در تحقیق حاضر اثرات نانوذرات نقره بر خصوصیات کمی و کیفی اسپرم در بلدرچین ژاپنی بررسی گردید. اسپرم در سوسپانسیون حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۷۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ قسمت در میلیون نانوذرات نقره رقیق شد. زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین تعیین شد. سلامت آکروزوم اسپرم بعد از ٤٠ دقیقه تیمار با نانوذرات نقره در دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد با محلول فرمالین- سیترات ارزیابی شدند. غظت اسپرم، جنبایی و جنبایی پیش‌رونده اسپرم اندازه‌گیری گردیدند. افزودن نانوذرات نقره به منی بلدرچین در سطوح ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ قسمت در میلیون درصد جنبایی و جنبایی پیش‌رونده اسپرم را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. زنده‌مانی اسپرم در سطح ۰/۱۲۵ قسمت در میلیون کاهش یافت (P<۰/۰۱). سلامت آکروزوم در تیمار ۰/۱۲۵ نانوذرات نقره کاهش یافت (P<۰/۰۵). در تیمارهای حاوی ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ قسمت در میلیون، درصد اسپرم با آکروزوم سا لم (P<۰/۰۵) در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). ممکن است نانوذرات قادر به تخریب غشای آکروزومی باشند. نتایج این تحقیق نشان می دهدکه نانوذرات نقره با تأثیر بر عملکرد اسپرم ممکن است اثرات سمی روی اسپرم داشته باشند و سبب مرگ اسپرم شوند.

کلمات کلیدی: نانوتکنولوژی، نانوذرات نقره، اسپرم، بلدرچین ژاپنی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rezavakili2010@yahoo.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

