



اثر نانو ذرات نقره بر عملکرد تولیدمثلی بلدرچین نر ژاپنی

مهدی رنجبری^۱، امجد فرزین پور^{۲*}، اسعد وزیری^۳

۱- دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۱)

چکیده

نانو ذرات نقره به دلیل خصوصیات ضد باکتریایی جهت ضدعفونی محیط، تجهیزات و نیز گندزدائی آب در مزارع مختلف طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از مشکلات مزارع مرغ مادر، افت باروری خروس در اواسط دوره تولید است. لذا هدف این مطالعه بررسی آثار نانو ذرات نقره بر سیستم تولیدمثلی بلدرچین ژاپنی نر به عنوان یک مدل آزمایشگاهی بود. در این آزمایش، تعداد ۲۴ قطعه بلدرچین نر در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و شش تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل صفر، ۱۲، ۳۶ و ۱۰۸ قسمت در میلیون (ppm) نانو ذرات نقره بود که در آب آشامیدنی مورد استفاده قرار گرفتند. در پایان دوره ۴۲ روزه آزمایش، وزن بدن تمامی پرندگان، وزن بیضه‌ها، شاخص گنادی و تولید اسپرم روزانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت بررسی غلظت سرمی تستوسترون، قبل از کشتار از ورید زیر بال نمونه خون اخذ و سرم آن جداسازی شد. وزن بیضه‌ها در دو گروه ۳۶ و ۱۰۸ نانو ذرات نقره (به ترتیب ۶/۳ و ۶/۵ گرم) نسبت به گروه شاهد (۸/۸ گرم) کاهش یافت. شاخص گنادی در گروه ۳۶ ppm نانو ذرات (۲/۹۲±۰/۴۶) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد (۳/۷۴±۰/۴۷) نشان داد ($P<0/05$). نانو ذرات نقره در سطح ۱۰۸ ppm سبب افت تولید اسپرم روزانه (۱۱۰/۶±۲۸/۱ میلیون) در مقایسه با گروه شاهد (۳۲۷/۷±۹۴/۴ میلیون) شد ($P<0/05$). کاهش تراکم سلولی در لوله‌های منی‌ساز، مجاری آوران دور و آوران نزدیک اپیدیدیمی و مجاری اپیدیدیم در تیمار دریافت‌کننده ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P<0/05$). نتایج حاضر نشان داد که نانو ذرات نقره عملکرد تولیدمثلی بلدرچین نر را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، تستوسترون، تولید اسپرم روزانه، نانو ذرات نقره، هیستوپاتولوژی

* نویسنده مسئول: Amjadfarzinpour@uok.ac.ir

مقدمه

مواد و روش‌ها

نانوتکنولوژی با تولید نانو ذرات و استفاده از آنها در محدوده وسیعی از محصولات تجاری در سراسر دنیا سریعاً در حال رشد است (Rosas-Hernandez *et al.*, 2009). نقره در مقیاس نانو، مانند سایر نانو مواد به واسطه اندازه بسیار کوچک، خصوصیات فیزیکی-شیمیایی و فعالیت‌های زیستی قابل ملاحظه و غیرمعمولی را نشان می‌دهد. نانو ذرات نقره نسبت به فلز نقره دارای اندازه بزرگتر هستند و به دلیل افزایش سطح و کسر بالائی از اتم‌های سطحی، فعالیت ضد میکروبی بالاتری خواهند داشت (Mirshokraei *et al.*, 2011). مهمترین خصوصیت نانو ذرات نقره، اثر ضد باکتریایی این ذرات است که از این ویژگی می‌توان برای ضدعفونی محیط و نیز سالم-سازی آب شرب استفاده کرد (Noshadi and Ghanbarizadeh, 2016). خصوصیات فیزیکی-شیمیایی و آثار زیستی ویژه نانو ذرات نقره سبب شده است که امروزه به عنوان یکی از ترکیبات ضد باکتریایی مهم بر علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها استفاده شوند (Humberto *et al.*, 2011). برخی گزارشات، نانو ذرات نقره را در زمره ترکیبات ضد باکتری با طیف عملکرد وسیع طبقه‌بندی نموده اند (Nanda and Saravanan, 2009). استفاده از نانو ذرات نقره می‌تواند از شکل‌گیری بیوفیلم در سیستم‌های آب‌رسانی نیز ممانعت نماید (Ghotaslou *et al.*, 2017). از آنجا که نانو ذرات می‌توانند از سدهای خونی-بیضه‌ای و خونی- مغزی عبور کنند، لذا این خصوصیت سبب محدود شدن کاربرد این ترکیبات می‌شود (Braydich-Stolle *et al.*, 2005). امروزه استفاده از نانو ذرات نقره در مزارع مختلف مرغداری شامل مرغ گوشتی، مرغ تخم‌گذار و مرغ مادر رو به افزایش است. کاربرد این محصولات حتی برای آب شرب نیز سفارش می‌شود. مصرف بی‌رویه فرآورده‌های نانوتکنولوژی در شاخه‌های مختلف صنایع طیور یکی از نگرانی‌های زیست محیطی و امنیت غذایی است. یکی از مشکلات مهم در مزارع مرغ مادر، کاهش باروری زود هنگام خروس‌ها است (Farzinpour and Dadras, 2013). بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی آثار نانو ذرات نقره روی سیستم تولیدمثلی بلدرچین نر ژاپنی بود.

