ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

تاثیر سمیت سلولی نانوذرات نقره بر بافت بیضه; شواهد بیوشیمیایی استرس و بیان پروتئین Hsp70-2

چکیده

به تازگی شواهد زیادی وجود دارد که نانو ذرات نقره (NS) شدیدا باعث القای اثرات سیتوتوکسیک در شرایط in vitro و in vivo می‌شوند. در اینجا، ما اثر وابسته به دوز NS بر تغییرات بافتی، تغییرات بیوشیمیایی، وضعیت درون‌ریز، پارامترهای اسپرم و همچنین بیان Hsp70-2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نانو ذرات نقره (50-60 نانومتر) در 3 دوز 0/5، 1 و 5 میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت 35 روز تجویز شد. در گروه کنترل شم از 0/3 میلی‌لیتر نرمال سالین استفاده شد. تغییرات بافتی، پارامترهای اسپرم، سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون مورد بررسی قرار گرفت. آسیب RNA در سلول‌های ژرمینال و لیدیگ، کانون استروئیدساز سلول‌های لیدیگ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیضه و اسپرم (TAC[1])، سطح مالون دی‌آلدئید (MDA[2])، اکسید نیتریک (NO[3])، بیان ایمونوهیستوشیمیایی (IHC[4]) و بیان سطح Hsp70-2 mRNA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. NS به صورت وابسته به دوز، منجر به افزایش تخریب سلول‌های ژرمینال، نکروز، آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون شد. آسیب بالای RNA در سلول‌های ژرمینال و لیدیگ همراه با افزایش ناهنجاری‌های اسپرم در گروه تیمار شده با NS مشاهده شد. بیان Hsp70-2 در گروه تیمار شده با 0/5 میلی‌گرم/کیلوگرم NS تنظیم بیش از حد شد، در حالی که بیان آن در گروه تیمار شده با 1 و 5 میلی‌گرم/کیلوگرم NS کاهش یافت. سطحTAC بیضه و اسپرم کاهش یافت. با این حال، سطح MDA و NO در تمام گروه‌های تیمار شده با NS به طور معنی‌دار افزایش یافت ($P < 0.05$). هیچ تغییر بافتی و بیوشیمیایی در گروه کنترل شم مشاهده

[1] total antioxidant capacity
[2] malondialdehyde
[3] nitric oxide
[4] immunohistochemical

نشد. در نتیجه، ذرات NS اثر پاتولوژیک خود را از طریق تحت تاثیر قرار دادن آنتی‌اکسیدانی بیضه و وضعیت درون ریز اعمال کردند، که به نوبه خود منجر به کاهش بیان Hsp70-2 شد. ذرات NS از طریق این مکانیسم باعث تاثیر منفی بر محتوی RNA، DNA و پروتئین‌های سلول شدند.

حیوانات:

از بیست و چهار موش آزمایشگاهی (10-12 هفته‌ای)، با وزن بدن 20-30 گرم استفاده شد. این موش‌ها در طول دوره آزمایش، تحت شرایط کنترل نور (12 ساعت روشنایی/ 12 ساعت تاریکی) و دمای 20 تا 25 درجه سلسیوس قرار گرفتند. رژیم غذایی پلت استاندارد (پلت مهاباد، ایران) و آب به طور آزادانه در اختیار آن‌ها قرار گرفت. در این مطالعه تمام آزمایش‌های انجام شده روی حیوانات، مطابق با راهنمایی‌های کمیته اخلاق در پژوهش روی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه انجام شد. راهنمایی‌های جهانی برای رفاه حیوانات و مقررات محلی سازگار برای آزمایش، در طول مطالعه رعایت شدند.

تعیین وزن بیضه

پس از 55 روز، موش معدوم شده (پنتوباربیتال سدیم، 200 میلی گرم بر کیلوگرم، IP) و بیضه چپ برداشته شد. بافت‌های آزاد اطراف از تمام نمونه‌ها جدا شده و وزن آن‌ها در مقیاس Mettler Basbal (Delta Range، توکیو، ژاپن) محاسبه شد.

آماده‌سازی سرم و جمع‌آوری نمونه‌های بافت

یک روز بعد از استفاده از آخرین ترکیب آزمایش، نمونه‌های خون از روزنه کاردیاکی تحت بیهوشی انجام شده با استفاده از دی اتیل اتر، به دست آمد. برای به دست آوردن سرم، نمونه‌ها بعد از نگهداری در دمای اتاق به مدت 1 ساعت، در 3000 ×g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس نمونه‌های سرم تا زمان انجام تجزیه و تحلیل‌های بیشتر در دمای -20 درجه سلسیوس قرار گرفتند. حیوانات بیهوش در نهایت با استفاده از گاز دی‌اکسیدکربن معدوم شد. نمونه بیضه بلافاصله برداشته شده و با سالین نرمال سرد شسته شد. یکی از نمونه‌های بیضه‌ی هر موش به سرعت در نیتروژن

مایع فریز شده و تا زمان تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی بیشتر در دمای 70- درجه سلسیوس نگهداری شد و بیضه دیگر برای آزمایش‌های هیستوپاتولوژی در محلول Bouin تثبیت شد.