مقدمه

نانوتکنولوژی به‌عنوان یکی از تکنولوژی‌های کلیدی قرن ۲۱ در نظر گرفته می‌شود و انقلابی را در جهان نوید می‌دهد. نانومواد به‌دلیل خصوصیات منحصر به فرد، جذابیت قابل توجهی در علوم بیوتکنولوژی و علوم زیستی دارند. یکی از نانومواد مهم که خصوصیات ضدباکتریائی دارد، نانوذرات نقره است. نانوذرات نقره برای کاربردهای زیست پزشکی می‌تواند مفید باشد. سمیت سلولی نانوذرات روی سلول‌های زایشی (germ cells) نگرانی‌های عمیقی در مورد ایمنی زیستی نانومواد ایجاد کرده است. تعداد زیادی از مطالعات برون‌تنی نشان‌داده‌اند که نانوذرات نقره برای سلول‌های پستانداران مشتق از پوست (Arora و همکاران، ۲۰۱۱؛ Hsin و همکاران، ۲۰۰۸؛ Larese و همکاران، ۲۰۰۹؛ Samberg و همکاران، ۲۰۱۰)، کبد (Hussain و همکاران، ۲۰۱۰؛ Park و همکاران، ۲۰۱۰)، کلیه (Gopinath و همکاران، ۲۰۱۰)، شش (Carlson و همکاران، ۲۰۰۸)، مغز (Rahman و همکاران، ۲۰۰۹)، سیستم عروقی (AshaRani و همکاران، ۲۰۰۹) و اندام‌های تولیدمثلی (Ahamed و همکاران، ۲۰۰۸؛ Asare و همکاران، ۲۰۱۱؛ Braydich-Stolle و همکاران، ۲۰۰۵؛ Kadar و همکاران، ۱۹۹۵؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۹) سمی هستند. مطالعات کمی به رسوب نانو ذرات در اندام‌های تولیدمثلی توجه کرده‌اند و تعداد کم‌تری اثرات منفی بالقوه نانو ذرات بر سلول‌های زاینده را ارزیابی کرده‌اند. نانوذرات نقره از طریق محصولات مصرفی متنوعی مانند دستگاه‌های پیشگیری از بارداری و وسائل بهداشتی مادران وارد اسپرم انسان شده که می‌توانند منجر به مشکلات باروری شوند. ترکیباتی که عملکرد تولیدمثلی را به خطر می‌اندازند در بحث سلامت عمومی اهمیت بسیار زیادی دارند. کاهش تقریباً ۲ درصدی کیفیت منی در سال در طی ۵۰ سال اخیر در کشورهای صنعتی گزارش شده است. قرار گرفتن در معرض مواد شیمیائی مختلف دلیل اصلی این کاهش معرفی شده است. برای مثال یک نماتدکش به‌نام دی‌بروموکلروپروپان با تخریب اسپرماتوگونی‌های تمایز نیافته منجر به کاهش شمار اسپرم انسان می‌شود (Braydich-Stolle و همکاران، ۲۰۰۵). باید توجه داشت که در حال حاضر محصولات جدید نانو بدون ارزیابی سم‌زائی آن‌ها استفاده می‌شوند. بنابراین درک دقیق مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی نانوذرات که منجر به سمیت در سیستم تولیدمثلی می‌شوند ضروری است. در آینده انتظار می‌رود، اثرات زیست‌محیطی نانومواد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد و رفتار نانومواد در داخل سلول‌ها هنوز یک معما است (Taylor و همکاران، ۲۰۱۲). بلدرچین یک مدل حیوانی مناسب برای آزمایشات ژنتیکی، اندوکرینولوژی، جنین‌شناسی، فیزیولوژی و تغذیه است. آسان بودن نگه‌داری، هزینه‌های خوراکی کم‌تر، دوره انکوباسیون کوتاه و بازده سریع تولیدمثلی دلیل این انتخاب است (Chelmonska و همکاران، ۲۰۰۸). این پرنده اخیراً به‌دلیل رشد سریع‌تر، فاصله نسلی کوتاه و میزان بالای تولید تخم به‌عنوان یک مدل برجسته در تحقیقات بیوشیمیایی و سمیت‌شناسی شناخته شده است (Shit و همکاران، ۲۰۱۰) و اغلب به‌عنوان مدل حیوانی برای تست‌های سمیت شناسی پرندگان در ایالات متحده، اروپا و آسیا استفاده می‌شود (Quinn و همکاران، ۲۰۰۷). به‌علاوه، کاربرد نانوذرات نقره به‌عنوان عامل ضدعفونی کننده قوی در مزارع پرورش حیوانات اخیراً رایج شده است. هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات نانوذرات نقره برخصوصیات کمی و کیفی اسپرم بلدرچین در شرایط آزمایشگاهی و تعیین سطوح سمی این نانو ذرات بود.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این آزمایش، تعداد ۱۰۰ قطعه بلدرچین نر از یک مزرعه تجاری پرورش بلدرچین ژاپنی انتخاب شده و به‌صورت جداگانه پرورش یافتند. جیره با انرژی ۳۰۵۰ کیلو کالری و ۲۲٪ پروتئین به همراه آب در اختیار بلدرچین‌ها قرار گرفت. در طول دوره پرورش که از ۲۲تا ۳۰ هفتگی به‌طول انجامید دسترسی پرندگان به آب و خوراک آزاد بوده و مراقبت‌های لازم حتی‌الامکان منطبق با روش‌های توصیه شده تجاری به‌عمل آمدند. مواد مغذی جیره براساس احتیاجات مواد مغذی بلدرچین ژاپنی ارائه شده در منابع علمی درنظر گرفته شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل چهار تیمار با سه تکرار برای صفات کیفی اسپرم در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. آزمایش برون‌تنی و تیمارها عبارت بودند از: ۱- سوسپانسیون اسپرم به‌عنوان شاهد، ۲- سوسپانسیون اسپرم حاوی ۰/۰۷۵ قسمت درمیلیون نانو ذرات نقره، ۳- سوسپانسیون اسپرم‌حاوی ۰/۱۲۵ قسمت درمیلیون نانو ذرات نقره، ۴-سوسپانسیون اسپرم حاوی ۰/۲۵۰ قسمت درمیلیون نانو ذرات نقره. غلظت اسپرم در سوسپانسیون $۱۰^{۶} \times ۵/۵$-۴ اسپرم درنظر گرفته شد. نانوذرات نقره از تولیدات شرکت نانونصب پارس با نام تجاری نانوسید مورد استفاده قرار گرفت. این ماده به‌صورت کلوئیددر آب بوده و ماده حامل نانوذرات نقره در این محصول آب مقطر می‌باشد. غلظت نانو ذرات نقره ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و اندازه ذرات در این محصول به‌طور میانگین ۵۰ نانومتر است.

تهیه اسپرم: به‌دلیل عدم موفقیت در اخذ اسپرم با استفاده از تکنیک ماشاژ شکمی و یا با استفاده از تیزر، تصمیم بر آن شد تا اسپرم‌ها از وازدفرنس استخراج شوند (Jamieson، ۲۰۱۱). برای تهیه اسپرم، از هر تکرار یک بلدرچین که به‌میانگین گروه نزدیک بود انتخاب و برای تهیه اسپرم از وازدفرنس، بلدرچین‌ها کشتار شدند. بلافاصله،

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

لاشه از ناحیه کمر باز شده و وازدفرنس با استفاده از پنس جدا شد. برای خروج اسپرم، وازدفرنس به‌آرامی با استفاده از تیغ جراحی خراش داده شده و در میکروتیوب حاوی سوسپانسیون گذاشته شد. سپس مخلوط کردن مایع منی تکرارهای هر تیمار انجام شد. پس از آن، وازدفرنس خارج شده و دور انداخته شد.

