مقاله پژوهشی

مطالعه اثر محافظتی کوآنزیم Q_{10} بر لقاح داخل آزمایشگاهی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش سوری تحت تیمار با نانوذرّات نقره

رامین جهانگیرفرد

گروه آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: کوآنزیم Q_{10} با خواص آنتی‌اکسیدان قوی، به‌عنوان یک حامل انرژی در فرآیند چرخهٔ اکسیداسیون - احیاء شرکت می‌کند. نانوذرّات نقره با تولید گونه‌های فعّال اکسیژن، خطرات احتمالی بر روی دستگاه تولیدمثل را افزایش داده و به کاهش میزان کیفیت و باروری اسپرم می‌انجامد. هدف از این تحقیق، بررسی اثرات نانوذرّات نقره بر توان باروری آزمایشگاهی و شاخصه‌های استرس اکسیداتیو در موش سوری است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ۲۰ سر موش نر بالغ به ۵ گروه کنترل و تجربی تقسیم‌بندی شدند. گروه کنترل هیچ ماده‌ای دریافت نکرد. در گروه‌های تجربی، نانوذرّات نقره با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ خورانده شد. دریکی از گروه‌ها، کوآنزیم Q_{10} با دوز ۲۰۰ mg/kg به‌تنهایی داده شد. در گروه آخر، حیوانات نانوذرّات نقره + کوآنزیم Q_{10} را باهم دریافت کردند. پس از دوره تیمار، موش‌ها آسان کشی شدند. جهت ارزیابی تستوسترون، خون‌گیری و سپس برای بررسی IVF، اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم اخذ گردید. جهت ارزیابی TAC و MDA، بافت بیضه نمونه‌برداری شد و با آنووای یک‌طرفه و سپس تست توکی آنالیز شدند ($p<۰/۰۵$).

نتایج: نتایج IVF نشان داد میزان کیفیت جنین و مراحل رشد آن در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل نیز به ترتیب افزایش و کاهش چشمگیری داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاضر نشان داد که کوآنزیم Q_{10} توانست اثرات نامطلوب ناشی از نانوذرّات نقره بر روی دستگاه تولیدمثلی، کیفیت اسپرم و قدرت باروری را بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: نانوذرّات نقره، IVF، رشد جنینی، استرس اکسیداتیو، کوآنزیم Q_{10}

مقدمه

کوآنزیم Q_{10} یک کوفاکتور است که الکترون‌ها را در میتوکندری‌ها از یک کمپلکس به کمپلکس III منتقل می‌کند و به‌طور مؤثر فعالیت آن را دوچندان کرده، درحالی‌که کاهش‌دهندهٔ استرس اکسیداتیو نیز است. به‌علاوه، اثرات مطلوب آن در محافظت از میتوکندری گزارش‌شده است. کوآنزیم Q_{10} یک آنتی‌اکسیدان قوی بوده و توانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارد. استفادهٔ بهینه از کوآنزی م Q_{10}، برای درمان بیماری‌های عصبی مانند بیماری پارک ینسون، هانتینگتون و اسکلروز جانبی آمیوتروفیک اثرگذار است (۱). به‌طور خاص، مکمل کوآنزیم Q_{10} اثر قوی‌ای از خود نشان می‌دهد که درنتیجه باعث کاهش التهاب عصبی در بیماری‌های عصبی و کاهش سمّیت در ارتباط با تعدادی از داروها و سلول‌های ایمنی می‌شود (۲، ۳). نقش اصلی کوآنزیم Q_{10} در مغز، با التهاب و گونه‌های فعّال اکسیژن تولیدشده ناشی از عفونت پلاسمودیوم تابه‌حال مشخص نشده است (۴). در یک مطالعه نشان داده‌شده است که کوآنزیم Q_{10}

*نویسنده مسئول: **رامین جهانگیرفرد**، گروه آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
Email: r.jahangirfard@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-4985-0850