روش ارزیابی نمای نردبانی DNA[5]

برای بررسی هر گونه آسیب به DNA، همانطور که قبلا توضیح داده شد روش کیفی قطعه قطعه شدن DNA در نمونه‌های بیضه منجمد انجام شد (Patel et al., 2010). به طور خلاصه، 0/2 تا 0/3 گرم نمونه بیضه‌های منجمد از هر گروه (مخلوطی از حداقل 4 موش صحرایی) در 3 میلی‌لیتر بافر لازیس (Tris-HCl 0/1 مولار/ EDTA 10 میلی‌مولار، حاوی 0/5٪ تریتون X100، pH=8) هموژن شد. پس از سانتریفوژ کوتاه (1200 x g، 5 دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس)، پلت‌ها با مخلوط حاوی فنل اشباع شده با بافر، کلروفرم و الکل ایزوامیل (25:24:1 v/v/v) تیمار شدند. بعد از سانتریفیوژ (1500 xg، 10 دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس)، مایع رویی با مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل (49:1 v/v) برای حذف پروتئین و مواد چربی تیمار شد. پس از آن، به منظور رسوب DNA، محلول به ترتیب با اتانول از پیش سرد شده (مطلق) و سدیم استات (3/5 مولار، pH 4) مخلوط شد. نمونه‌های DNA با اتانول (66٪) شسته شد و دوباره در بافر حاوی Tris-HCl (0/1 مولار)، EDTA (20 میلی‌مولار) حل شدند. تکه تکه شدن DNA با بارگذاری نمونه DNA استخراج شده روی ژل آگارز (1/6 درصد) حاوی اتیدیوم‌بروماید مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و الکتروفورز در 60 V به مدت 75 دقیقه انجام شد. قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از سیستم ژل‌داک 2000 (Bio-Rad) تصویربرداری شد.

مواد و روش‌ها:

بیست و هشت موش صحرایی نر Wistar 10 روزه استفاده شد. موش‌ها به دو گروه آزمون (n = 14) و کنترل شم (n = 14) تقسیم شدند. یک رژیم غذایی استاندارد یکسان و آب به طور آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت و در یک اتاق با محیط کنترل‌شده (دمای 20 تا 23 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 50 تا 70 درصد و 12 ساعت روشنایی/ 12 ساعت تاریکی) نگهداری شدند.

[5] DNA laddering assay

قرار گرفتن در معرض فرمالدئید

حیوانات گروه آزمون، به مدت 55 روز در معرض بخار فرمالدهید 10٪ در یک محفظه خاص (شرکت Adaco، ارومیه، ایران) با میانگین غلظت 1/5 ppm قرار گرفتند. دمای اتاقک 20-26 درجه سلسیوس و فشار هوا 760-763 اتمسفر بود. در گروه کنترل-شم، حیوانات در اتاقک بدون بخار فرمالدهید قرار گرفتند. در فواصل زمانی قرار نگرفتن در معرض فرمالدهید، حیوانات در اتاقک‌های آزمایشگاهی قرار گرفتند که به دور از اتاقک‌های در معرض قرارگیری بود.

اجرای آزمایش شیمیایی و گروه‌بندی:

پس از یک هفته انطباق، حیوانات به چهار گروه کنترل شم و آزمون (در هر گروه6 = N) تقسیم شدند. حیوانات گروه شاهد شم، به صورت روزانه 0/3 میلی‌لیتر سالین نرمال به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند. گروه آزمون به سه گروه زیر تقسیم شدند: الف) حیوانات تیمار شده با دوز کم NS. حیوانات این گروه 0/5 mg/kg-lb.wt. from NS دریافت می‌کنند. ب) حیوانات تیمار شده با دوز متوسط NS: حیوانات این گروه 1 mg/kg-lb.wt. from NS دریافت می‌کنند. ج) گروه تیمار شده با دوز بالای NS: حیوانات این گروه 5 mg/kg-lb.wt. from NS دریافت می‌کنند. به منظور تجزیه و تحلیل مکانیسم (ها)، که در آن ذرات NS اثرات بیماری‌زایی دارد، ذرات NS (50-60 نانومتر) به صورت درون‌صفاقی تجویز می‌شود (Shin and Ye, 2012). حیواناتی که 0/5 میلیگرم/کیلوگرم دریافت کردند، در معرض یک غلظت سازگار با محیط قرار گرفتند (0/00047 میلی‌گرم/کیلوگرم/ روز، دوز دهانی و 0/000027 میلی‌گرم/کیلوگرم/روز، دوز پوستی). حیوانات دریافت‌کننده‌ی 1 میلی‌گرم/کیلوگرم، در معرض یک غلظت سازگار با محیط قرار گرفتند (0/00094 میلی‌گرم/کیلوگرم، دوز دهانی و 0/00056 میلی‌گرم/کیلوگرم/روز) و در نهایت حیوانات دریافت‌کننده‌ی 5 میلی‌گرم/کیلوگرم در معرض غلظت‌های 10 برابری قرار گرفتند. مدت زمان دریافت مواد شیمیایی برای هر سه گروه، 35 روز بود. قبل و بعد از آزمایش، به منظور ارزیابی هر گونه تغییر در وزن کل بدن مرتبط با تیمار، حیوانات به صورت جداگانه وزن شدند. وزن بیضه نسبت به وزن بدن به مدت 35 روز مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌های خون و بافت:

پس از 35 روز، نمونه‌های خون به طور مستقیم از قلب تحت بیهوشی (تامین شده با استفاده از دی‌اتیل‌اتر) گرفته شدند. برای به دست آوردن سرم، نمونه‌ها پس از 15 دقیقه در دمای اتاق، در 3000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس نمونه‌های سرم آماده شده در دمای 70- درجه سلسیوس برای آنالیزهای بعدی نگهداری شدند. بلافاصله پس از نمونه‌گیری خون، حیوانات با استفاده از گاز دی‌اکسید کربن در دستگاه خاص CO2 (Urum ADACO، ایران) بیهوش شدند. نمونه‌های بیضه بلافاصله جدا شده و با نرمال سالین سرد شستشو شدند. یکی از نمونه‌های بیضه‌ی هر موش به صورت ناگهانی در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس تا انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی بیشتر، در دمای 70- درجه سلسیوس نگهداری شده و بیضه‌ی سمت دیگر برای آزمایش‌های بافت‌شناسی در محلول بوئن تثبیت شدند.

تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی:

نمونه‌های بیضه از پیش تثبیت شده، توسط میکروتوم دوار (Microm, Germany) در پارافین (5-6 میکرومتر) قرار گرفتند. به منظور تشخیص هسته اپیتلیوم ژرمینال، برش‌ها (5-6 میکرومتری) با Iron-Weigert (پژوهش آسیا، ایران) رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدهای آماده شده زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی‌های متعدد (400 x و 1000 x) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تعداد سلول‌های لیدیگ در هر یک میلی‌متر مربع از بافت همبند بینابینی شمارش شد. درصد لوله‌های منی‌ساز[6] با بیش از 3-4 لایه ژرمینال و درصد لوله‌های با اسپرمیوژنز طبیعی به ترتیب به عنوان لوله‌هایی با شاخص تمایز لوله‌ای مثبت (TDI[7]) و شاخص اسپرمیوژنز مثبت (SPI[8])، در نظر گرفته شدند. درصد لوله‌های با شاخص بازسازی مثبت (RI[9])، به صورت نسبت اسپرماتوگونی فعال (اسپرماتوگونی نوع B با هسته روشن در روش رنگ‌آمیزی Iron-Weigert) برای اسپرماتوگونی غیرفعال (اسپرماتوگونی نوع A با هسته تیره در رنگ‌آمیزی Iron-Weigert) محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی:

در روز پنجاه و پنجم، بیضه سمت چپ برداشته شده و در محلول تثبیت‌کننده‌ی بوئن تثبیت شد. نمونه‌ها در پارافین

[6] seminiferous tubules
[7] tubular differentiation index
[8] positive spermiogenesis index
[9] Repopulation index

گذاشته شده، با میکروتوم دوار (5-6 میکرومتر) برش داده شدند. رنگ‌آمیزی خاص Iron- Weigert به منظور واضح کردن هسته سلول‌های ژرمینال برای تجزیه و تحلیل تمایز لوله‌ای، شاخص بازسازی و آنالیز مورفومتریک tunica alboginea انجام شد. تمام نمونه‌ها با بزرگنمایی‌های مختلف (400 x و 1000 X) مورد بررسی قرار گرفتند. برای کمی‌سازی سلول و ابعاد آن در 100 لوله اسپرم‌ساز (در یک نمونه)، از دستگاه لنز مورفومتریک 100 میکرومتری استفاده شد. ابعاد در 1 میکرومتری بیان شد. تعداد سلول‌های لیدیگ و سلول‌های سرتولی به ترتیب در هر 2 میلی‌متر از بافت همبند بینابینی و در هر ST از 100 ST از هر نمونه شمارش شد. قطر عروق بافت بینابینی همبند در 200 برش (6 میکرومتر) با استفاده از لنز مورفومتریک برآورد شد.

تعیین شاخص تمایز لوله‌ای (TDI[10]):

به منظور تخمین TDI، درصد ST های با بیش از سه لایه سلول زاینده تمایز یافته از اسپرماتوگونی نوع A، 200 برش (6 میکرومتر) آماده شد و ST های با بیش از سه لایه به عنوان TDI مثبت در نظر گرفته شدند.