تعیین غلظت اسپرم: معمولاً بلدرچین‌های نری که انزال با حجم پایین تولید می‌کنند غلظت اسپرم بالاتری دارند (Chelmonska و همکاران، ۲۰۰۸). حجم اسپرم بلدرچین ژاپنی بسیار کم است در عوض غلظت اسپرم بسیار بالائی دارد. حجم انزال جمع‌آوری شده از بلدرچین ژاپنی در میان همه گونه‌های پرندگان کم‌ترین مقدار است (Chelmonska و همکاران، ۲۰۰۸). تعیین حجم دقیق مایع منی خیلی مهم است زیرا محاسبه تعداد کل اسپرم‌ها وابسته به آن است. با توجه به این‌که امکان اندازه‌گیری حجم مایع منی بلدرچین‌ها در آزمایشگاه وجود نداشت، براساس منابع، حداقل حجم ۱۰ ماکرولیتر درنظر گرفته شد و با توجه به آن غلظت اسپرم با استفاده از لام هموسیتومتر تعیین شد. مقدار غلظت اسپرم در بین نمونه‌های اندازه‌گیری شده از $۰/۷۷۴\times۱۰^{۹}$ تا $۱/۲۲\times۱۰^{۹}$ متغیر بود. نمونه‌ها را به نسبت ۱:۲۱۵ با محلول رینگر رقیق شده، سپس یک قطره منی روی لام هموسیتومتر انتقال داده شد. ۵ دقیقه صبر کرده تا اسپرم‌ها ته‌نشین شوند. سپس اسپرم‌ها در ۵ مربع بزرگ (که هرکدام شامل ۱۶ مربع کوچک است) شمارش شدند. غلظت نهائی اسپرم در هر میلی‌لیتر منی براساس فرمول لام هماسیتومتر محاسبه گردید. در نهایت غلظت اسپرم برای این واکنش در $۵/۵\times۱۰^{۶}$ اسپرم مطلوب فرض شده است (Birkhead و همکاران، ۱۹۹۴).

جنبایی و جنبایی پیش‌رونده: جنبایی، پیش‌روندگی و ویژگی‌های حرکتی برای تمام نمونه‌ها به کمک سیستم برآورد آنالیز رایانه‌ای (CASA) (Computer Assisted System Analyzer) محصول شرکت ویدئو تست (VideoTesT, ltd) ساخت کشور روسیه با نام تجاری ویدئو تست اسپرم ۲.۱ (VideoTesT-Sperm 2.1) براساس شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم با مشخصات پی‌آیند یک ساعت پس از رقیق‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات سیستم عبارتند از: تعداد فریم: ۵۰، حداقل کنتراست: ۷، حداقل اندازه سلول: ۶، آستانه راستی: ۶۰، میانه برش سرعت در مسیر میانگین: ۶۰، کم‌ترین برش سرعت در مسیر میانگین: ۲۵، کم‌ترین برش میانگین مسیر راست: ۱۰، اندازه سر در اسپرم بدون جنبایی: ۱۷، بیشینه اندازه سر در اسپرم بدون جنبایی: ۷۰، درشت‌نمایی: ۱/۹۵، محدوده اندازه ساکن: ۲/۴۷-۰/۴۶، بیشینه اندازه ساکن: ۱/۲۸ و محدوده درازی ساکن: ۶۰-۵.

تعیین درصد زنده‌مانی و سلامت آکروزوم: رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین برای ارزیابی هر دو تمامیت غشا و مورفولوژی اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش بر پایه نفوذپذیری غشای اسپرم مرده است که سر آن‌ها رنگ صورتی (ائوزینوفیلیک) می‌گیرد. رنگ ائوزین-نیگروزین با حل کردن ۱/۶ گرم ائوزین و ۶ گرم نیگروزین در ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده رینگر تهیه و با استفاده از فیلتر صاف شد (El-Genda و همکاران، ۲۰۰۷). برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون، ۴۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم از هر تیمار به ۱۵۰ ماکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی اضافه شده و روی یک اسلاید قرار داده شد. پس از دو دقیقه هم زدن، اسمیرها مطابق نگاره ۱ تهیه شدند. در هر اسمیر ۳۰۰ اسپرم تحت روغن ایمرسیون (×۱۰۰) مشاهده شدند. اسپرم‌های زنده رنگ نگرفته‌اند، در حالی‌که اسپرم‌های رنگ گرفته یا به‌طور جزئی رنگ گرفته به‌عنوان مرده شمارش شدند (Chelmonska و همکاران، ۲۰۰۸).

شکل ۱: نحوه تهیه گسترش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین

سلامت آکروزوم اسپرم توسط رنگ فرمالین-سیترات ارزیابی شد. ۱۰ میکرولیتر نمونه اسپرم و ۱۰ میکرولیتر رنگ را بر روی لام قرار داده و پس از ۳۰ ثانیه، وضعیت آکروزوم تعداد ۱۰۰ سلول اسپرم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰x مورد ارزیابی قرار گرفت (Jamieson، ۲۰۱۱).