در این مطالعه، تعداد ۹۶ قطعه جوجه بلدرچین ژاپنی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و شش تکرار و هر تکرار شامل چهار قطعه پرند (سه پرند ماده و یک پرند نر)، ابتدا در بستر و در سن دو هفتگی به قفس‌های اختصاصی منتقل شدند. دسترسی پرندگان به آب و خوراک آزاد بوده و مراقبت‌های لازم تا حد امکان منطبق با روش‌های توصیه شده تجاری به عمل آمد. جیره غذایی بر پایه ذرت و سویا و مطابق احتیاجات مواد مغذی توصیه شده به وسیله NRC (1994) در سنین مختلف دوره پرورش تنظیم شد (جدول ۱). نانو ذرات نقره مورد استفاده در این تحقیق، مایع کلوئیدال نانو نقره (Nanocid L2000) ساخت شرکت نانو نصب پارس (تهران، ایران) بود. بیشترین اندازه ذرات نقره ۵۰ nm و با قطر $0.2 \mu m$ بود. جوجه‌ها از یک روزگی تا پایان ۴۲ روزگی مقادیر صفر، ۱۲، ۳۶ و ۱۰۸ قسمت در میلیون (ppm) نانو ذرات نقره را در آب آشامیدنی دریافت نمودند. سپس بعد از توزین و کشتار هر پرند، نمونه‌های خون اخذ و بیضه بلدرچین‌های نر جمع‌آوری شدند و برای تعیین شاخص‌های باروری، وزن بدن و تولید اسپرم روزانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت تعیین میزان تولید اسپرم روزانه، یک گرم بافت بیضه را در ۱۰ میلی‌لیتر STM (Saline -TritonX_100 – Merthiolate) هموژن نموده، سپس دوپست میکرولیتر از بافت هموژن با ۸۰۰ میکرولیتر محلول تریپان بلو مخلوط شد. با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار و بزرگنمایی ۱۰۰، تعداد اسپرماتوزوناهای هسته کشیده موزی شکل شمارش شد. بعد از لحاظ نمودن ضریب رقت، تعداد اسپرم‌های شمارش شده در یک گرم بیضه در وزن هر دو بیضه ضرب و حاصل عددی بر عدد ۲/۶۹ که طول دوره اسپرماتوزنز در بلدرچین است، تقسیم شد تا میزان اسپرم روزانه در هر دو بیضه بلدرچین حاصل شود (Zdenka *et al.*, 2013).

جهت بررسی غلظت سرمی تستوسترون بعد از خونگیری سرم خون ۲۴ قطعه بلدرچین نر به وسیله دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور به مدت پانزده دقیقه جداسازی شد. نمونه‌های سرم اخذ شده بلافاصله بعد از جداسازی به میکروتیوب منتقل شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه مورد

دریافت‌کننده نانو ذرات نقره نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0/05$). این اختلاف به گونه‌ای است که کاهش غلظت سرمی تستوسترون در گروه دریافت‌کننده ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره محسوس‌تر است (شکل ۱). نتایج حاصل از آثار نانو ذرات نقره بر هیستوپاتولوژی بیضه و اپیدیدیم نشان داد که مصرف ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره سبب اختلال در زنجیره اسپرماتوژنز و کاهش تراکم سلول‌های جنسی در درون لوله‌های منی‌ساز شد (شکل‌های ۲ و ۳). مقطع یک لوله منی‌ساز نرمال در بلدرچین نر شامل مراحل مختلف اسپرماتوژنز (به ترتیب سلول‌های اسپرماتوگنی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید) در شکل ۴ نشان داده شده است. در بررسی مقاطع بافتی بیضه و ناحیه اپیدیدیم، کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) در جمعیت سلولی مرکز لومن لوله‌های منی‌ساز و مجاری خارج بیضه-ای شامل مجاری آوران نزدیک و مجاری آوران دور ناحیه اپیدیدیم در گروه‌های مختلف دریافت‌کننده نانو ذرات نقره مشاهده شد (شکل‌های ۵ و ۶).