محاسبه شاخص بازسازی (RI):

برای تعیین شاخص بازسازی، رنگ‌آمیزی خاص lron-Weigert به منظور تشخیص سلول‌های اسپرماتوگونی انجام شد. سلول‌ها با هسته تیره رنگ، به عنوان اسپرماتوگونی نوع A (سلول‌های غیرفعال) و سلول‌های با هسته‌ی کم‌رنگ به عنوان اسپرماتوگونی نوع B (سلول‌های فعال) در نظر گرفته شدند. بدین منظور، نسبت اسپرماتوگونی فعال به اسپرماتوگونی غیر فعال در STs در 200 برش آماده شده همانطورکه پیش از این بیان شده بود محاسبه شد. درصد لوله‌های با شاخص بازسازی مثبت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و نتاسج به صورت درصد لوله‌های با شاخص بازسازی مثبت نشان داده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه داده ها با استفاده از آزمون t زوجی برای مقایسه پارامترهای کمی با اشاره به اندام های زوج در یک گروه قرار گرفت. همه ارزش ها به صورت میانگین ± SD بیان شد. برای تعیین رگرسیون بین سلول های لیدیگ و سرتولی

[10] Tubular differentiation index

شماره آزمون کای دو استفاده شد. احتمال از $P < 0.05$ از نظر آماری معنیدار در نظر گرفته شد.

All data were analyzed using paired t-test to compare quantitative parameters referring to paired organs within a group. All values were expressed as mean ± SD. To determine the regression between the Leydig and Sertoli cells number the chi- square test was used. A probability of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

ارزیابی تستوسترون:

نمونه‌های خون حیوانات جمع‌آوری شده و نمونه‌های سرم توسط سانتریفوژ (3000 g به مدت 5 دقیقه) آماده شدند و برای ارزیابی غلظت سرمی تستوسترون بررسی شدند. تستوسترون با استفاده از کیت رقابتی ایمونواسی chemiluminescent (Diagnosis Related Groups Co., Germany) مورد بررسی قرار گرفت.

TAC سرم

به منظور تعیین اثر مواجهه با فرمالدهید بر سیستم تنش اکسیداتیو، TAC در گروه کنترل شم و آزمون اندازه‌گیری شد. این تحقیق بر اساس آزمون کاهش قدرت آنتی‌اکسیدانی فریک (FRAP[11]) انجام شد. به طور خلاصه، در pH پایین تامین شده با استفاده از بافر استات (300 میلی‌مولار، pH= 3/6)، کاهش کمپلکس Felll-TPTZ به فرم فروس، باعث تولید رنگ آبی تند شده که می‌توان در 593 نانومتر آن را اندازه‌گیری کرد. شدت کمپلکس پس از افزودن حجم مناسبی از سرم به محلول قابل کاهش FeIII-TPTZ، به طور مستقیم به قدرت کاهش کل آنتی‌اکسیدان دهنده‌ی الکترون مربوط است. محلول آبی FeII (FeS04.7H20) و غلظت مناسب اسید آسکوربیک تازه به ترتیب به عنوان محلول‌های بلنک و استاندارد در نظر گرفته شدند.

تغییر بافت‌شناسی

آزمایش‌های بافت‌شناسی نشان داد که در حیوانات مواجه شده با فرمالدهید، ضخامت غلاف سفید بیضه[12] افزایش یافت. ادم دورعروقی و زیر کپسولی در گروه آزمون مشاهده شد. ترومبوز قابل‌توجه در عروق بافت بینابینی و کپسولی نشان

[11] ferric reduction antioxidant power
[12] tunica albuginea

داده شد. نفوذ سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای در بافت همبند گروه در معرض فرمالدهید مشاهده شد (شکل 1). در حالی که هیچ تغییر بافتی در گروه شاهد مشاهده شد. داده‌های نفوذ سلول‌های ایمنی در شکل 2 ارائه شده است.

انحطاط شدید در سلول‌های اپیتلیوم ژرمینال بیشتر از 50٪ STs حیوانات مواجه شده با فرمالدهید مشاهده شد. علاوه بر این، اسپرماتوزوئیدها به ندرت در لومن ST's مشاهده شدند و از روند اسپرماتوژنز ممانعت شده بود (شکل 1). مشاهدات نشان داد که در حیوانات قرار گرفته در معرض فرمالدهید، افزایش قابل توجه درصد STs با انحطاط شدید سلول‌های اپیتلیوم ژرمینال اتفاق افتاد. در گروه آزمایشی، کاهش طول اپیتلیوم ژرمینال مشاهده شد. بر این اساس، در حیوانات گروه مواجهه شده با فرمالدهید افزایش قابل توجه STs با TDI مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی RI، افزایش درصد لوله‌های با RI منفی را در موش القا شده توسط فرمالدهید نشان دادند (شکل 3). داده‌های هیستومورفومتریک بافت بیضه در جدول 2 ارائه شده است. آنالیزهای بافت شناسی، کاهش آشکار تعداد سلول‌های لیدیگ را در هر 2 میلی‌متر از بافت همبند بینابینی همراه با هیپرتروفی سلولی نشان داد. تعداد سلول‌های سرتولی در لوله منی‌ساز حیوانات القا شده با فرمالدهید در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (شکل 4 و 5).

* ستاره نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه مواجه شده با فرمالدهید است ($P < 0.05$).