می‌تواند در خون موجب کاهش میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید چربی‌ها می‌گردد. علاوه بر این، گزارش کردند که استفاده از کوآنزیم Q_{10}، باعث کاهش ادم یا خیز بافت مغز می‌شود. این ادم بافتی درنتیجهٔ افزایش نفوذپذیری دیوارهٔ مویرگ‌های خونی و عدم بازگشت مایعات از فضای میان بافتی به داخل رگ است (۴). در میان نانوذرّات، نانوذرّات نقره به دلیل خصوصیات آنتی باکتریایی، کم بودن هزینهٔ تولید، ویژگی منحصربه‌فرد و توانایی ایجاد ساختارهای ریز و نانو گوناگون نقشی اساسی دارد (۷-۵). نانوذرّات نقره در اکثر برنامه‌های کاربردی در دامنهٔ وسیعی از محصولات زیست‌فناوری، پزشکی، داروسازی، صنایع غذایی و شیمیایی همانند ظروف ذخیره‌سازی مواد غذایی، مایع نرم‌کننده پارچه، مواد شوینده و لوازم‌آرایشی به کار گرفته می‌شوند (۸). بعضی از محققین اظهار می‌کنند که استفاده از نانوذرّات نقره موجب ایجاد اثرات سمّی در اندام‌های مختلف بدن می‌شود؛ بنابراین، مصرف آن تا حدودی محدودشده است (۹، ۱۰). بر اساس مطالعات انجام‌گرفته، گزارش کردند که نانوذرّات نقره می‌تواند با اثرات سمّی خود، سبب اختلال در سیستم قلب و عروقی گردد (۱۱). در همین راستا پژوهشگران مشخص کردند که ایجاد سمّیت از سوی نانوذرّات نقره، وابسته به‌اندازه و دوز آن است (۱۲). بر اساس مطالعات پیشین بیان‌شده است که مکانیسم سمّیت نانوذرّات نقره، افزایش میزان استرس اکسیداتیو است (۱۳). رادیکال‌های آزاد سمّی تولیدشده به‌واسطهٔ این نانوذرّات، بر روی سلول‌های بدن اثرات نامطلوب داشته و باعث مرگ سلولی یا آپوپتوز می‌گردد (۱۴، ۱۵). شجاعی فرد و همکاران در سال ۱۳۹۶ گزارش کردند که نانوذرّات نقره و آلومینیوم می‌توانند از سد غشای سلولی عبور کنند و باعث تخریب آن شوند. همچنین ثابت‌شده است که این نانوذرّات در داخل سلول بر روی اندامک میتوکندری اثر گذاشته و موجب کاهش انرژی و تحرک اسپرم‌ها می‌گردند (۱۶). میتوکندری اندامکی جهت تولید انرژی بسته‌بندی‌شده به شکل ATP است. به‌هرحال برای تحرک، اسپرم‌ها نیاز به حرکات شلّاقی تاژک دارند. تاژک‌ها، در صورت وجود انرژی در محیط حرکت خواهند کرد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته، مشخص‌شده است که اثرات سوء نانوذرّات نقره بر سیستم تناسلی، سبب کاهش فعالیت سلول‌های بینابینی لوله‌های اسپرم‌ساز شده و درنتیجه باعث افت ترشح هورمون تستوسترون می‌شوند (۱۷). دیگر محققین در همین راستا گزارش کردند که نانوذرّات نقره موجب کاهش بیان پروتئین استروئیدوژنیک می‌شود، یک نوع پروتئین انتقال‌دهنده در سطح غشای میتوکندری است که سبب انتقال کلسترول به درون غشاء شده و آن را به پرگننولون تبدیل کرده و نهایتاً محصولی بنام تستوسترون ساخته می‌شود. چنانچه به هر علتی تولید مادهٔ پرگننولون در غشای میتوکندری کمتر شود، درنتیجه باعث کاهش ترشح تستوسترون به داخل خون خواهد انجامید (۱۸). Makhluf و همکاران در مطالعه‌ای، نشان دادند که نانوذرّات مغناطیسی می‌توانند به درون سلول‌های اسپرم وارد شوند (۱۹). در همین راستا گزارش‌شده است که نانوذرّات طلا نیز سبب اختلال درروند اسپرماتوژنز شده و باعث قطعه‌قطعه شدن سلول‌های اسپرمی می‌شود؛ بنابراین، سمّیت احتمالی اسپرم به‌واسطهٔ طلا موجب عقیمی در جنس نر می‌گردد (۲۰). هدف از این تحقیق، بررسی اثرات محافظتی کوآنزیم Q_{10} بر روی توان باروری آزمایشگاهی و شاخصه‌های استرس اکسیداتیو در موش سوری تحت تیمار با نانوذرّات نقره است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، تعداد ۲۰ سر موش سوری نر بالغ نژاد (Balb/c) موردبررسی قرار گرفت. حیوانات از محل نگه‌داری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی مربوط به دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و در قفس‌هایی از جنس پروپیلن قرار داده و بدون محدودیت به آب و مواد غذایی، به مدت دو هفته با شرایط محیطی سازگار و آداپته شدند. این محیط، با دمای استاندارد ۲±۲۵ و رطوبت نسبی ۳۰-۲۵ درصد به کار گرفته شد. همچنین حیوانات موردمطالعه با رعایت سیکل نوری، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، به عبارتی سیکل نوری از ۷ صبح تا ۷ شب انجام شد. علاوه بر این، حین مراحل کاری، تمامی اصول و منشور اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. گروه‌ها شامل گروه ۱ (گروه کنترل)؛ در این گروه حیوانات هیچ‌گونه موادی دریافت نکرد. گروه ۲ (گروه تجربی)؛ در این گروه حیوانات نانوذرّات نقره را با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نموده‌اند. گروه ۳ (گروه تجربی)؛ در این گروه نانوذرّات نقره با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به حیوانات داده شد. گروه ۴ (گروه کوآنزیم Q_{10})؛ در این گروه کوآنزیم Q_{10} با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به حیوانات موردمطالعه خورانده شد. گروه ۵ (گروه نانوذرّات نقره ± کوآنزیم Q_{10})؛ در این گروه حیوانات نانوذرّات نقره را همراه با کوآنزیم Q_{10} به ترتیب با

دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نموده‌اند. هر دو مواد نانوذرّات نقره و کوآنزیم Q_{10} از راه دهانی (گاواژ) خورانده شد. پس از پایان دوره تیمار، حیوانات وزن‌کشی شدند و سپس با تجویز درون صفاقی داروهای کتامین و زایلازین به ترتیب با دوزهای مناسب ۷۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شدند و از طریق جابجایی مهره‌های گردنی، آسان کشی می‌شدند. بلافاصله بعد از بریدن پوست ناحیهٔ شکمی، قفسهٔ سینه کنار زده شد و از قلب حیوان اقدام به خون‌گیری جهت بررسی هورمون تستوسترون گردید. در این میان، اقدام به اخذ سرم خون گردید. همچنین، برای ارزیابی اسپرم‌ها، بیضه‌ها از ناحیهٔ اسکروتال بیرون کشیده شد و برای سنجش میزان شاخصه‌های استرس اکسیداتیو و برای بررسی اسپرم‌ها نیز، دم اپیدیدیم از بافت همبندی اطراف خودش جداشده و به چندین قسمت بریده شد. درنهایت دم اپیدیدیم بریده‌شده به داخل لوله فالکن‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت HTF که خود دارای ۴ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی (BSA)، در انکوباتور ۵ درصد کربن دی‌اکسید با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند تا اینکه اسپرم‌ها به داخل محیط کشت وارد شدند (۲۱).

اخذ اووسیت از لولهٔ فالوپ

جهت بررسی درصد لقاح و کیفیت جنین‌های حاصله از لقاح آزمایشگاهی، ابتدا هورمون گنادوتروپین مادیان آبستن (PMSG) به میزان ۱۰ واحد بین‌المللی و سپس بعد از گذشت ۴۸ ساعت، هورمون گنادوتروپین جفت انسان (HCG) نیز به میزان ۱۰ واحد بین‌المللی، از طریق درون صفاقی تزریق شدند. در هر گروه تعداد مشخصی از حیوانات جهت اخذ اووسیت به کار گرفته شد (معمولاً ۳ الی ۴ سر موش ماده). بعد از گذشت حدوداً ۱۰ الی ۱۲ ساعت از آخرین تجویز، حیوانات موردمطالعه تحت بیهوشی با داروهای کتامین و زایلازین قرار گرفتند و آسان کشی شدند. سپس تخمک‌ها پس از شستشو در داخل قطرات محیط کشت لقاح در زیر روغن معدنی قرار داده شدند. اسپرم‌های ایزوله شده مربوط به گروه‌های مختلف پس از طی روند ظرفیت‌یابی به‌طور مجزا به تعداد یک‌میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید.

زیگوت (لقاح) و روند رشد جنین‌ها

عمل لقاح به‌طورمعمول پس از ۴ الی ۶ ساعت انجام گرفت. تعداد زایگوت‌های موردمطالعه به‌صورت درصد لقاح بیان شد. در مطالعه حاضر، ارزیابی‌های میزان باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنین‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت صورت گرفت؛ بنابراین، درصد لقاح، جنین‌های دو الی چهار سلولی، مورولا، بلاستوسیست، جنین‌های هچ شده و متوقف‌شده به‌صورت مستقل از هم موردبررسی قرار گرفتند (۲۲).

ارزیابی مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور بررسی میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (۱۵۰۱۲، شرکت نوند سلامت، ایران) و مالون دی آلدئید (۱۵۰۲۲، شرکت نوند سلامت، ایران) مقدار ۰/۲۰ گرم از بافت بیضه اخذشده و به داخل ۰/۰۵ بافر فسفات منتقل شدند و درنهایت به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (۲۳، ۲۴).

ارزیابی تستوسترون

غلظت سرمی تستوسترون با استفاده از روش الایزا مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت الایزا (۱۰۸۶۶۶، آبکم، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

تهیه مواد شیمیایی

در این بررسی، مواد شیمیایی مانند نانوذرّات نقره (اس ان پی ۵۰۱، شرکت آرمینا، ایران) و همچنین کوآنزیم کیوتن (شرکت هلس براست، ساخت کشور آمریکا) خریداری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

میانگین داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نسخه شماره ۲۲ نرم‌افزار SPSS و به‌کارگیری آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز شدند. جهت مقایسهٔ میانگین‌ها، تعیین اختلاف میانگین‌ها و معنی‌دار بودن نتایج از تست تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

نتایج توان باروری آزمایشگاهی

به‌طورکلی درصد زیگوت (لقاح)، جنین‌های دو الی چهار سلولی، مورولا، بلاستوسیست، جنین‌های هچ شده و متوقف‌شده در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرّات نقره کاهش یافتند. این کاهش وابسته به دوز بوده، به‌طوری‌که بیشترین کاهش در گروه‌های دریافت‌کننده بیشترین دوز نانوذرّات نقره دیده شد. در گروه‌هایی که از کوآنزیم کیوتن استفاده شد هیچ‌گونه اختلاف معناداری وجود نداشت.

۱- درصد لقاح

در مورد درصد لقاح تنها اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروهی بود که بیشترین میزان دوز مصرفی نانوذرّات نقره را

دریافت کرده بود (p<۰/۰۵). این در حالی است که بین گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که با افزایش دوز مصرفی این نانوذره با کاهش درصد لقاح رابطهٔ مستقیم داشته، به‌طوری‌که کمترین درصد زیگوت به بیشترین دوز نانوذرّات نقره اختصاص یافت. علاوه بر این، کوآنزیم کیوتن توانست به‌طور قابل‌توجهی میزان درصد لقاح را در گروه-های دریافت‌کننده کوآنزیم کیوتن در مقایسه با گروه‌های دیگر، افزایش دهد (جدول ۱).