بحث

در بررسی کلی، اگر چه مقایسه میانگین‌های وزن بدن اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، اما افزایش غلظت نانو ذرات نقره سبب کاهش عددی در وزن بدن شد، به گونه‌ای که میانگین وزن بدن در گروه شاهد حدود ۲۳۵ گرم است و در گروه دریافت‌کننده ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره برابر با ۲۰۱ گرم است که این اختلاف قابل تامل است. در صورت تقسیم کردن اختلاف حدود ۲۴ گرم این دو گروه نسبت به میانگین وزن بدن در گروه‌های مختلف آزمایشی، عملاً مصرف ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره سبب کاهش ۱۰ درصدی تولید گوشت در گله شده است و این کاهش وزن بدن می‌تواند تولید و سوددهی یک مزرعه مرغداری را به طور کامل تحت تاثیر قرار دهد. مقایسه میانگین‌های وزن بیضه نشان داد که دریافت ۳۶ ppm و ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره سبب کاهش این فراسنجه تولیدمثلی می‌شود، اما در مطالعات تولیدمثلی، شاخص گنادی مهمترین شاخص تولیدمثلی محسوب می‌شود. اگر چه فقط گروه ۳۶ ppm نانو ذرات نقره نسبت به گروه شاهد افت معنی‌داری از این نظر نشان داد، اما اختلاف سایر تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد باید در نتیجه‌گیری

نظر نگهداری شدند. اندازه‌گیری تستوسترون سرم با استفاده از کیت الیزا انجام شد. به منظور بررسی اثر گروه‌های آزمایشی بر هیستوپاتولوژی سیستم تولیدمثلی، نمونه‌برداری از بافت بیضه در ۴۲ روزگی انجام گرفت. نمونه‌های بیضه راست جدا شده از بلدرچین‌های نر در داخل ظروف پلاستیکی مخصوص حاوی محلول بافر فرمالین خنثی ۱۰ درصد تا زمان تهیه مقاطع میکروسکوپی نگهداری شدند. پس از آماده‌سازی و تثبیت نمونه‌ها، کلیه مراحل آگیری و شفاف‌سازی با استفاده از دستگاه پروسسینگ بافت مدل شاندون انجام گرفت. پس از مراحل آماده‌سازی بافت‌ها، برش‌ها با ضخامت چهار تا شش میکرومتر با استفاده از دستگاه میکروتوم مدل لایتز ۱۵۱۲ تهیه شد. برش‌ها بعد از تهیه شدن، درون دستگاه Tissue float bath با دمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، قرار داده شد تا برش باز شده و سپس روی لام انتقال داده شد. رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی تهیه شده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین انجام شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS 2004) تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

نتایج

نتایج آثار گروه‌های مختلف آزمایشی نانو ذرات نقره بر برخی شاخص‌های تولیدمثلی بلدرچین نر در جدول ۲ نشان داده شده است. علی‌رغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار در وزن بدن گروه‌های مختلف، نانو ذرات نقره سبب کاهش معنی‌دار در فراسنجه‌های تولیدمثلی ارزیابی شده در این مطالعه شدند. وزن بیضه‌ها در گروه دریافت‌کننده ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش داشت. شاخص گنادی در گروه دریافت‌کننده ۳۶ ppm نانو ذرات نقره کاهش مشخصی را نسبت به گروه شاهد نشان داد. کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) میزان تولید اسپرم روزانه بیضه در گروه دریافت‌کننده ۱۰۸ ppm نسبت به سایر گروه‌ها از مشخص‌ترین یافته‌های این مطالعه بود. در بررسی کلی، اگر چه اختلاف معنی‌داری در وزن بدن در بین گروه‌های مختلف وجود نداشت، اما با افزایش غلظت نانو ذرات نقره کاهش عددی در وزن بدن نسبت به گروه شاهد قابل تامل است. غلظت‌های تستوسترون در گروه‌های مختلف

می‌تواند عملکرد دستگاه تولیدمثلی را به شدت تحت تاثیر قرار دهد.

در مطالعات سم‌شناسی برای بررسی اثر نانو ذرات بر سیستم تولیدمثلی نر، برآورد تولید روزانه اسپرم یکی از شاخص‌های ضروری است. این ارزیابی عمومی را می‌توان در شمارش اسپرم، زنده‌مانی و شکل‌شناسی طبقه‌بندی کرد. اخیراً گزارش شده است که شمارش اسپرم شامل تولید روزانه اسپرم، ذخیره اسپرمی اپیدیدیم یا مقدار اسپرم انزالی معیار مناسبی برای تجزیه اختلالات اندوکروینی و سیستم تولیدمثلی است (Ehn *et al.*, 2008).