استنشاق فرمالدئید منجر به افزایش قابل‌توجه ناهنجاری اسپرم شد ($P < 0.05$)، بر این اساس، در حیوانات گروه مواجه شده با فرمالدهید، 75٪ اسپرم نابالغ از نظر مورفولوژی (اسپرم با ریزقطره‌ی سیتوپلاسمی) مشاهده شد. درصد اسپرم-های متحرک در موش‌های القا شده با فرمالدهید، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). داده‌های پارامترهای اسپرم در جدول شماره 3 آورده شده است. در حیوانات گروه کنترل سطح تستوسترون طبیعی بود ($P < 0.05$) (شکل 6). در حیوانات گروه در معرض فرمالدهید، سطح TAC در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). داداه‌های سرم TAC در شکل 7 نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی Hsp70-2:

اسلایدهای برش بافت در 60 درجه سلسیوس به مدت 25 دقیقه در یک آون هوایی گرم (Venticell، آلمان) حرارت

داده شدند. پارافین برش‌های بافت در زایلن جدا شده[۱۳] و با استفاده از گرادیانت‌های الکل دوباره هیدراته شدند. فرایند بازیابی آنتی‌ژن در بافر سدیم سیترات 10 میلی مولار انجام شد. به طور خلاصه، پراکسیداز درونی در یک محلول مسدود کننده پروکسیداز (0/03 درصد هیدروژن پروکسید حاوی سدیم آزید 0/05 (w/v)) به مدت 5 دقیقه مسدود شد. برش‌های بافت به آرامی با بافر شستشو شسته شدند و پس از آن با Hsp70 (1: 500) آنتی‌بادی‌های اولیه بیوتینیله به مدت 18 ساعت در دمای 4- درجه سلسیوس انکوبه شدند. برش‌ها به آرامی با بافر شستشو شسته شده و در حمام بافر قرار داده شدند. سپس اسلایدها در یک محفظه مرطوب با مقدار کافی از استرپتاویدین-HRP قرار داده شدند (استرپتاویدین کونژوگه شده به پراکسیداز ترب کوهی در بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی یک عامل ضد میکروبی). اسلاید به مدت 15 دقیقه انکوبه شدند. پس از آن، برش‌های بافت به آرامی بافر شستشو شسته شده و در حمام بافر قرار داده شدند. یک کروموژن DAB به برش‌های بافت افزوده شده، به مدت 5 دقیقه انکوبه شده، شستشو داده شده و با هماتوکسیلین به مدت 5 ثانیه رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن، برش‌ها در آمونیاک ضعیف (0/037 M/L) 10 مرتبه غوطه‌ور شده، با آب مقطر شسته شدند. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مثبت به صورت لکه‌های قهوه ای زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. شدت مقدار پیکسل برای کروموژن قهوه‌ای با استفاده از نرم افزار image pro insight (Media Cybernetics, USA) برای هیستوگرام ارزش پیکسل مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی اسپرم و ارزیابی آسیب DNA:

بافت‌های اپیدیدیم، در بزرگنمایی 10 برابر میکروسکوپ Stereo Zoom (TL2, Olympus Co., Tokyo) با دقت از بیضه جدا شدند. اپیدیدیم چپ به سه بخش تقسیم شد: سر، بدنه و دم. دم اپیدیدیم در 5 میلی لیتر از محیط کشت TCM 199 به مدت 30 دقیقه، 6٪ CO2، دمای 36/5 درجه سلسیوس در دستگاه کشت CO2 (LEEC, England) پیرایش و تکه تکه شد. پلت اسپرم پس از سانتریفیوژ، دوباره در 0/5 میلی‌لیتر از محیط کشت TCMl 99 سوسپانسیون شد. یک بخش کوچک (20 میکرولیتر) از سوسپانسیون اسپرم، با شیشه آغشته شد. اسلاید هوا خشک شده و پس از آن به مدت یک شب در محلول Camoy (متانول/ اسید استیک، 3: 1) تثبیت شدند. اسلایدها

[13] de-paraffinized

پس از شسته شدن و هوا خشک شدن، به مدت 5 دقیقه با رنگ آکریدین نارنجی (AO[14]) تازه آماده شده رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدها پس از شستشو و خشک کردن، با استفاده از یک میکروسکوپ فلورسنت (Leitz, Germany؛ 450-490 نانومتر) مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی با AO، بلافاصله مشاهده شدند. هر نمونه به مدت چند ثانیه زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد. روی هر اسلاید به طور متوسط 100 اسپرم شمارش شد. درصد اسپرماتوزوآ با DNA تک‌رشته محاسبه شد (Tejada et al., 1984).