پس از ثبت و مرتب‌سازی داده‌ها در برنامه اکسل، آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و طبق رویه GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و براساس مدل آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند:

$$Y_{ij}= \mu + T_j + \varepsilon_{ij}$$

که Y_{ij}= مقدار هر یک از مشاهدات، μ= میانگین جامعه، T_j= اثر تیمارها و ε_{ij}= خطای آزمایشی است.

نتایج

صفات کمی اسپرم: اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات کمی اسپرم در جدول ۱ ارائه شده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت اسپرم معنی‌داری نشد ($P>۰/۰۵$). درصد جنبایی به‌طور معنی‌داری توسط گروه‌های آزمایشی تحت تاثیر قرار گرفته بود به‌طوری که تیمارهای حاوی ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات نقره، درصد جنبایی را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای شاهد و تیمار حاوی ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات نقره، کاهش داد ($P<۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری بین تیمار حاوی ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

نقره و تیمار شاهد از لحاظ درصد جنبایی وجود نداشت (P>۰/۰۵). تیمار حاوی ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره پایین‌ترین درصد جنبایی پیش‌رونده را داشته و تفاوت آن با تیمار شاهد و تیمار ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). گروه مکمل شده با ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات نقره نیز نسبت به تیمار شاهد جنبایی پیش‌رونده را به‌طور معنی‌داری کاهش داده بود (P<۰/۰۵)، با این وجود با تیمار ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). هم‌چنین تیمار ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات نقره نسبت به دوز ۰/۱۲۵ جنبایی پیش‌رونده بهتری از نظر عددی داشت ولی معنی‌دار نبود.

جدول۱: اثرات سطوح مختلف نانوذرات نقره برخصوصیات کمی اسپرم بلدرچین ژاپنی

گروه‌های آزمایشی	غلظت اسپرم پس از اعمال تیمار (۱۰^۶/ml)	جنبایی (٪)	جنبایی پیش رونده (٪)
شاهد	۲/۹۸	۶۸/۶۷^{a}	۶۵/۸۸^{a}
۰/۰۷۵ قسمت در میلیون	۲/۹۸	۶۸/۰۴^{a}	۶۲/۳۶^{ab}
۰/۱۲۵ قسمت در میلیون	۳/۰۱	۶۰/۰۵^{b}	۵۲/۶۰^{c}
۰/۲۵۰ قسمت در میلیون	۳/۲۰	۵۹/۰۷^{b}	۵۵/۴۲^{bc}
خطای معیار	۰/۰۶۰	۱/۳۹۷	۱/۶۳۶
سطح احتمال	۰/۵۲۲	۰/۰۰۶	۰/۰۰۴

a, b و c حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

خصوصیات کیفی اسپرم: در جدول ۲ اثر تیمارهای مختلف آزمایشی بر خصوصیات کیفی اسپرم نشان داده است. افزودن نانوذرات نقره در سطوح ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم درصد زنده‌مانی اسپرم را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵)، اگرچه این تیمارها با گروه مکمل شده با ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). سلامت آکروزوم نیز در سطح ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ کاهش نشان داد (P<۰/۰۵)، اما این اثر در سطح ۰/۰۷۵ مورد استفاده نانوذرات نقره معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵).

شکل۲: زنده‌مانی اسپرم (بزرگ‌نمائی× ۱۰۰۰)

جدول ۲: اثرات سطوح مختلف نانوذرات نقره برخصوصیات کیفی اسپرم بلدرچین ژاپنی

گروه‌های آزمایشی	زنده‌مانی (٪)	سلامت آکروزوم (٪)
شاهد	۷۱/۵۲a	۹۶/۷۵a
۰/۰۷۵ قسمت درمیلیون	۶۹/۳۷ab	۹۶/۵۷ab
۰/۱۲۵ قسمت درمیلیون	۶۵/۳۳b	۹۵/۳۳b
۰/۲۵۰ قسمت درمیلیون	۵۷/۸۹b	۹۵/۸۹b
خطای معیار	۱/۳۴۳	۰/۳۸۱
سطح احتمال	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۵

a, b حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵)