۲- جنین‌های دو الی چهار سلولی

در مورد جنین‌های دو الی چهار سلولی تنها اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروهی بود که بیشترین دوز مصرفی نانوذرّات نقره دریافت کرده بود (p<۰/۰۵). در بین گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌دار چشمگیری وجود نداشت. بیشترین کاهش میزان جنین‌های دو الی چهار سلولی در گروهی که بیشترین میزان دوز نانوذرّات نقره دریافت کرده بود مشاهده شد. این کاهش نیز وابسته به دوز بود. همچنین در گروه‌هایی که کوآنزیم کیوتن مصرف کرده بودند، این میزان نسبت به گروه‌های تجربی معنادار بوده و با گروه کنترل هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری دیده نشد (جدول ۱).

۳- جنین‌های مورولا تا بلاستوسیست

کاهشی در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرّات نقره در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که درصد مورولا در گروه دریافت‌کننده نانوذرّات نقره با دوز پایین نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ای با دوز بالا اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (p<۰/۰۵). در مورد درصد بلاستوسیست نیز در بین گروه‌های کنترل و دوز بالای نانوذرّات نقره، اختلاف معنی‌دار بود. به‌طوری‌که با افزایش میزان دوز مصرفی نانوذرّات نقره، درصد بلاستوسیست کاهش پیدا کرد. گروهی که از کوآنزیم کیوتن استفاده کرده بود نسبت به گروه‌های تجربی، درصد بلاستوسیست افزایش پیدا کرد (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات محافظتی کوآنزیم کیوتن بر درصد میزان لقاح، جنین‌های دو الی چهار سلولی تحت تیمار با نانوذرّات نقره

	گروه ۱ (کنترل)	گروه ۲ (کوآنزیم کیوتن)	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز بالا)	گروه ۵ Silver NPs + Q10
میزان لقاح (درصد)	^{a}۸۵/۷۲ ± ۱/۲۴	^{a}۸۹/۳۰ ± ۴/۴۴	^{b}۷۴/۱۵ ± ۵/۳۱	^{c}۶۳/۳۴ ± ۱/۴۵	^{a}۸۳/۳۹ ± ۱/۴۵
جنین‌های دوسلولی (درصد)	^{a}۸۶/۴۳ ± ۴/۶۲	^{a}۸۵/۶۴ ± ۶/۵۳	^{b}۷۹/۱۴ ± ۶/۳۹	^{c}۷۲/۵۲ ± ۵/۸۲	^{a}۸۴/۱۲ ± ۴/۲۵
جنین‌های چهار سلولی (درصد)	^{a}۸۴/۶۸ ± ۴/۶۰	^{a}۸۳/۰۱ ± ۵/۳۲	^{b}۷۲/۳۲ ± ۴/۷۷	^{c}۶۴/۵۴ ± ۵/۲۳	^{a}۸۱/۳۴ ± ۴/۴۶

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات محافظتی کوآنزیم کیوتن بر درصد مورولا و بلاستوسیست تحت تیمار با نانوذرّات نقره

	گروه ۱ (کنترل)	گروه ۲ (کوآنزیم کیوتن)	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز بالا)	گروه ۵ Silver NPs + Q10
مورولا (درصد)	^{a}۷۴/۶۹ ± ۴/۳۰	^{a}۷۳/۲۸ ± ۶/۲۱	^{b}۶۱/۵۹ ± ۶/۳۷	^{c}۵۲/۰۳ ± ۷/۳۴	^{c}۷۱/۰۳ ± ۲/۴۳
بلاستوسیست (درصد)	^{a}۵۲/۳۹ ± ۳/۶۳	^{a}۵۶/۱۷ ± ۵/۴۱	^{b}۴۵/۳۱ ± ۳/۴۱	^{b}۳۶/۱۹ ± ۷/۶۵	^{a}۵۰/۳۵ ± ۴/۳۹

۴- جنین‌های هچ و متوقف‌شده

به‌طورکلی در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده نانوذرّات نقره با دوزهای پایین و بالا، درصد جنین‌های هچ شده مساوی با صفر گزارش شد. درنتیجه اثرات نامطلوب نانوذرّات نقره بر روی