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC[15]) مالون‌دی‌آلدئید:

0/3-0/4 گرم از بافت بیضه در KCL سرد (150 میلی‌مولار) هموژنایز شده و سپس مخلوط در 3000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی (سوپرناتانت) برای ارزیابی TAC و MDA استفاده شد. ارزیابی TAC بر اساس روش قدرت آنتی‌اکسیدانی کاهش فریک (FRAP[16]) همانطور که قبلا گزارش شده بود، انجام شد (Benzie and Strain, 1999). برای تعیین نرخ پراکسیداسیون لیپیدی، مقدار MDA نمونه‌های جمع‌آوری شده‌ی بیضه با استفاده از واکنش اسید تیوباربیتوریک (TBA[17]) همانطور که قبلا توضیح داده شده بود، اندازه‌گیری شد (Niehaus and Samuelsson, 1951). مقدار MDA به صورت نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین نمونه بیان شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش لوری اندازه‌گیری شد (Lowry et al., 1951). از 500 میکرولیتر از اسپرم جمع‌آوری شده از epididymal cauda، برای ارزیابی سطح TAC و MDA با همان روش ذکر شده برای بافت، استفاده شد.

نتایج:

تغییرات بافت‌شناسی:

آتروفی شدید لوله‌های اسپرم‌ساز و ادم قابل‌توجه در بافت همبند در حیوانات تیمار شده با NS مشاهده شد. علاوه بر این، در حیوانات تیمار شده با NS، افزایش درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با TDI و SPI منفی نسبت به گروه کنترل شم مشاهده شد. این اختلالات وابسته به دوز هستند. در یک ضعیت وابسته به دوز، در حیوانات تیمار شده با NS، کاهش

[14] acridine-orange dye
[15] total antioxidant capacity
[16] ferric reduction antioxidant power
[17] thiobarbituric acid

معنی‌دار طول اپیتلیوم ژرمینال و قطر لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل 3.A، 3.B، 3.C، 3.D، 3.E، 3.F، 3.G، 3.H). هیچ تغییر هیستوپاتولوژیکی در گروه کنترل شم مشاهده نشد. داده‌های تجزیه و تحلیل هیستومورفومتریک در جدول ارائه شده است. NS باعث افزایش آسیب به RNA و کاهش بیان Hsp70-2 در سطح اپیتلیوم ژرمینال می‌شود. در گروه تیمار شده با دوز بالا NS (5 mg/kg) بیشترین درصد لوله‌های با RNA آسیب-دیده در اپیتلیوم ژرمینال مشاهده شد. تجزیه و تحلیل IHC به منظور روشن شدن بیان HSp70-2 در لایه‌های مختلف سلولی اپیتلیوم ژرمینال انجام شد. مشاهدات نشان داد که در حیوانات تیمار شده با دوز پایین NS (0/5 mg/kg) (به خصوص در دودمان اسپرماتوسیت و سلول‌های اسپرماتید)، در مقایسه با گروه کنترل شم، بیوسنتز Hsp70-2 افزایش یافت (شکل SA، 5.B، 5.C، D.5، 5.E، 5.F، 5.G، 5.H). در ضمن ، کاهش معنی‌دار آن در گروه تیمار شده با دوز متوسط (1 mg/kg) و دوز بالای NS (5 mg/kg) نیز مشاهده شد. مشخصات طرح محل‌های واکنشی سلول‌های IHC مثبت در 100 میکرومتر از بافت کاهش یافته که این کاهش وابسته به دوز است (شکل A.6، 6.B، 6.C، 6.D). تجزیه و تحلیل نیمه کمی RT-PCR، نتایج IHC را تایید کرد. در حیوانات تیمار شده با دوز کم NS (0/5 mg/kg)، افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) سطح Hsp70-2 mRNA مشاهده شد. با این حال، سطح Hsp70-2 mRNA در حیوانات تیمار شده با دوز متوسط (1 mg/kg) و دوز بالای NS (5 mg/kg) باعث کاهش یافت (شکل A.7، 7.B). تجویز NS وابسته به دوز، منجر به کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) محتوای RNA کل و سطح پروتئین کل بافت بیضه شد. بررسی ارتباط بین سطح RNA کل و پروتئین نشان داد که یک همبستگی مثبت بین کاهش مقدار RNA و کاهش مقدار پروتئین کل بیضه در حیوانات تیمار شده با NS وجود دارد (شکل A.8، 8.B، 8.C).

مقدار کاهش‌یافته TAC بیضه و اسپرم و مقدار افزایش یافته‌ی MDA با NS:

وضعیت آنتی‌اکسیدانی بیضه و اسپرم در گروه تیمار شده با NS به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). بر این اساس، در حیوانات تیمار شده با دوز بالا NS (5 mg/kg) پایین‌ترین سطح TAC در مقابل گروه تیمار شده با دوز کم (0/5 mg/kg) و دوز متوسط (1 mg/kg) مشاهده شد. علاوه بر این وابستگی به دوز NS، منجر به افزایش قابل

توجه ($P < 0.05$) MDA بیضه بدون تغییر بیوشیمیایی در حیوانات کنترل شم شد (شکل IO.A، 10.B).