بحث

اثر نانوذرات نقره بر جنبایی اسپرم: نتایج تحقیق حاضر نشان داد بر جنبایی اسپرم و جنبایی پیش‌رونده اسپرم کاهش معنی‌داری نشان داده است. Makhluf و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر نانوذرات آهن بر واکنش آکروزومی اسپرم گاو و جنبایی پیش‌رونده اسپرم تفاوت معنی‌داری را با شاهد مشاهده نکرده‌اند. این محققین نتیجه گرفته‌اند که درصد سلول‌های با آکروزوم واکنش داده در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات مشابه شاهد بوده است و سلول‌های تیمار شده با ذرات آسیب ندیده‌اند. در تحقیق دیگری که توسط همین محققین انجام شده بود از نانوذرات آهن به‌منظور علامت‌دار کردن سلول‌های اسپرم استفاده کرده و نشان داده‌اند که نانوذرات به آکروزوم، دم و غشای پلاسمائی متصل شده‌اند. نتایج مطالعه این محققین به‌وضوح نشان می‌دهد که ذرات از غشای پلاسمائی اسپرم برای رسیدن به آکروزوم عبور می‌کنند. با این‌حال این محققین به این نتیجه رسیده‌اند که ذرات به سلول‌های تیمار شده آسیب نرسانده‌اند.. Bai و همکاران (۲۰۱۰) نیز به این نتیجه رسیده‌اند که تمامیت آکروزوم اسپرم به‌وسیله نانو ذرات تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. این محققین هم‌چنین نتیجه گرفته‌اند که تزریق داخل وریدی می‌تواند باعث آسیب برگشت‌پذیر به بیضه‌ها بدون تأثیر بر باروری شود. ممکن است این اختلاف نتایج به عوامل مختلفی مانند مدل‌های مختلف مطالعه، نوع نانوذرات، خصوصیات نانو ذرات، روش و مدت زمان مواجهه بستگی داشته باشد. به‌هر حال نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که نانوذرات نقره باعث آسیب غشای سلولی به‌ویژه غشای آکروزومی شده‌اند.

اثر نانوذرات نقره بر زنده‌مانی اسپرم و سلامت آکروزوم: آزمایشات زنده‌مانی مراحل حیاتی در سمیت‌شناسی هستند که پاسخ سلولی به مواد سمیت‌زا را روشن می‌سازد. اسپرم‌های زنده طبیعی دارای غشای پلاسمائی کامل هستند که آن‌ها را از نفوذ

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

ائوزین محافظت می‌کند. زیر میکروسکوپ این اسپرم‌ها ظاهری رنگ نگرفته و سفید در مقابل پیش‌زمینه بنفش نیگروزین دارند. غشای پلاسمائی اسپرم مرده و آسیب‌دیده بسیار نفوذپذیر است که ائوزین را قادر به نفوذ به سلول می‌کند و اندامک‌های داخلی رنگ صورتی می‌گیرند. این نوع رنگ‌آمیزی یک روش ساده، ارزان و غیرتهاجمی است که می‌تواند در ارزیابی کیفیت منی استفاده شود (Lukaszewicz و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره زنده‌مانی اسپرم کاهش می‌یابد، هرچند تنها در سطح ۱۰ قسمت درمیلیون این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بوده است. سلامت آکروزوم نیز در سطح ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ قسمت درمیلیون کاهش نشان داد. اما این اثر در سطح دیگر مورد استفاده نانو ذرات نقره معنی‌دار نبوده است. نتایج حاصل با نتایج Park و همکاران (۲۰۱۰) و Braydich-Stolle و همکاران (۲۰۰۵) که مرگ سلولی را در غلظت ۱۰ قسمت درمیلیون نانوذرات نقره گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. هم‌چنین Pawar و Kaul (۲۰۱۲) نیز کاهش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم را بعد از تماس با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم گزارش کرده‌اند. بااین‌حال، Kadar و همکاران (۲۰۱۱) مرگ سلولی را در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات آهن مشاهده کرده‌اند. این اختلاف ممکن است به‌دلیل تفاوت در نوع سلول و یا نوع نانوذره باشد. متأسفانه مقایسه مطالعات نسبتاً مشکل است، به‌ویژه به‌دلیل این‌که اطلاعات داده شده در مورد دُز نانوذرات بسیار متنوع است. دیگر ضعف در مطالعات منتشر شده تاکنون تقریباً به‌طور خالص طبیعت توصیفی اثرات سمی نانوذرات است. مکانیسم‌هائی که سازگاری زیستی ذرات را تعیین می‌کنند، اکثراً در این زمان نادیده گرفته می‌شوند. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات آینده واکنش بین نانوذرات و ماده بیولوژیک در سطح مولکول را توضیح دهند. استرس اکسیداتیو می‌تواند دلیل اصلی اختلالات عملکرد اسپرم باشد زیرا سلول‌های اسپرم نسبت بالائی از اسیدهای چرب غیراشباع را دارند. نسبت بالای اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع، غشای اسپرم را نسبت به حمله رادیکال‌های اکسیژنی واکنش‌دهنده-باز دست دادن تمامیت غشاء در ناحیه آکروزومی، اختلال عملکرد سلول و کاهش جنبائی اسپرم-آسیب‌پذیرتر می‌کند (Li-guang و همکاران، ۲۰۱۰). آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز حاوی گروه‌های تیول هستند. نانوذرات نقره با حمله به گروه‌های تیول این آنزیم‌ها باعث اختلال در عملکرد نرمال این آنزیم‌ها شده و استرس اکسیداتیو را القا می‌کنند. باید توجه داشت که اسپرم پرندگان نسبت به سمیت اکسیداتیو حساس‌تر از اسپرم پستانداران است. غلظت نانوذرات نقره ارزیابی شده در این مطالعه بالاتر از غلظت‌های احتمالی جایگزین شده در بیضه‌ها است. با این وجود چون کینتیک درونی نانوذرات مشخص نشده است و هم‌چنین نانوذرات نقره ممکن است مدت‌های طولانی در بافت‌های هدف باقی بمانند، غلظت موضعی این نانوذرات در بافت‌ها ممکن است در نتیجه تجمع به سطحی بالاتر برسد (Miura و همکاران، ۲۰۰۹). از آن‌جائی‌که هیچ مکانیسم محافظتی در بیضه وجود ندارد، حتی دز بسیار پائین نانوذرات نقره نیز پتانسیل ایجاد سمیت برای سیستم تولیدمثلی را دارد. پیشنهاد می‌شود در استفاده از این نانومواد موارد احتیاط به‌دقت رعایت شود. اثرات مخرب این مواد به‌ویژه سمیت بالقوه آن‌ها در سیستم تولیدمثلی باید مورد توجه قرار گیرد و می‌تواند در نسل بعد بازتاب یابد. نانوذرات قادر به عبور از سدهای بیولوژیکی هستند و می‌توانند بر روی زنده‌مانی و عملکرد اسپرم یا رشد و نموی جنین اثر داشته باشند. پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیش‌تری روی مکانیسم کامل پشت اثرات مشاهده شده انجام گیرد، زیرا هر اطلاعاتی می‌تواند تولید نانوذرات با سازگاری زیستی بالاتر را تسهیل کند. با درنظر گرفتن این واقعیت که تماس با نانومواد در حال افزایش است و راهبردهای مناسبی برای ارزیابی و تست نانومواد در حال حاضر در دسترس نیست، مطالعات سمیت شناسی نانومواد در شرایط برون‌تنی بسیار مهم و ضروری هستند. جهت سیر نانومواد به مرحله کاربردی بسیار مهم است که تحقیقات سم‌شناسی نانو چگونگی اثر فاکتورهای چندگانه این مواد را بر سمیت آن‌ها کشف و درک کند تا از اثرات نامطلوب آن‌ها پس از استفاده بتوان جلوگیری کرد (Arora و همکاران، ۲۰۱۱). در حال حاضر نانوذرات در محدوده وسیعی از مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی مورد مطالعه قرار می‌گیرند. تحقق کامل پتانسیل استفاده از نانوذرات نیازمند پرداختن به تعدادی از مسائل شامل اثرات حاد و طولانی مدت نانومواد بر سلامتی و هم‌چنین روش‌های قابل اعتماد برای سنجش اثرات سمیت این مواد است (De و همکاران، ۲۰۰۸). در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نانوذرات نقره توانسته‌اند زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را کاهش دهند. این اثر در غلظت ۰/۱۲۵ قسمت درمیلیون معنی‌دار بوده است. سلامت آکروزوم نیز در سطح ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ کاهش نشان داد. اما این اثر در سطح ۰/۰۷۵ مورد استفاده نانو ذرات نقره معنی‌دار نبوده است. نانوذرات نقره بین هزاران نانو محصول پراکنده شده‌اند که بر زندگی روزمره میلیون‌ها انسان در بیش‌تر کشورها اثر می‌گذارد. این ذرات می‌توانند مسبب اثرات سمی متمایزی بر روی سلول‌های تولیدمثلی باشند. مطالعات اخیر با مدل حیوانی در شرایط آزمایشگاهی برای ارزیابی نانومواد نشان داد که نانو ذرات نقره تأثیر منفی بر سلول‌های اسپرم دارند. می‌توان در نهایت عنوان کرد که نتایج این پژوهش توانسته است به‌طور مستقیم نشان‌دهنده اثر نانوذرات نقره بر سلامت غشائی اسپرم باشد و هم‌چنین نشان‌دهنده اهمیت استفاده از واکنش اسپرم-غشاء به‌عنوان آزمایشی باشد که می‌تواند به‌طور مستقیم تغییرات در خصوصیات سطح اسپرم را بازتاب دهد. این تحقیق می‌تواند به حل رویدادهای سلولی که در مواجهه با

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

نانوذرات نقره اتفاق می‌افتد کمک کند. در نهایت تحقیق حاضر اطلاعاتی درباره سمیت نانوذرات نقره بر اسپرم در شرایط برون‌تنی و پایه‌ای برای ارزیابی حرفه‌ای اثر نانوذرات بر فیزیولوژی تولیدمثل فراهم می‌کند. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آتی، میزان سمیت و تعیین حداکثرهای مجاز نانوذرات مختلف و اثرات مسمومیت با این نانوذرات از نظر آسیب‌های فیزیولوژیک، هیستوپاتولوژیک و ژنوتوکسیک در سیستم تولیدمثلی بررسی گردد. به‌علاوه چون خصوصیات فیزیکوشیمیائی نانو ذرات نقره از قبیل اندازه ذره، تراکم ذرات و قابلیت پراکندگی آن‌ها به‌طور معنی‌داری بر درجه و اعمال سمیت نانوذرات نقره اثر بگذارد، تحقیق بیش‌تری برای ارزیابی اثرات این متغیرها مورد نیاز است.

منابع

۱. **Ahamed, M.; Karns, M.; Goodson, M.; Rowe, J.; Hussain, S.M.; Schlager, J.J. and Hong, Y., 2008.** DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 233, pp: 404-410.

۲. **Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J.M. and Paknikar, K.M., 2008.** Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. Toxicology Letters. Vol. 179, pp: 93-100.

۳. **Arora, S.; Rajwade, J.M. and Paknikar, K.M., 2011.** Nanotoxicology and in vitro Studies: The Need of the Hour. Toxicology and applied pharmacology. Vol. 258, pp: 151-165.

۴. **Asare, N.; Instanes, C.W.; Sandberg, J.; Refsnes, M.; Schwarze, P.; Kruszewski, M. and Brunborg, G., 2011.** Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. Toxicology. Vol. 291, pp:65-72.

۵. **AshaRani, P.V.; Mun, G.L.K.; Hande, M.P. and Valiyaveettil, S., 2009.** Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. ACS Nano. Vol. 3, pp: 279-290.

۶. **AshaRani, P.V.; Hande, M.P. and Valiyaveettil, S., 2009**. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. BMC Cell Biology. Vol. 10, pp: 65.

۷. **Bai, Y.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Mu, Q.; Zhang, W.; Butch, E.R.; Snyder, S.E. and Yan, B., 2010**. Repeated carbon nanotube administrations in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. Nature Nanotechnology. Vol. 5, pp: 683-689.

۸. **Birkhead, T.R.; Sheldon, B.C. and Fletcher, F., 1994.** A comparative study of sperm-egg interactions in birds. Journal of Reproduction and fertility. Vol. 101, pp: 353-361.

۹. **Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.M.; Schlager, J.J. and Hofmann, M.C., 2005.** In Vitro Cytotoxicity of Nano particles in Mammalian Germline Stem Cells. Journal of Toxicology Science. Vol. 88, pp: 412-419.

۱۰. **Carlson, C.; Hussain, S.M.; Schrand, A.M.; Braydich stolle, L.K.; Hess, K.L.; Jones, R.L. and Schlager, J.J., 2008.** Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. The Journal of Physical Chemistry B. Vol. 112, pp: 13608-13619.

۱۱. **Chelmonska, B.; Jerysz, A.; Łukaszewicz, E.; Kowalczyk, A. and Malecki, I., 2008.** Semen collection from Japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences. Vol. 32, pp: 19-24

۱۲. **De, M.; Ghosh, P.S. and Rotello, V.M., 2008.** Applications of Nanoparticles in Biology. Advanced Materials. Vol. 20, pp: 4225-4241.

۱۳. **El-Gendy, E.A.; Gad, A.Y. and Mostageer, A., 2007.** Sperm-mediated gene transfers in poultry. 1. The relationship with cock sperm viability. Arab Journal of Biotechnology. Vol. 10, pp: 1-12.

۱۴. **Gopinath, P.; Gogoi, S.K.; Sanpui, P.; Paul, A.; chattopadhyay, A. and Ghosh, S.S., 2010.** Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. Colloids and Surfaces.: Biointerfaces. Vol. 77, pp: 240-245.

۱۵. **Jamieson, B.G.M., 2011.** Reproductive Biology and phylogeny of Birds. Taylor and Francis group. pp: 83-87.

۱۶. **Hsin, Y.H.; Chen, C.F.; Huang, S.; Shih, T.S.; Lai, P.S. and Chueh, P.J., 2008**. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicology Letters. Vol. 179, pp: 130-139.

۱۷. **Hussain, SM.; Hess, K.L.; Gearhart, J.M.; Geiss, K.T. and Schlager, J.J., 2005.** In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro. Vol. 19, pp: 975-983.

۱۸. **Kadar, E.; Tarran, G.N.; Jha, A.N. and Al-Subiai, S.N., 2011.** Stabilization of engineered Zero-Valent Nanoiron with Na-Acrylic Copolymer Enhances Spermiotoxicity. Environmental science & technology. Vol. 45, pp: 3245-3251.

۱۹. **Larese, F.F.; Agostin, F.D.; Crosera, M.; Adami, G.; Renzi, N.; Bovenzi, M. and Maina, G., 2009.** Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. Toxicology. Vol. 255, pp: 33-37.

۲۰. **Li-guang, S.; Ru-jie, Y.; Wen-bin, Y.; Wen-juang, X.; Chun-xiang, Z.; You-she, R.; Lei, S. and Fu-lin, L., 2010.** Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal reproduction science. Vol. 118, pp: 248-254.

۲۱. **Lukaszewicz, E.; Jerysz, A.; Partyka, A. and Siudzińska, A., 2008.** Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Research in Veterinary Science. Vol. 85, pp: 583-588.

۲۲. **Makhluf, S.B.D.; Arnon, R.; Patra, C.R.; Mukhopadhyay, D.; Gedanken, A.; Mukherjee, P. and Breitbart, H., 2008.** Labeling of Sperm Cells via the Spontaneous Penetration of Eu^{3+} Ions as Nanoparticles Complexed with PVA or PVP. Journal of Physical Chemistry. Vol. 112, pp: 12801-12807.

۲۳. **Miura, N. and Shinohara, Y., 2009.** Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 390, pp: 733-737.

۲۴. **Park, E.J.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K. and Park, K., 2010.** Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. Toxicology in Vitro. Vol. 24, pp: 872-878.

۲۵. **Pawar, K. and Kaul, G., 2012**. Toxicity of titanium oxide nanoparticles causes functionality and DNA damage in buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm in vitro. Toxicology and Industrial Health. Vol. 30, No. 6, pp: 520-533.

۲۶. **Quinn, J.R.; Lavoie, E.T. and Ottinger, M.A., 2007**. Reproductive toxicity of trenbolone acetate in embryonically exposed Japanese quail. Chemosphere. Vol. 66, pp: 1191-1196.

۲۷. **Rahman, M.F.; Wang, J.; Patterson, T.A.; Saini, U.T.; Robinson, B.L.; Newport, G.D.; Murdock, R.C.; Schlager, J.J.; Hussain, S.M. and Ali, S.F., 2009.** Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. Toxicology Letters. Vol. 187, pp: 15-21.

۲۸. **Samberg, M.E.; Oldenburg, S.J. and Monteiro-Riviere, N.A., 2010.** Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro. Environmental Health Perspectives. Vol. 118, pp: 407-413.

۲۹. **Santiago-Moreno, J.; Castano, C.; Coloma, M.A.; Gomez Brunet, A.; Toledano-Diaz, A.; Lopez-Sebastian, A. and Campo, J.L., 2009.** Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poultry Science. Vol. 88, pp: 2661-2669.

۳۰. **Shit, N.; Singh, R.P.; Sastry, K.V.H.; Mohan, J.; Pandey, N.; and Moudgal, R.P., 2010.** Cloacal Gland size significantly alters semen production, sperm avtivities and fertility in different lines of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Asian J of poultry science. Vol. 4, pp: 190-197.

۳۱. **Taylor, U.; Barchanski, A.; Kues, W.; Barcikowski, S. and Rath, D., 2012.** Impact of Metal Nanoparticles on Germ Cell Viability and Functionality. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 47, pp: 359-368.

۳۲. **Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.; Zhang, H. and Xia, Z., 2009.** Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. Journal of Applied Toxicology. Vol. 29, pp: 69-78.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.126250

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Effects of silver nanoparticles on quantity and quality characteristics of Japanese quail sperm

- **Saeid Taghipour:** Department of Animal Science, Kashmar Branch, Islamic Azad University, Kashmar, Iran
- **Reza Vakili*:** Department of Animal Science, Kashmar Branch, Islamic Azad University, Kashmar, Iran

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Key words: Nanotechnology, Silver nanoparticles, Sperm, Japanese quail

Abstract

The present research, the effects of silver nanoparticles on the quantitative and qualitative characteristics of sperm in Japanese quail were investigated. The sperm was diluted in medium containing 0, 0.75, 0.125 and 0.250 ppm of silver nanoparticle. Sperm viability, Membrane integrity were assessed using the eosin-nigrosine test. Sperm acrosome health was evaluated after 40 minutes of treatment with silver nanoparticles at 39 ℃ by Formalin-citrate solution. Sperm concentration, motility, and progressive sperm motility were measured. Addition of silver nanoparticles to the semen of quail significantly decreased sperm motility at 0.25 and 0.250 ppm. Addition of silver nanoparticles in 0.125 and 0.250 ppm levels to quail semen significantly decreased motility and progressive motility($P<0.05$). Viability was significantly reduced in 0.125 and 0.250 ppm AgNPs. The acrosome integrity was significantly decreased at 0.125 silver nanoparticles ($p<0.05$). The percentage of spermatozoa with an intact membrane ($p<0.05$) were significantly decteased in treatments containg of 0.125 and 0.250 ppm silver nanoparticles in comparison to control group. The nanoparticles may be able to damage the acrosomal membrane. The results of this study suggest that silver nanoparticles may have toxic effects on sperm and may cause sperm death.

* Corresponding Author's email: rezavakili2010@yahoo.com