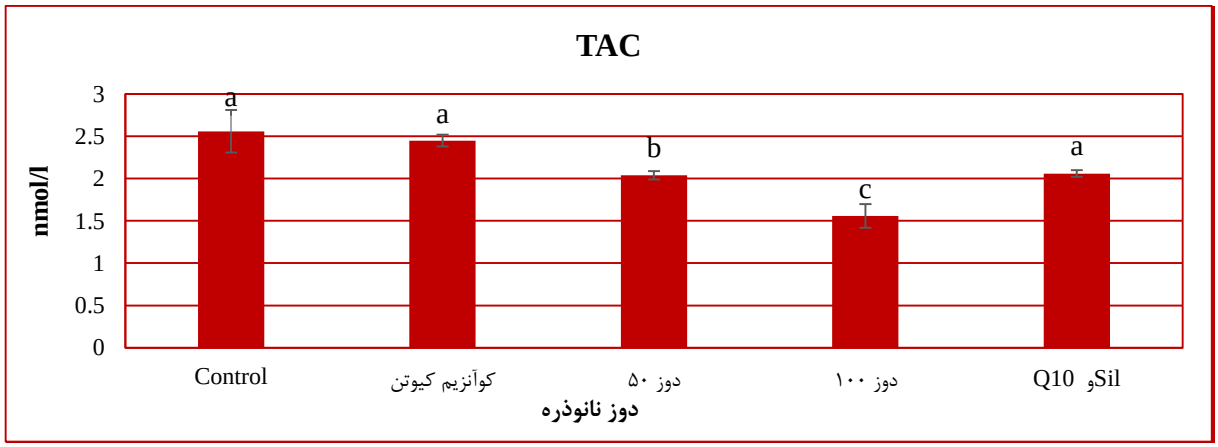
جنین‌ها اثبات می‌شود. این در حالی است که در گروه‌های دریافت‌کننده کوآنزیم کیوتن، میزان جنین‌های هچ شده در مقایسه با گروه‌های تجربی بیشتر شد. همچنین میانگین درصد جنین‌های متوقف‌شده نشان داد که افزایشی در میزان درصد جنین‌های متوقف‌شده در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرّات نقره در مقایسه با گروه کنترل دیده شد. این افزایش بیشتر در گروهی بود که بیشترین میزان دوز مصرفی نانوذرّات نقره دریافت کرده بود. همچنین، بین گروه‌های تجربی دوزهای پایین و بالا، هیچ‌گونه اختلاف معناداری وجود نداشت. علاوه بر این، در گروه دریافت‌کننده کوآنزیم کیوتن، این مقدار تا حدی جبران و کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

نتایج شاخص‌های استرس اکسیداتیو

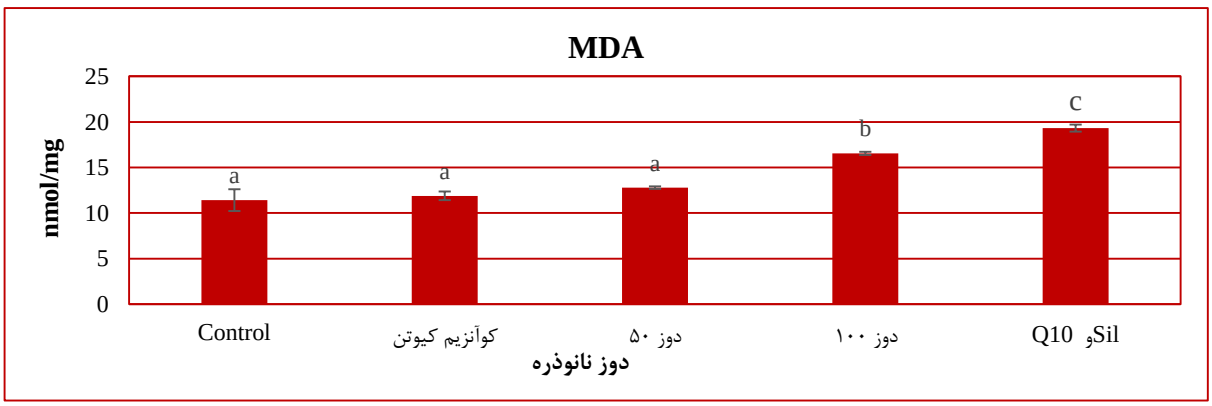
نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و دریافت‌کننده کوآنزیم کیوتن به ترتیب افزایش و کاهش‌یافته‌اند. این تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۱ و ۲).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات محافظتی کوآنزیم کیوتن بر درصد جنین‌های هچ و متوقف‌شده تحت تیمار با نانوذرّات نقره

	گروه ۱ (کنترل)	گروه ۲ (کوآنزیم کیوتن)	گروه ۳ (دوز پایین)	گروه ۴ (دوز بالا)	گروه ۵ Silver NPs + Q10
درصد جنین‌های هچ شده	^{a}۲۵/۴۲ ± ۲/۶۱	^{a}۲۲/۲۳ ± ۳/۴۷	۰±۰	۰±۰	^{a}۲۱/۳۹ ± ۱/۳۲
درصد جنین‌های متوقف‌شده	^{a}۱۹/۷۲ ± ۴/۸۳	^{a}۲۰/۲۱ ± ۷/۱۹	^{b}۴۶/۷۳ ± ۱/۴۷	^{c}۵۷/۳۱ ± ۱۰/۶۳	^{a}۲۱/۶۹ ± ۱/۵۲



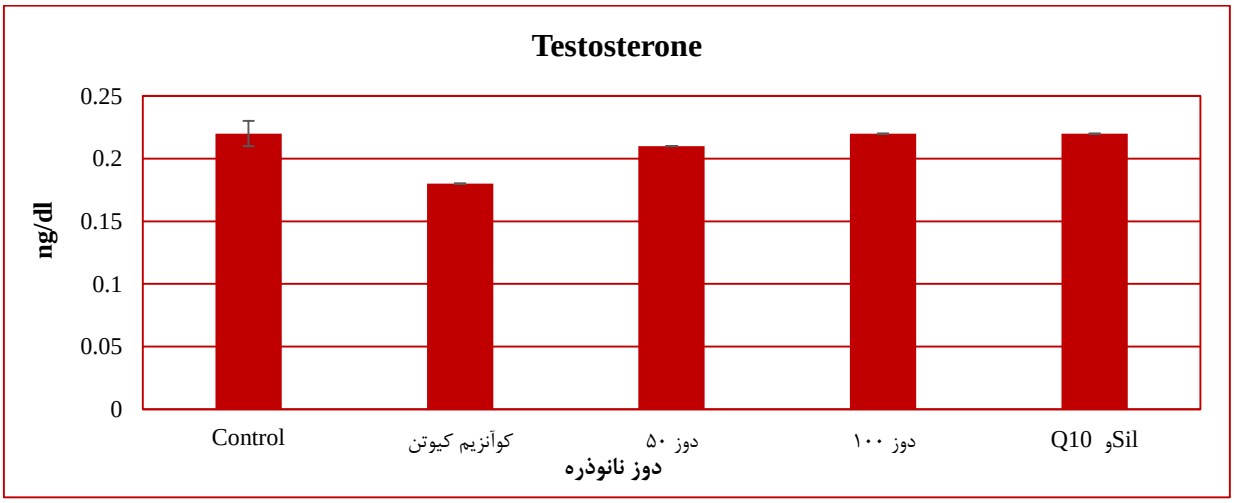
نمودار ۱- مقایسه میانگین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های مختلف



نمودار ۲- مقایسه میانگین مالون دی آلدئید در گروه‌های مختلف

نتایج میزان سطوح تستوسترون

نتایج حاصله نشان داد میزان سطوح هورمون تستوسترون در گروه‌های تجربی نسبت به گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده کوآنزیم کیوتن کاهش‌یافته است. بین گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرّات نقره با دوزهای پایین و بالا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۳).



نمودار ۳- مقایسه میانگین سطوح هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف

بحث

نتایج حاصل از کار پژوهشی نشان داد که در گروه‌های تجربی کاهشی در میزان درصد زیگوت (لقاح)، درصد جنین‌های دو الی چهار سلولی، درصد مراحل مورولا و بلاستوسیست، درصد جنین-های هچ و افزایشی در میزان جنین‌های متوقف‌شده، مشاهده شد. درحالی‌که در گروه‌های دریافت‌کننده کوآنزیم کیوتن، کیفیت جنین‌ها و مراحل رشد جنینی با گروه کنترل هیچ‌گونه اختلاف معناداری نداشت. علاوه بر این، میزان فعالیت مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه‌های دیگر، به ترتیب افزایش و کاهش‌یافته‌اند. همچنین میزان تستوسترون در سرم خون، کاهشی را در گروه‌های تجربی نشان داد. در این مطالعه به بررسی اثرات نامطلوب نانوذرّات نقره و نقش محافظتی کوآنزیم کیوتن بر توان باروری آزمایشگاهی و سیستم استرس اکسیداتیو پرداخته‌شده است. کوآنزیم کیوتن، خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و سبب کاهش رادیکال‌های آزاد سمّی تولیدشده در بدن است. این رادیکال‌های آزاد به‌وسیلهٔ برخی از مواد شیمیایی تولیدشده و اثرات نامطلوبی بر روی سلول‌ها و بافت‌ها اعمال می‌کنند. سیستم ROS بر روی سیکل اسپرماتوژنز اثر گذاشته و اختلالی در آن ایجاد می‌کند (۲۵). به‌هرحال، برای روند طبیعی سیکل اسپرماتوژنز، محیطی عاری از هرگونه مواد نامطلوب و مضر است. این مواد ممکن است به قسمت‌های مختلف آناتومی اسپرم تأثیر گذاشته و سبب ایجاد ناهنجاری اسپرمی شوند (۲۵). Sriram و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند از رادیکال‌های آزاد تولیدشده در اثر نانوذرّات نقره، کاسپاز ۳ فعال‌شده و درنتیجه فرآیند آپاپتوز باعث چروکیدگی و کوچک شدن سلول هدف می‌گردد (۲۶). در مطالعه حاضر، اسپرم‌ها تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد قرارگرفته و مطابق با مطالعات قبلی سبب کاهش قدرت باروری و میزان کیفیت آن می‌شود. احتمالاً کاهش مراحل رشد جنینی ازجمله رشد جنین‌های دو الی چهار سلولی و مرحله بلاستوسیست را می‌توان به اثرات سوء رادیکال‌های آزاد سمّی در بدن نسبت داد. El-Nouri و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که استفاده از نانوذرّات نقره با دوز مصرفی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش-ها به‌واسطهٔ تولید رادیکال‌های آزاد موجب کاهش وزن بدن، تراکم استرومای تخمدان همراه با خونریزی، التهاب، نکروز، افزایش فولیکول‌های آترتیک و درنهایت ایجاد آپاپتوز می‌کند (۲۷). تحقیقات انجام‌گرفته در شرایط in vitro اثرات نانوذرّات مختلف بر مدل‌های سلولی مختلف نشان داده‌شده است؛ بنابراین، گفته می‌شود سمّیت وابسته به دوز در سلول‌های ردهٔ اسپرماتوگونی موش گزارش‌شده است (۲۸). گزارش‌ها حاکی از این هستند که نانوذرّات تیتانیوم دی‌اکسید و کربن سیاه بر