بحث:

بسیاری از مطالعات قبلی نشان دادند که ذرات NS اثرات دژنراتیو بر کبد، کلیه، بافت عصبی (Reddy et al., 2008; Limbach et al.,2007) و حتی سیستم تنفسی دارد (Aaseth et al., 1981). در مطالعه حاضر، شواهدی برای نشان دادن اثر نامطلوب تیمار NS بر بیضه‌ها و سطح اسپرم ارائه شده است. در حیوانات تیمار شده با NS، کاهش درصد TDI، RI، SPI، افزایش آسیب به RNA سلول‌های زاینده و کاهش کیفیت اسپرم مشاهده شد. برای درک مکانیسم (های) درگیر، فعالیت غدد درون‌ریز بیضه با ارزیابی ویژگی‌های بافت شناسی سلول‌های لیدیگ، فعالیت استروئیدسازی و آسیب به RNA انجام شد. از سوی دیگر، بر بیوسنتز همراه چاپرون Hsp70-2 در لایه‌های مختلف اپیتلیوم ژرمینال و همچنین سلول‌های لیدیگ تمرکز شده است. علاوه بر این، سطح Hsp70-2 mRNA در تمام گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد که NS، باعث افزایش وابسته به دوز آسیب به RNA در هر دو سلول لیدیگ و ژرمینال و کاهش توزیع سلول‌های لیدیگ و همچنین فعالیت‌های استروئیدساز می‌شود. در حیوانات تیمار شده با NS، کاهش معنی‌دار بیان Hsp70-2 در دوزهای بالاتر اتفاق افتاد. در نهایت، داده‌های ما نشان داد که استفاده از NS باعث کاهش تنظیم وضعیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش مقدار MDA و NO در سطح بیضه و اسپرم شد. به عنوان یک یافته اصلی، تجزیه و تحلیل ما نشان داد که NS به طور مستقیم بر بافت بیضه تاثیر می‌گذارد. بر این اساس، وزن کل بدن حیوانات تیمار شده با NS، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل شم ندارد. در ضمن، وزن بیضه نسبت به وزن بدن، نسبت به حیوانات گروه کنترل شم، به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. این تغییرات ممکن است به تاثیر دژنراتیو ذرات NS بر بافت بیضه نسبت داده شود.

این فرضیه توسط کاهش کانون استروئید در سلول‌های لیدیگ و کاهش سطح تستوسترون پشتیبانی می‌شود. از سوی دیگر، تحلیل بافت‌شناسی ما نشان داد که NS، در یک وضعیت وابسته به دوز، باعث کاهش تعدادسلول‌های لیدیگ در هر 2 میلی‌متر از بافت همبند، افزایش توزیع سلول‌های لیدیگ هیپرتروفی شده و در نتیجه آسیب شدید به RNA در این سلول‌ها می‌شود. بنابراین، می‌توانیم نتیجه‌گیری کرد که علاوه بر اختلال القا شده توسط NS در محور هیپوفیز-

گناد، کاهش وضعیت درون‌ریز بیضه از طریق تاثیر مستقیم سلول‌های لیدیگ اتفاق می‌افتد. به منظور درک مکانیسم حاکم بر تاثیر NS بر وضعیت درون‌ریز بیضه، باید توجه داشت که یک همبستگی appositional بین تخلیه آندروژن و افزایش استرس اکسیداتیو وجود دارد. به عنوان نتیجه‌ای از تنش اکسیداتیو ناشی از نقص آندروژن، نرخ آپوپتوز در سلول‌های زاینده افزایش می‌یابد (Lue et al., 1990; Agarwal et al., 1994; Dierich et al., 1998). از سوی دیگر، تنش اکسیداتیو ایجاد شده به صورت پاتولوژیکی بر DNA، RNA، و محتوی پروتئین‌های سلولی آسیب-دیده و دست‌نخورده تاثیر می‌گذارد و در نهایت منجر به پراکسیداسیون پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود (Agarwal et al., 1994; Agarwal et al.,2008). به منظور نشان دادن این اختلالات، سطح TAC بیضه و اسپرم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی ما نشان داد که NS باعث تنظیم کاهشی TAC در سطح بیضه و اسپرم می‌شود. محققان قبلی نشان دادند که گونه فعال اکسیژن و نیتروژن افزایش‌یافته به صورت پاتولوژیکی (ROS/RNS) شامل سوپراکسیدازها، پراکسیدها و اکسید نیتریک (NO)، باعث آپوپتوز/ نکروز سلولی از طریق القای تغییرات ساختاری و بیوشیمیایی می‌شود (Calabrese et al., 2000; Forlenza and Miller, 2006).

IHC تجزیه و تحلیل نیمه کمی RT-PCR نشان داد که در حیوانات قرار گرفته در معرض دوز پایین NS (0/5 mg/kg)، بیان Hsp70-2 نسبت به کنترل گروه شم افزایش یافت. با این حال، در حیوانات تیمار شده با دوزهای متوسط (0/5 mg/kg) و بالای NS نیز کاهش معنی‌دار بیان Hsp70-2 در سطح IHC و mRNA مشاهده شد. با توجه به این یافته‌ها، می‌توان پیشنهاد کرد که تحت شرایط تنش پایین‌تر (تنش NOS/ROS القا شده با دوز پایین NS و تخلیه اندروژن)، بیان بیش از حد Hs70-2 در بافت بیضه برای کنترل اختلالات ناشی از استرس اتفاق افتاد. در مقابل، در دوزهای بالاتر، NS از طریق مکانیسم مختلف عمل می‌کند. در واقع، عوامل مختلف محرک، از جمله دیسموتاز، رادیکال‌های آزاد و NO تاثیر معکوسی بر ساختار پروتئین‌های سلولی حتی Hsp70-2 دارد (Kaur and Bansal, 2003). در کنار این واقعیت، باید توجه داشت که ذرات NS قادر به اتصال محکم به پروتئین، چربی و DNA بوده و به تبع آن باعث پراکسیداسیون قابل توجه در این سطوح می‌شوند (Lamb et al., 2010). بنابراین، می‌توان فرض کرد که در حیوانات تیمار شده با دوز بالای NS، آسیب‌های ناشی از NS در ارتباط با اختلالات ناشی