نهایی مصرف این محصول نانوفناوری در آب آشامیدن پرندگان صنعتی لحاظ شود. در مطالعه حاضر، شاخص باروری دیگر یعنی تولید اسپرم روزانه در بیضه تحت تاثیر مصرف ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره قرار گرفته و کاهش شدیدی را نشان داد، به گونه‌ای که نانو ذرات نقره سبب افت حدود ۶۶ درصدی تولید اسپرم روزانه شد. اگر چه مقایسه میانگین تولید اسپرم روزانه در دو تیمار دیگر آزمایشی به لحاظ آماری با گروه شاهد اختلافی را نشان نمی‌دهد، اما افت این شاخص در گروه‌های ۳۶ و ۱۲ نانو ذرات نقره به ترتیب ۱۳ و ۲۶ درصد نسب به گروه شاهد نیز قابل اغماض نیست و این اختلافات در بلندمدت

جدول ۱- ترکیب اقلام خوراکی (درصد) و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی

Table 1. Ingredient composition (%) and nutrients of the experimental diets

Ingredients (%)	Diets	
	0- 42 day	
Corn	50.51	
Soybean meal	42.04	
Limestone	1.16	
Fish meal	3	
Soybean oil	2.07	
Dicalcium phosphate	0.32	
Vit premix ¹	0.25	
Min premix ²	0.25	
Salt	0.30	
DL-methionine	0.10	
Total	100	
Calculated composition ³		
Crude Protein	24	
ME, kcal/kg	2900	
Methionine	0.50	
Met and Cys	0.75	

¹ Provided per kilogram of premix: 3600 KUI vitamin A, 800 KUI vitamin D3, 7200 UI vitamin E, 720 mg vitamin B₁, 2640 mg vitamin B₂, 4000 mg pantothenic acid, 12000 mg nicotinic acid, 1200 mg vitamin B₆, 400 mg folic acid, 6 mg vitamin B₁₂, 800 mg vitamin K₃, 40 mg biotin, 100 g Choline chloride and 40 g antioxidant.

² Provided per kilogram of premix: 40 g manganese sulfate, 4 g copper sulfate, 33880 mg zinc, 400 mg iodine, 80 mg selenium.

³ Crude protein is based on analytical values. Amino acids, MEN, values based on table values from the National Research Council (1994).

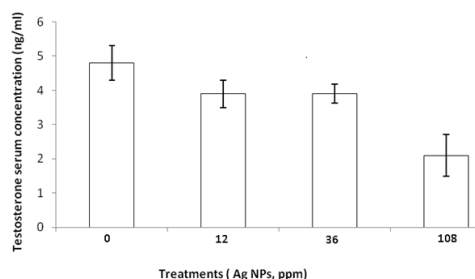


Fig. 1. Effect of experimental treatments of Ag nanoparticles (AgNPs) on serum concentration of testosterone in quail

شکل ۱- اثر تیمارهای آزمایشی نانو ذرات نقره بر غلظت سرمی تستوسترون در بلدرچین

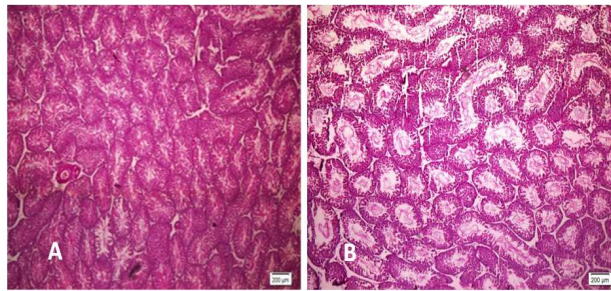


Fig. 2. Effects of Ag nanoparticles (AgNPs) on seminiferous tubules in Japanese quail testis, (A): control, (B): Ag NPs 108 ppm (H & E, 400X)

شکل ۲- آثار نانو ذرات نقره بر لوله‌های منی‌ساز در بیضه بلدرچین‌های ژاپنی: (A): گروه شاهد، (B): گروه مصرف کننده ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره (هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر)

جدول ۲- اثر افزودن نانو ذرات نقره در آب آشامیدنی بر برخی شاخص‌های تولیدمثلی بلدرچین نر (n=۶)

Table 2: Effect of adding Ag nanoparticles (AgNPs) in drinking water on some reproductive indices in male quails (n=6, Mean ± SEM)

Parameter	Treatments (Ag NPs, ppm)			
	0	12	36	108
Body weight (g)	235.4 ± 31	230.8 ± 41	217.4 ± 35	201 ± 25
Paired testes weight (g)	8.8 ± 0.15 ^a	7.3 ± 0.21 ^{ab}	6.3 ± 0.16 ^b	6.5 ± 0.14 ^b
Gonado-Somatic Index (GSI)	3.74 ± 0.47 ^a	3.19 ± 0.51 ^{ab}	2.92 ± 0.46 ^b	3.24 ± 0.54 ^{ab}
Daily sperm production per testis (×10 ⁶)	327.7±94.4 ^a	286.9±67.5 ^a	241.1±31.2 ^a	110.6±28.1 ^b

^{a,b} Within each row, means with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

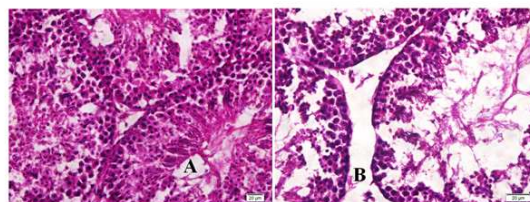


Fig. 3. Effect of Ag nanoparticles (AgNPs) on seminiferous tubules in quail testis, (A): control, (B): Ag NPs 108 ppm (H & E, 1000X)

شکل ۳- آثار نانو ذرات نقره بر لوله‌های منی‌ساز در بیضه بلدرچین، (A): شاهد، (B): ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره (هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)

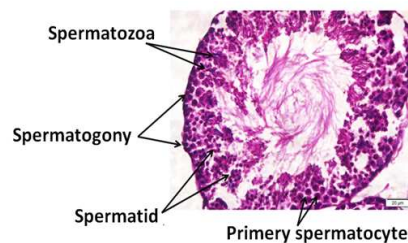


Fig. 4. The developmental stages of spermatogenesis were identified in a seminiferous tubule in a quail: spermatogony, primary spermatocyte, spermatid and spermatozoa (H & E, 1000 X)

شکل ۴- مراحل توسعه اسپرماتوژنز که در یک لوله منی‌ساز بلدرچین شناسایی شد: اسپرماتوگنی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوا (هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)

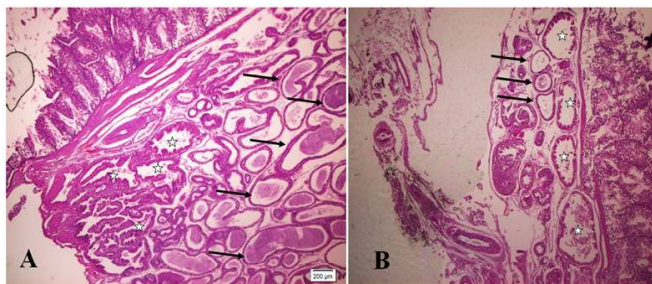


Fig. 5. Effect of Ag nanoparticles (AgNPs) on proximal efferent ductules (star) and distal efferent ductules (arrow) of epididymis region in quail, (A): control, (B): Ag NPs 108 ppm (H& E, 400X)

شکل ۵- اثر نانو ذرات نقره بر مجاری اوران نزدیک (ستاره) و مجاری اوران دور (فلش) ناحیه اپیدیدیم در بلدرچین، (A): شاهد، (B): ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره (هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگنمایی $\times 400$)

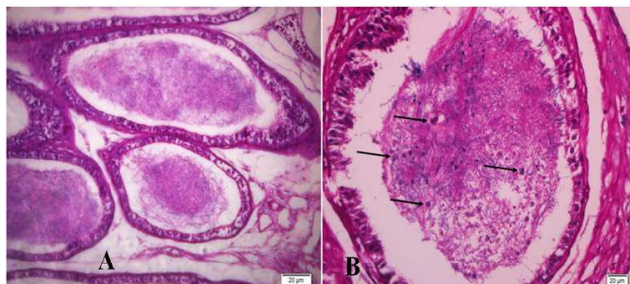


Fig. 6. Effect of Ag nanoparticles (AgNPs) on epididymis duct in quail, (A): control, (B): Ag NPs 108 ppm. Increased mononuclear cells in content cells of epididymis duct (H& E, 1000 X)

شکل ۶- اثر نانو ذرات نقره بر مجرای اپیدیدیم در بلدرچین، (A): شاهد، (B): ۱۰۸ ppm نانو ذرات نقره. افزایش سلول‌های تک هسته‌ای در محتویات سلولی مجرای اپیدیدیم (هماتوکسیلین - ائوزین، بزرگنمایی $\times 1000$)

سلول‌های لیدیک و در نتیجه کاهش تولید هورمون تستوسترون باشد. نتایج هیستوپاتولوژیکی در این تحقیق نیز نشان از ظهور ضایعات بافت بیضه دارد. انسجام و عدم گسستگی در زنجیره‌های اسپرماتوزنز داخل لوله‌های منی-ساز از شاخصه‌های مهم بافت‌شناسی بیضه است که سبب افزایش تراکم سلولی در درون این لوله‌ها می‌شود. مصرف نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی سبب گسستگی و فاصله افتادن در بین زنجیره‌های اسپرماتوزنز داخل لوله منی‌ساز شد. این گسستگی زنجیره‌ها در واقع سبب تضعیف سد خونی بیضه‌ای و نهایتاً کاهش عملکرد سلول‌های سرتولی در پرستاری و حمایت از سلول‌های جنسی در حال تکامل شده و ضمناً اتصال سلول‌های جنسی به سلول‌های سرتولی تضعیف یافته و این نقیصه سبب می‌شود که سلول‌های نابالغ از جمله اسپرماتیدهای گرد نیز به همراه اسپرماتوزوآها به داخل لومن لوله‌های منی‌ساز آزاد شوند. همین پدیده سبب شد تا سلول‌های تک هسته‌ای در داخل مجاری خارج بیضه‌ای ناحیه اپیدیدیمیس یعنی مجاری نزدیک و دور اوران مشاهده شود. همچنین این احتمال وجود دارد که به دلیل تضعیف سد خونی بیضه‌ای، سلول‌های تک هسته‌ای خونی نیز به داخل لومن وارد شده باشند. نانو ذرات توانایی عبور از سدهای خونی-بیضه‌ای و خونی-مغزی را دارند (Braydich-Stolle *et al.*, 2005). گزارشات نشان داده است که در موش‌های صحرائی که نیترات نقره نشان‌دار شده را به صورت تزریق داخل وریدی دریافت نمودند،

به نظر می‌رسد میتوکندری هدف سیتوتوکسیسیته نانو ذرات نقره باشد. تحقیقات نشان داده است که نانو ذرات نقره سبب کاهش معنی‌دار پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود (Teodoro *et al.*, 2011). نتایج حاصل از بررسی آثار نانو ذرات موجود در آگروز موتوره‌های دیزلی با غلظت‌های مختلف روی عملکرد تولیدمثلی موش نر نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تولید روزانه اسپرم در همه تیمارها نسبت به تیمار شاهد بوده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Yoshida *et al.*, 1999).

هورمون تستوسترون را می‌توان به عنوان تنها نماد سرمی فعالیت تولیدمثلی حیوان نر در نظر گرفت. تمامی فعالیت‌های تولیدمثلی حیوان تحت کنترل و تاثیر مستقیم این هورمون است و عملاً آینه تمام‌نمای عملکرد تولیدمثلی در حیوان نر محسوب می‌شود. مقایسه میانگین این فراسنجه در تیمارهای آزمایشی نشان داد که نانو ذرات نقره سبب کاهش غلظت سرمی این هورمون نسبت به گروه شاهد شده است. این یافته به تنهایی می‌تواند دلیل قاطعی بر سمیت تولیدمثلی نانو ذرات نقره در تمامی مقادیر آزمایش شده در تحقیق حاضر باشد. کاهش غلظت سرمی تستوسترون دلیل توجیه‌کننده افت فراسنجه‌های میانگین وزن بدن، وزن بیضه، تولید اسپرم روزانه و شاخص گنادی است. کاهش غلظت سرمی تستوسترون در گروه‌های مختلف در این مطالعه با یافته‌های رضایی زارچی و فومنی (۱۳۹۱) مطابقت دارد. این کاهش می‌تواند ناشی از اثر نانو ذرات نقره روی

میتوکندری سلول‌های لیدینگ تاثیر گذاشته و سبب کاهش فعالیت ترش‌حی این سلول‌ها شوند (Carlson *et al.*, 2008). نانو ذرات نقره باعث افزایش اکسیژن آزاد نظیر سوپر اکسیداز شده و بدین صورت سبب افزایش اکسیداسیون مولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها می‌شود (Carlson *et al.*, 2008). فرضیه دیگر این است که نانو ذرات نقره می‌توانند در بیان ژن برخی پروتئین‌های مسئول انتقال کلسترول به غشاء داخل میتوکندری و افزایش استروئیدسازی نقش داشته باشند. این امکان وجود دارد که نانو ذرات نقره با کاهش بیان ژن این پروتئین‌ها مانع انتقال کلسترول به غشاء داخلی میتوکندری شده و در نهایت از تبدیل کلسترول به پرگنولون جلوگیری کند و باعث کاهش تولید تستوسترون در سلول‌های لیدینگ شود (Colvin, 2003; Lansdown, 2007). همچنین گزارش شده است که نانو ذرات موجود در سوخت‌های دیزلی مانند دی بنزو دی اگزان و دی بنزو فوران سبب دژنره شدن سلول‌های لیدینگ و افزایش تعداد مجاری اسپرم‌ساز آسیب دیده، کاهش تولید روزانه اسپرم، پیدایش الیاف میلین در سلول‌های لیدینگ و تغییر در ساختار سلول‌های سرتولی و تحلیل لیزوزوم سلول‌های لیدینگ می‌شود (Yoshida *et al.*, 1999). نکته مهم اینجا است که با توجه به سفارش شرکت سازنده این محصول مبنی بر موثر بودن آن بر آلودگی‌های مختلف میکروبی آب، مصرف نانو ذرات نقره جهت گندزدائی آب شرب و باز کردن سیستم‌های آبرسانی در مزارع مختلف پرورش طیور در حال افزایش است و مصرف طولانی‌مدت آن در مزارع مولد که عموماً دارای سن بالا هستند، خطر افزایش تجمع این ذرات در بافت‌های مختلف از جمله بیضه پرنده نر را امکان‌پذیر می‌سازد. گزارش‌ها نشان داده است که افزایش سمیت سلولی نانو ذرات نقره به غلظت و مدت زمان تماس با آن ارتباط داده شده است (Hsin *et al.*, 2008). لذا مصرف طولانی‌مدت نانو ذرات نقره حتی در مقادیر پایین حدود ۱۲ ppm به عنوان ضدعفونی کننده آب آشامیدنی می‌تواند سبب کاهش غلظت هورمون تستوسترون و افت فعالیت تولیدمثلی در پرنده نر شود.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به مجموعه یافته‌های گزارش شده در این مطالعه، مصرف مقادیر زیاد و طولانی‌مدت نانو ذرات نقره به طور

بقیای نقره در بیضه‌ها تایید شد، به طوری که در تمام انواع سلول‌ها و مراحل اسپرماتوزن و در لیزوزوم سلول‌های سرتولی ردیابی شده بود (Faust, 1992). نقره جذب شده در بدن قادر به اتصال به گروه بزرگی از پروتئین‌های غنی از سیستئین موسوم به متالوتیونین‌ها است. این گروه پروتئینی نقش تنظیمی و حفاظتی در سلول از جمله آزادسازی واسطه‌هایی نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل نیتریک اکسید، آپوپتوزیس، اتصال و تبادل فلزات سنگین مانند روی، کادمیوم، مس و نقره به عهده دارند (Faust, 1992). متالوتیونین‌ها در انواع مختلف سلول‌های زنده وجود داشته و ساختار منحصر به فردی دارند که سبب جدا شدن، اتصال و جایگزینی فلزاتی نظیر روی و نقره می‌شوند. احتمالاً متالوتیونین‌های سلول‌های پوستی در ترمیم زخم و کاهش التهاب و آپوپتوز سلولی به وسیله نقره نقش دارند (Lansdown, 2007). آثار هیستوپاتولوژی نانو ذرات نقره بر کبد جوجه‌های گوشتی شامل دژنراسیون چربی، انسداد سینوسی، اتساع ورید مرکزی، نکروز سلول‌های کبدی و فیبروز سلول‌های کبدی است (Arora *et al.*, 2008). مطالعات انجام شده روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی جهت بررسی سمیت چندین نوع نانو ذرات در شرایط برون تنی نشان داده است که نانو ذرات نقره سبب کاهش مؤثر عملکرد میتوکندری، افزایش نشت سلولی، نکروزیس و القای آپوپتوز نسبت به سایر نانو ذرات شدند (Braydich-Stolle *et al.*, 2005). تزریق نانو ذرات نقره به موش‌های آبستن و مطالعه هیستولوژیکی بیضه نوزادان این موش‌ها، نشان داده که مصرف نانو ذرات نقره باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتیدها و اسپرم بالغ شده است (Noori *et al.*, 2011). در بررسی‌های دیگری نشان داده که نانو ذرات طلا با نفوذ به سر و دم اسپرم سبب قطعه قطعه شدن سلول اسپرم شده و سبب کاهش تحرک اسپرم شد (Yang *et al.*, 2009). رسوب نانو ذرات نقره با تخریب زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری سبب کاهش عملکرد میتوکندری شده و در نهایت منجر به افزایش تولید ROS و کاهش تولید ATP و آسیب به DNA می‌شود (AshaRani *et al.*, 2009). گزارش شده است که میتوکندری جایگاه اصلی برای تولید ROS القا شده به وسیله نانو ذرات نقره است (Hsin *et al.*, 2008). نانو ذرات نقره می‌توانند بر فعالیت

زود هنگام کاهش باروری نیز تاثیرگذار بوده و عملکرد تولیدمثلی پرندگان را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان به جهت تأمین مالی این پروژه تقدیر و تشکر می‌شود.

مستقیم فعالیت تولیدمثلی بلدرچین ژاپنی را کاهش داد. مصرف نانو ذرات در دوره طولانی در مزارع مختلف طیور (تخم‌گذار، مولد و اجداد) و با توجه به نتایج این تحقیق و سایر گزارش‌ها مبنی بر آثار منفی نانو ذرات نقره بر سیستم تولیدمثلی، احتمال دارد که این ذرات در سندرم

فهرست منابع

- Arora S., Jain J., Rajwade J. M. and Paknikar K. M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179: 93-100.
- AshaRani P.V., Mun G. L. K., Hande M. P. and Valiyaveetil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3: 279-290.
- Braydich-Stolle L., Hussain S. M., Schlager J. J. and Hofmann M. C. 2005. *In Vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Journal of Toxicology Science*, 88: 412-419.
- 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*, 112: 13608-13619.
- Colvin V. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 21: 1166-1170.
- Ehn K. C., Tsunekawa N., Kanai Y. and Kurohmaru M. 2008. A new preparation protocol for measurement of testicular sperm production. *Journal of Reproduction and Development*, 54: 90-93.
- Farzinpour A. and Dadras H. 2013. Incidence and effects of epididymal stones on gonad indices in roosters. *Online Journal of Veterinary Research*, 17: 540-554.
- Faust R. A. 1992. Toxicity summary for silver. Chemical Hazard Evaluation and Communication Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health and Safety Research Division, Oak Ridge National Laboratory, 62: 47-51.
- Ghtaslou R., Bahari Z., Aliloo A., Gholizadeh P. and Salahi Eshlaghi B. 2017. The *in vitro* effects of silver nanoparticles on bacterial biofilms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6: 1077-1080.
- 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*, 179: 130-139.
- Humberto H., Lara V., Ayala-Nunez N. V., Carmen L. D., Ixtepan T. and Cristina R. P. 2010. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 615-621
- Lansdown A. B. G. 2007. Critical observations on neurotoxicity of silver. *Critical Reviews in Toxicology*, 37: 237-250.
- Lansdown A. B. 2010. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences*, 10: 1155-1171.
- Mirshokraei P., Hassanpour H., AkhavanTaheri M., Riyahi M. and Shams-Esfandabadi N. 2011. The *in vitro* effects of nanosilver colloid on kinematic parameters of ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 12: 317-323.
- Nanda A. and Saravanan M. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*, 5: 452-456.
- Noori A., Parivar K., Modaresi M., Messripour M., Yousefi M. H. and Amiri G. R. 2011. Effect of magnetic iron oxide nanoparticle on pregnancy and testicular development of mice. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1221-1227.
- Noshadi M. and Ghanbarizadeh P. 2016. Investigation of drinking water disinfection performance using silver nanoparticles. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 46: 93-107.
- Rezaei Zarchi S., Taghavi Foumani M. H. and Negahdary M. 2012. Effect of silver nanoparticles on the LH, FSH and testosterone hormones in male rat. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 15: 25-29.

- Rosas-Hernández H., Jiménez-Badillo S., Martínez-Cuevas P. P., Gracia-Espino E., Terrones H., Terrones M., Hussain S. M., Ali S. F. and González C. 2009. Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicology Letters*, 191: 305-313.
- Teodoro J. S., Simões A. M., Duarte F. V., Rolo A. P., Murdoch R. C., Hussain S. M. and Palmeir C. M. 2011. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles *in vitro*: A mitochondrial perspective. *Toxicology in Vitro*, 25: 664-670.
- 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*, 29: 69-78.
- Yoshida S., Sagai M., Oshio S., Umeda T., Ihara T., Sugamata M., Sugawara I. and Takeda K. 1999. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 23: 307-315.
- Zdenka O. K., Boisen A. M. Z., Jackson P., Wallin H., Vogel U. and Hougaard K. S. 2013. Daily sperm production: Application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. *Reproductive Toxicology*, 36: 88-97.



Research paper

Effect of silver nanoparticles on the reproductive performance of male Japanese quail

M. Ranjbari¹, A. Farzinpour^{2*}, A. Vaziry³

1. Former MSc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(Received: 09-09-2019 – Accepted: 02-12-2019)

Abstract

One of the new methods for drinking water disinfection in poultry farms is the use of silver nanoparticles (AgNPs). Anti-bacterial effect of silver had been known for disincentive activity of AgNPs. An early low fertility syndrome has been reported in broiler breeding farms. The aim of this study was to evaluate the effects of AgNPs on reproductive performance of male quails as a laboratory model. Twenty-four male quails were used in four treatments with six replications. The treatments consisted of 0, 12, 36 and 108 ppm of silver nanoparticles, which were consumed in drinking water. Then blood samples and testes were collected after 42 days and body weight, daily sperm production, paired testes weight (g), gonado-somatic index (GSI), testosterone serum concentration and testicular histopathology indices were evaluated. There was significant decrease in the testes absolute weight in two groups of 36 and 108 ppm AgNPs (6.3-6.5 g) compared with control group (8.8 g, $P<0.05$). The GSI was also significantly ($P<0.05$) declined in 36 ppm AgNPs group ($2.92\pm 0.46\%$) as compared with control group ($3.74\pm 0.47\%$). The 108 ppm AgNPs group caused a dramatically reduction of daily sperm production ($110.6\pm 28.1\times 10^6$) as compared to control ($327.7\pm 94.4\times 10^6$, $P<0.05$). One of the most important histopathological findings was a depletion of cells in the seminiferous tubules of testis and spermatogenesis chain and a low density of spermatozoa in the proximal and distal efferent ductules in the 108 ppm AgNPs concentration. The results indicated that silver nanoparticles reduced the male reproductive performance in male quail.

Keywords: Japanese quail, Testosterone, Daily sperm production, Silver nanoparticles, Histopathology

*Corresponding author: Amjadfarzinpour@uok.ac.ir