عملکرد سلول‌های بینابینی موش ازجمله تکثیر و بیان ژن آن‌ها که در حدفاصل لوله‌های اسپرم‌ساز قرارگرفته‌اند مؤثر است (۲۹). گزارش کردند که نانوذرّات طلا بر تحرک اسپرم مؤثر بوده و به قسمت‌های سر و دم اسپرماتوزوئید نفوذ می‌کنند (۳۰). مطالعات پیشین نشان داده است که نانوذرّات نقره و طلا یک اثر معنی‌دار وابسته به دوز بر تحرک اسپرم انسان و زیست پذیری آن دارند، گرچه آسیب جدی به اسپرم با استفاده از غلظت‌های بالای نانوذرّات رخ می‌دهد که ممکن است آزمایش آن در شرایط in vivo سخت باشد (۳۱). همسو با این مطالعات، در تحقیق حاضر نیز اثرات نانوذرّات نقره بر روی سلول‌های جنینی در شرایط آزمایشگاهی کاملاً وابسته به دوز بوده و سبب کاهش روند رشد جنینی می‌شود. این اثرات نامطلوب نانوذرّات نقره بر روند طبیعی تقسیمات سلولی زیگوت احتمالاً با تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن در ارتباط باشد. درنتیجه گونه‌های فعال اکسیژن موجب ناپایداری در ساختار سلول‌ها شده و باعث می‌شود که مولکول‌های زیستی شامل پروتئین‌ها، لیپیدها و نوکلئیک اسیدها دناتوره شده و تخریب گردند (۳۲). به همین ترتیب، رادیکال‌های آزاد میزان کلسترول خون را کاهش می‌دهند و درنتیجه تبدیل پرگننولون به تستوسترون در سطح غشای میتوکندری سلول‌های بینابینی کاهش پیـدا می‌کند. همچنین موافق با مطالعات قبلـی، ROS تولیدشده در بدن نیز سبب افزایش و کاهش میزان فعالیت مالون دی آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده چنین می‌توان گفت که نانوذرّات نقره می‌تواند اثرات سوء بالقوه‌ای را بر سیستم تناسلی مذکر اعمال کند و سبب کاهش کیفیت جنین‌ها و قدرت باروری در آن‌ها شود. طی مراحل رشد جنینی، در اثر سمّیت نانوذرّات، جنین‌ها به رشد کافی و مطلوب خود نرسیده‌اند و لیز شده‌اند. درنتیجه پیشنهاد می‌شود که استفاده از کوآنزیم کیوتن می‌تواند تا حدی از اثرات نامطلوب نانوذرّات نقره جلوگیری کند و کمک شایانی به قدرت باروری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر ادامه بخشی از طرح پژوهشی با کد ۵۱۱۱۸ است. بدین ترتیب از تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری کرده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Spindler M, Beal MF, Henchcliffe C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. Neuropsychiatric disease and treatment. 2009; 5: 597-610.
2. McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. Toxicology and applied pharmacology. 2004; 201(1): 21-31.
3. Winkler-Stuck K, Wiedemann FR, Wallesch CW, Kunz WS. Effect of coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. Journal of the neurological sciences. 2004; 220(1-2): 41-48.
4. Nyariki JN, Ochola LA, Jillani NE, Nyamweya NO, Amwayi PE, Yole DS, et al. Oral administration of Coenzyme Q10 protects mice against oxidative stress and neuro-inflammation during experimental cerebral malaria. Parasitology international. 2019; 71(1):106-120.
5. Tian X, Jiang X, Welch C, Croley TR, Wong TY, Chen C, et al. Bactericidal effects of silver nanoparticles on Lactobacilli and the underlying mechanism. ACS Appl Mater Interfaces. 2018; 10(10): 8443–8450.
6. Kumar SSD, Houreld NN, Kroukamp EM, Abrahamse H. Cellular imaging and bactericidal mechanism of green-synthesized silver nanoparticles against human pathogenic bacteria. J Photochem Photobiol B. 2018; 178: 259–269.

7. Durán N, Durán M, De Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Nanomedicine. 2016; 12(3): 789–799.
8. McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, et al. Silver nanoparticles in the environment: sources, detection and ecotoxicology. Sci Total Environ. 2017; 575: 231–246.
9. Huang YW, Cambre M, Lee HJ. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. Int J Mol Sci. 2017; 18(12): 2702.
10. Panyala NR, Pena-Mendez EM, Havel J. Silver or silver nanoparticles: A hazardous threat to the environment and human health? J Appl Biomed 2008; 6(3): 117-129.
11. Wang Z, Xia T, Liu S. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects. Nanoscale. 2015; 7(17): 7470–7481.
12. Du Z, Zhao D, Jing L. Cardiovascular toxicity of different sizes amorphous silica nanoparticles in rats after intratracheal instillation. Cardiovasc Toxicol. 2013; 13(3): 194–207.
13. Völker C, Oetken M, Oehlmann J. The biological effects and possible modes of action of nanosilver. Rev Environ Contam Toxicol. 2013; 223: 81–106.
14. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. Biomaterials. 2011; 32(36):9810–9817.
15. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicol Lett. 2008; 179(3):130–139.
16. Braydich SL, Hussain S, Schlager JJ, Hofman MC. In vitro cytotoxicity of nano-particles in mammalian germline stem cells. Toxicology. 2005; 88: 412-419.
17. Yoshida Y, Itoh N, Saito Y, Hayakawa M, Niki E. Application of water-soluble radical initiator, 2, 2′-azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl) propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. Free radical research. 2004; 38(4): 375-384.
18. Stocco DM. The role of the StAR Protein in Steroidogenesis. Endocrinology. 2000; 164: 247-253.
19. en-DavidMakhluf S, Qasem R, Rubinstein S, Gedanken A, Breitbart H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. Langmuir. 2006; 22(23): 9480–9482.
20. Manin OI, Nikolaev VA, Kolomiitsev AA, LebedenkoIIu. Comparative toxicological evaluation of domestic golden alloys for soldering. Stomatologiia (Mosk). 2007; 86(1): 7-64.
21. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. Biochemical pharmacology. 2008; 76(11): 1590-1611.
22. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. Hum Reprod. 2001; 16: 1165-1171.
23. Anbara H, Shahrooz R, Razi M, Malekinejad H, Najafi G. The effect of vitamin C on mice hemolytic anemia induced by phenylhydrazine: an animal model study using histological changes in testis, pre-implantation embryo development, and biochemical changes. Iranian journal of basic medical sciences. 2018; 21(7): 668-677.
24. Malekiyan R, Abdanipour A, Sohrabi D, Jafari Anarkooli I. Antioxidant and neuroprotective effects of lycopene and insulin in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. Biomedical Reports. 2019; 10(1): 47-54.
25. Xu G, Lu H, Dong Y, Shapoval D, Soriano SG, Liu X, Zhang Y, Xie Z. Coenzyme Q10 reduces sevoflurane-induced cognitive deficiency in young mice. BJA: British Journal of Anaesthesia. 2017; 119(3): 481-491.
26. Sriram MI, Kanth SB, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. International journal of nanomedicine. 2010; 5: 753-762.
27. Elnoury MA, Azmy OM, Elshal AO, Mohamed A, Ragab H, Elsherbini ES. Study of the effects of silver nanoparticles exposure on the ovary of rats. Life Science Journal. 2013; 10(2):1887-1894.
28. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicological sciences. 2005; 88(2): 412-419.

29. Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki KI, Nihei Y, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. Toxicology in vitro. 2008; 22(8): 1825-1831.
30. Wiwanitkit V, Sereemaspun A, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. Fertility and Sterility. 2009; 91(1): e7-e8. doi:10.1016/j. fertnstert.2007.08.021
31. Moretti E, Terzuoli G, Renieri T, Iacoponi F, Castellini C, Giordano C, et al. In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. Andrologia. 2013; 45(6): 392-396.
32. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. Toxicology letters. 2012; 214(3): 251-258.

Original Article

Study of the Protective Effect of Coenzyme Q10 on in Vitro Fertilization and Oxidative Stress Characteristics in Mice Treated with Silver Nanoparticles

Jahangirfard R

Department of Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 26 Aug 2020 Accepted: 27 Sep 2020

Abstract

Background & Objective: Coenzyme Q_{10} has potent antioxidant properties and is involved in the redox cycle as an energy carrier. Silver nanoparticles increase the potential hazards on the reproductive system by producing reactive oxygen species and reduce sperm quality and fertility. The aim of this study was to investigate the effects of silver nanoparticles on in vitro fertilizing potential and oxidative stress indices in mice.

Materials & Methods: In this study, 20 adult male mice were divided into 5 control and experimental groups. The control group did not receive any substances. In the experimental groups, silver nanoparticles were fed at doses of 50 and 100 mg/kg. In one group, coenzyme Q_{10} was given at a dose of 200 mg/kg alone. In the last group, the animals received silver nanoparticles + coenzyme Q_{10} together. After the treatment period, the mice were euthanized. For testosterone investigation, blood sampling and then for IVF evaluation, sperms from the tail of the epididymis were taken. Testicular tissue was sampled to assess TAC, and MDA and were analyzed by one-way ANOVA and then Tukey test ($p<0.05$).

Results: IVF results showed that the quality of the fetus and its growth stages in the experimental groups were significantly diminished compared to the control group ($p<0.05$). Also, malondialdehyde level and total antioxidant capacity in experimental groups increased and decreased significantly compared to the control group, respectively.

Conclusions: The present results exhibited that coenzyme Q_{10} was able to improve the adverse effects of silver nanoparticles on the reproductive system, sperm quality, and fertility.

Keywords: Silver nanoparticles, IVF, Embryologic development, Oxidative stress, Coenzyme Q_{10}

***Corresponding Author: Jahangirfard Ramin,** Department of Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: r.jahangirfard@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-4985-0850