از NOS /ROS منجر به آسیب قابل توجه در سطح پروتئین و Hsp70-2 RNA می‌شوند. کاهش بیوسنتز و سطح Hsp70-2 mRNA مرتبط با کاهش معنی‌دار سطوح کل RNA و پروتئین، این فرضیه را تایید می‌کند. گزارش شده است که اسپرماتوسیت‌های بدون Hsp70-2 نمی‌توانند میوز خود را کامل کنند و به دنبال آن از طریق آپوپتوز حذف می‌شوند (Tesarik, 1998). بنابراین می‌توان پیشنهاد داد که NS منجر به ایجاد آسیب‌های شدید در سطوح سلول اسپرماتوسیت (مشخص شده با TDI و SPI کاهش یافته) از طریق تأثیر بر بیان و/یا بیوسنتز Hsp70-2 می‌شوند. علاوه بر این، عملکرد و بیان Hsp70-2 در اواخر مراحل فرآیند اسپرمیوژنز تغییر کرده و به طور خاص با پروتئین‌های بسته‌بندی-DNA اختصاصی اسپرماتید همراه است (Govin et al., 2006). به عبارت دیگر، سنتز پروتئین‌های انتقالی 1و 2 بسته‌بندی‌کننده‌ی DNA و پروتامین‌های 1 و 2 تا حد زیادی به بیان چاپرون‌های Hsp70-2 بستگی دارد (Zhu et al., 1997; Govin et al., 2006). تجزیه و تحلیل بلوغ هسته‌ای اسپرم نشان داد که درصد اسپرم‌های با تراکم کروماتین، به صورت وابسته به به دوز تجویزشده‌ی NS کاهش یافت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که NS تا حدی باعث کاهش پروتامین از طریق تنظیم کاهشی بیان Hsp70-2 می‌شود. در این راستا، اسپرم با بسته‌بندی DNA مختل شده، در مقابل تنش‌های اکسیداتیو و نیتروساتیوبسیار حساس هستند (Malekinejad et al., 2012; Razi et al., 2011). در راستای این موضوع، درصد اسپرم با آسیب DNA در حیوانات تیمار شده با NS افزایش یافته بود. آرایش ویژه اسیدهای چرب اشباع نشده ، پلاسمالوژن‌ها و اسفنگومیلین‌ها در غشاء سلول اسپرم مسئول حساسیت این سلول‌ها نسبت به رادیکال‌های آزاد ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی هستند (Sanocka and Kurpisz, 2004). به منظور شناسایی اثر تنش اکسیداتیو ناشی از NS بر پراکسیداسیون لیپیدی در سطح اسپرم، زنده‌مانی اسپرم و مقدار MDA تجزیه و تحلیل شد. مشاهدات نشان دادند که زنده‌مانی اسپرم در حیوانات تیمار شده با NS کاهش یافته و سطح MDA بسته به دوز تجویز شده افزایش یافته است. تجزیه و تحلیل بیشتر TAC اسپرم، کاهش قابل توجه سطح TAC نمونه‌های اسپرم گروه تیمار شده با NS را نشان داد. بنابراین، منطقی است که فرض کنیم که پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از NS مرتبط با تنش اکسیداتیو نای از NS منجر به کاهش زنده‌مانی اسپرم و در نتیجه از دست دادن تحرک اسپرم می‌شود (شکل 12). فرضیه حاضر با مطالعات دیگر در

مورد اثر رادیکال‌های آزاد بر زنده‌مانی و تحرک اسپرم نشان داده شده است (Sanocka and Kurpisz, 2004; Aticken and Sawyer, 2003).

نتیجه‌گیری

اطلاعات ما نشان داد که NS اثرات مضر خود را بدین صورت اعمال می‌کند: 1) کاهش وضعیت درون ریز در هر دو سطح هیپوفیز و بیضه، 2) افزایش تنش اکسیداتیو و نیتروساتیو، 3) تنظیم کاهشی بیان/بیوسنتز چاپرون Hsp70-2، 4) افزایش آسیب RNA در دودمان سلول‌های بیضه 5) کاهش کیفیت اسپرم. در ادامه، کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و بیان Hsp70-2 همراه با افزایش تنش نیتروساتیو منجر به آسیب شدید در DNA، RNA و پروتئین سلول‌های بیضه و همچنین اسپرم می‌شود.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی