

## ارزیابی ایمنووهیستوشیمی در بافت بیضه موش صحرایی نر به دنبال استنشاق ذرات PM2.5

الناز نوشادی راد<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، سعید متصدی زرنندی<sup>۳</sup>، پژمان مرتضوی<sup>۴</sup>، بتول قربانی یکتا<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [Kazem.parivar41@gmail.com](mailto:Kazem.parivar41@gmail.com)

۳- استاد گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، خیابان شریعتی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** قرار گرفتن مردان در معرض ذرات معلق (PM<sub>2.5</sub>) و آلودگی هوا با گازهای مختلف می‌تواند به طور جدی اسپرم زایی را تهدید کند. با این حال، در مورد مکانیسم مولکولی خاص آن نادانسته‌های زیادی وجود دارد. در مطالعه حاضر به بررسی اثر مواجهه با PM<sub>2.5</sub> و آلودگی‌های گازی بر سیستم اکسیدان، آنتی اکسیدانی، استرس اکسیداتیو و همچنین بررسی تغییرات سطح بیان پروتئین آکوپورین از طریق ایمنووهیستوشیمی و وسترن بلات در بافت بیضه پرداخته شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۳۶ موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: یک گروه کنترل در معرض هوا در شرایط استاندارد، یک گروه گاز که به تنهایی در معرض آلاینده‌های گازی (Gas) قرار داشتند و یک گروه گاز به اضافه PM<sub>2.5</sub> (Gas+PM<sub>2.5</sub>). آلاینده‌ها همه گروه‌ها به مدت سه ماه، چهار روز در هفته و پنج ساعت در روز در معرض قرار گرفتند.

**نتایج:** یافته‌ها نشان می‌دهد که قرار گرفتن همزمان در معرض آلاینده‌های گازی و PM<sub>2.5</sub> باعث افزایش در غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، همچنین کاهش پروتئین آکوپورین ۹ در ایمنووهیستوشیمی و وسترن بلات در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

**نتیجه گیری:** بنابراین قرار گرفتن در معرض PM<sub>2.5</sub> و آلاینده‌های گازی احتمالاً باعث تحریک استرس اکسیداتیو در بیضه شده که منجر به کاهش پروتئین آکوپورین ۹ از طریق فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ می‌شود. به نظر می‌رسد آلودگی PM<sub>2.5</sub> نقش مهمی در بروز ناباروری از طریق اختلال در اسپرماتوزن دارد.

**کلمات کلیدی:** ذرات PM<sub>2.5</sub>، استرس اکسیداتیو، بیضه، آکوپورین ۹

## مقدمه

آلودگی هوا، به ویژه وجود ذرات ریز ( $PM_{2.5}$ ) (Particulate matter)، به دلیل اثرات مضر آن بر سلامت انسان، یک نگرانی رو به رشد جهانی است. امروزه تحقیقات گسترده بر روی اثرات تنفسی و قلبی عروقی  $PM_{2.5}$  متمرکز شده است، تأثیر بالقوه آن بر سلامت انسان بسیار مورد توجه قرار دارد (۱).

در میان آلاینده‌های مختلف،  $PM_{2.5}$  به ذرات ریز با قطر کمتر از  $2.5$  میکرومتر اشاره دارد که می‌توانند در هنگام استنشاق به اعماق سیستم تنفسی نفوذ کنند. مطالعات متعدد قرار گرفتن در معرض  $PM_{2.5}$  را با پیامدهای نامطلوب سلامتی، از جمله بیماری‌های تنفسی، اختلالات قلبی عروقی و حتی اختلالات عصبی مرتبط دانسته‌اند. با این حال، تأثیر  $PM_{2.5}$  بر سلامت باروری، به‌ویژه از اثرات آن بر بافت بیضه، اطلاعات علمی محدود است (۲). بیضه‌ها نقش مهمی در عملکرد تولید مثل مردان دارند و مسئول تولید اسپرم و تنظیم هورمون هستند (۳). هر گونه اختلال در بیضه می‌تواند منجر به اختلال در اسپرم زایی و به خطر افتادن باروری شود. با افزایش شیوع آلودگی هوا و پتانسیل آن برای تأثیرگذاری بر سیستم‌های ارگان‌های مختلف، بررسی پیامدهای خاص قرار گرفتن در معرض  $PM_{2.5}$  بر بافت بیضه ضروری می‌شود. چندین مکانیسم قابل قبول برای توضیح رابطه بین آلودگی هوا و سلامت باروری مردان پیشنهاد شده است. استنشاق ذرات  $PM_{2.5}$  می‌تواند طیف وسیعی از اجزای سمی از جمله فلزات سنگین، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) و مواد شیمیایی مختل کننده غدد درون ریز را وارد گردش خون سیستمیک کند. این مواد می‌توانند در بیضه‌ها تجمع کرده و فرآیندهای سلولی طبیعی را مختل کنند و منجر به اثرات نامطلوب بر کیفیت، کمیت و عملکرد کلی تولید مثل اسپرم شوند (۳).

آکوپورین‌ها پروتئین‌های غشایی هستند که انتقال آب و املاح کوچک را در غشای سلولی تسهیل می‌کنند. در میان آنها،  $AQP9$  (Aquaporin9) به عنوان یک عامل کلیدی در حفظ تعادل اسمزی در بافت‌های مختلف از جمله بیضه‌ها شناسایی شده است. تعداد فزاینده‌ای از شواهد نشان می‌دهد که تغییرات در بیان  $AQP9$  ممکن است با شرایط پاتولوژیک موثر بر عملکرد بیضه مرتبط باشد (۴). بررسی تأثیر بالقوه قرار گرفتن در معرض  $PM_{2.5}$  بر سطوح بیان  $AQP9$  می‌تواند اطلاعاتی را در مورد مسیرهای مکانیکی زمینه‌ای آسیب بیضه ناشی از ذرات ریز گرد و غبار فراهم کند.

مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، در اختلال  $ROS$  (reactive oxygen species) علاوه بر این استرس اکسیداتیو، عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن در عملکرد بیضه نقش دارد. تولید بیش از حد  $ROS$  می‌تواند عملکرد اسپرم را مختل کند، اسپرم زایی را مختل کند و منجر به آسیب  $DNA$  شود. ذرات  $PM_{2.5}$  حاوی اجزای سمی هستند که می‌توانند  $ROS$  را از طریق چرخه ردوکس و مکانیسم‌های دیگر تولید کنند (۱). افزایش تولید  $ROS$  می‌تواند دفاع آنتی‌اکسیدانی درون زا را تحت تأثیر قرار دهد و منجر به آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و  $DNA$  در بافت بیضه شود. این استرس اکسیداتیو ممکن است به اختلال عملکرد بیضه، اختلال در کیفیت اسپرم و مشکلات باروری کمک کند. در این مطالعه اثر مواجهه با  $PM_{2.5}$  بر تغییرات ایمونوهیستوشیمی مارکر آکوپورین ۹، وسترن بلات و استرس اکسیداتیو در بافت بیضه مدل موش صحرایی پس از ۳ ماه مواجهه با  $PM_{2.5}$  مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

مکان و دوره‌ی زمانی انجام مطالعه

فیلتر هوای کربن فعال برای حذف PM و گاز به محفظه پمپ شد.

در اتاقک مواجهه ۱ (PM<sub>2.5</sub>) به همراه گازهای آلاینده) هوای آزاد با دبی ۱۲ l/min توسط دستگاه نمونه‌بردار ذرات حجم کم ( Low volume sampler (LVS) Echo ) PM (Tecora Echo PM – TCR Tecora Italy) و بدون فیلتر نمونه‌برداری به داخل اتاقک دمیده می‌شد و هوای وارد شده از طریق روزنه‌ای با قطر ۳ cm که در بالای اتاقک قرار داشت خارج می‌شد.

در اتاقک مواجهه ۲ آلاینده‌ها گروه گاز به تنهایی در معرض آلاینده‌های گازی بود. در این حالت شیر ورودی پمپ و کیوم دارای فیلتر هپا مدل H13 جهت حذف PM می‌باشد. فیلتر هپا کلاس H13 می‌تواند ۹۷/۹۹ درصد گرد و غبار ریز را حذف کند. بنابراین، تنها آلاینده‌های گازی را می‌توان در هوای خروجی یافت (۵). جهت تنظیم خواب موش‌های صحرایی، نور در آزمایشگاه پیلوت حیوانات توسط یک لامپ خودکار به صورت ۱۲ ساعت خاموش و ۱۲ ساعت روشن، تنظیم شد (۵).

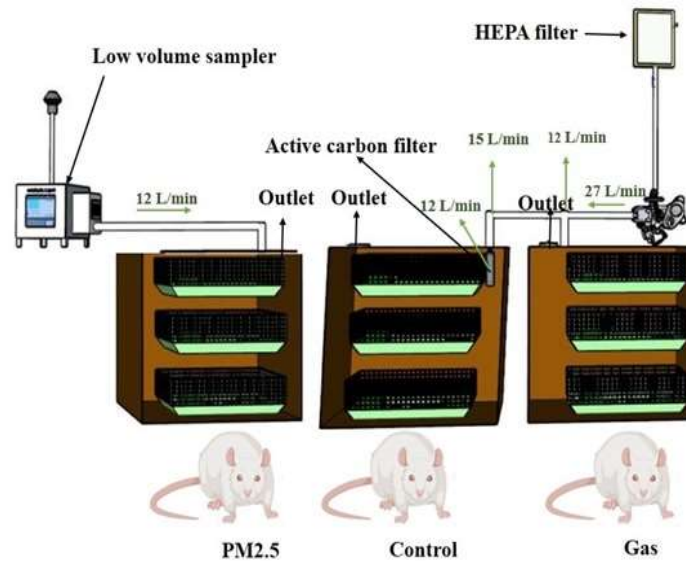
محل انجام آزمایش در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در شمال شهر تهران و در مختصات جغرافیایی ( E °۵۱/۳۹۴۷ و N °۳۵/۷۹۹۱) قرار داشت. اتاقک مواجهه ۱ و اتاقک مواجهه ۲ و اتاقک کنترل در آزمایشگاه پیلوت حیوانات که در ارتفاع تقریباً ۲۰ m از سطح زمین قرار داشت، طراحی و ساخته شد. مطالعه در مدت زمانی ۳ ماه انجام شد. بر اساس مطالعات مشابه، مواجهه برای ۴ روز در هفته و هر روز ۵ ساعت (۹ الی ۱۴) انجام شد (۵).

### طراحی آزمایش

#### طراحی اتاقک مواجهه

سه اتاقک برای انجام آزمایش طراحی شد که در شکل ۱ آورده شده است. اتاقک گروه کنترل که شامل هوای با شرایط استاندارد می‌شود. اتاقک مواجهه ۱ که شامل PM<sub>2.5</sub> به همراه گازهای آلاینده می‌شود و اتاقک مواجهه ۲ که شامل گازهای آلاینده به تنهایی می‌شود.

در اتاقک گروه کنترل از طریق یک پمپ خلاء فیلتر شده HEPA مدل H13 (SungJin Co., Ltd., Korea) و یک



شکل ۱- اتاقک‌های گروه‌های مورد مطالعه تحت معرض. به ترتیب از سمت راست به چپ شامل: گروه دریافت‌کننده آلاینده‌های گازی، گروه کنترل (دریافت‌کننده هوای تمیز با شرایط استاندارد، گروه دریافت‌کننده PM<sub>2.5</sub> و آلاینده‌های گازی).

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); Model 7900 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) به آزمایشگاه شرکت آریا شیمی شریف منتقل و سنجش‌ها انجام شد. مراحل جمع‌آوری و نگهداری  $PM_{2.5}$  براساس مطالعات قبلی انجام گرفت (۷). تجزیه و تحلیل مواد توسط مرجع استاندارد (SRM 1648) براساس مطالعات قبلی گروه ما ارزیابی شد (۶).

#### ارزیابی $PM_{2.5}$ و آلاینده‌های گازی

غلظت  $PM_{2.5}$  همراه با دی‌اکسید گوگرد  $SO_2$  (Sulfur dioxide)، ازن  $O_3$  (Ozone) و دی‌اکسید نیتروژن  $NO_2$  (Nitrogen dioxide) در هوای اتاق حیوانات، به طور مداوم در دوره سه ماهه مورد بررسی قرار گرفت. غلظت  $PM_{2.5}$  براساس روش نظارت بر میرایی بتا و غلظت آلاینده‌های گازی با دستگاه فلورسانس ماورابنفش (UV) (سری Horiba AP-370) براساس مطالعات قبلی گروه ما بررسی شد (۸).

#### نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها

پروتکل‌های این تحقیق بر اساس اصول حیوانات آزمایشی قانون رفاه حیوانات بود. کلیه مراحل آزمایشی انجام شده در این تحقیق مورد تایید کمیته سازمانی اخلاق دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران قرار گرفت و تعداد موش‌های مورد استفاده تا حد امکان به حداقل رسید. یک روز پس از قرار گرفتن در مواجهه با آلاینده‌ها در اتاقک‌ها، از پنتوباریتال سدیم (۱۵۰ میلی گرم بر گرم وزن بدن) برای بیهوشی موش‌ها استفاده شد. بیضه‌ها برداشته شدند. بیضه‌ها در سالین فیزیولوژیک شسته شدند. سپس بیضه سمت راست هر موش برای آنالیز بیوشیمیایی در دمای  $-80^{\circ}C$  درجه سانتیگراد منجمد شد و بیضه چپ هر موش برای آنالیز بافت شناسی در فیکساتیو بوئن تثبیت شد.

#### جنبه‌های اخلاقی

گروه بندی موش‌های صحرایی برای آزمایش مواجهه تعداد ۳۶ موش صحرایی یک ماهه نر از گونه ویستار از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خریداری شد. حیوانات با مکمل‌های آب و غذای معمولی در شرایط مشخص شده بدون پاتوژن (سیکل نور تاریکی ۱۲/۱۲ ساعته با رطوبت  $5 \pm 55\%$  درصد در دمای  $1 \pm 24^{\circ}C$  درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. همچنین میانگین وزن موش‌ها قبل از شروع مواجهه ۸۵ گرم بود و بعد از مدت زمان ۳ ماه وزن موش‌ها به وزن متوسط ۱۷۰ تا ۲۰۰ گرم رسید. موش‌ها به مدت ۱ هفته قبل از انجام آزمایش‌ها سازگار شدند. اتاق‌های نوردهی بر اساس روش توصیف شده توسط زرنندی و همکاران ۲۰۱۹ طراحی شدند و زمان قرار گرفتن در مدت ۳ ماه شامل تقریباً دو چرخه اسپرم‌زایی بود. موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه (۱۲ سر در هر گروه) شامل گروه کنترل (Control)، گروه آلاینده‌های گازی (Gas) و  $PM_{2.5}$  به اضافه گروه آلاینده گازی ( $PM_{2.5}+Gas$ ) تقسیم شدند (شکل ۱). آزمایش در طول دوره گرمایش زمستانی انجام شد.

#### نمونه برداری ذرات $PM_{2.5}$

برای سنجش غلظت کاتیون‌ها، فلزات و PAHs در ذرات  $PM_{2.5}$ ، نمونه برداری انجام شد. در مجاورت سایت مواجهه، نمونه برداری ذرات  $PM_{2.5}$  در هوای آزاد توسط نمونه بردار حجم پایین (Echo PM) ساخت کشور ایتالیا هر ۶ روز یکبار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد (۶). نمونه برداری ذرات  $PM_{2.5}$  در دوره ۲۴ ساعته و از ۹ صبح الی ۹ صبح روز بعد با دبی  $20 \text{ l/min}$  (معادل  $m^3$  ۲۸/۸) انجام شد. از فیلتر فایبرگلاس (Whatman International Ltd., Maidstone England) با قطر  $47 \text{ mm}$  جهت نمونه برداری ذرات  $PM_{2.5}$  استفاده شد. در ادامه جهت تعیین غلظت فلزات (آهن، کادمیوم، سرب، کروم، مس، نیکل، منگنز و آلومینیم) از دستگاه ICP-

اسلایدهای رنگ آمیزی شده به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری مطالعه گردید، در هر لام به طور تصافی در زیر میکروسکوپ، ۱۰ فیلد انتخاب و با عدسی ۴۰، در هر فیلد ۱۰۰ سلول اسپرمتوسیت شمارش شد و نسبت هسته‌ای ایمونوراکتیو به دست آمد و در انتها درصد هسته‌های رنگ گرفته در بین ۱۰۰۰ سلول مشخص شد. ایمینو راکتیویته زیر ۵٪ منفی و بالای ۵٪ مثبت قلمداد گردید. کنترل منفی، رنگ آمیزی اسلایدها بدون آنتی بادی ثانویه بود.

درصد واکنش ایمنی بدون در نظر گرفتن شدت رنگپذیری بوده و فقط میزان رنگپذیری در نظر گرفته شد.

میزان بیان به صورت زیر ارزیابی گردید:

- ۱- ۰٪ (بدون واکنش ایمنی) = ۰ یا منفی
- ۲- ۱-۱۰٪ = ۱+ یا مثبت ضعیف
- ۳- ۱۰-۵۰٪ = ۲+ یا مثبت متوسط
- ۴- ۵۰٪ < = ۳+ یا مثبت شدید

#### تجزیه و تحلیل وسترن بلات

آنالیز وسترن بلات مانند قبل با چند تغییر انجام شد (۱۰، ۱۱). ابتدا بافت ها با استفاده از بافر ریپا لیز شدند. برای از بین بردن لیپات، سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت بیست دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از تعیین غلظت پروتئین با استفاده از کیت Quantification protein Bradford The (طبق دستورالعمل سازنده)، لیزهای بافت و حجم مساوی از بافر نمونه Laemmli X2 با هم مخلوط شدند. سپس لیپات یا Lysates  $\mu\text{g}20$  پس از ۵ دقیقه جوشاندن در معرض PAGE-SDS قرار گرفتند، سپس به غشای immune-PVDF (۰.۲  $\mu\text{m}$ ) (پلی وینیلیدین دی فلوراید) منتقل شد (Bio- Cat No: 162-017777; Rad Laboratories, CA, USA). در مرحله بعد غشاها با ۵٪ BSA (Sigma Cat No: A-7888; Aldrich, MO, USA) در ۰.۱٪ Tween20 به مدت

تمام مراحل مراقبت حیوانی و آزمایشات صورت گرفته کاملاً مطابق با معیارهای کمیته اخلاق مراقبت از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با کد اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1398.055) انجام شد.

#### سنجش استرس اکسیداتیو

##### سطح MDA در بافت بیضه

سطح مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان یک نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه، با روش Ohkawa و همکاران و به کمک کیت سنجش MDA ساخت پادگین طب آنالیز شد (۹). به طور خلاصه ۱۰ میلی گرم از بافت بیضه با ۳۰۰ میکرولیتر Lysis Buffer و ۳ میکرولیتر BHT100x مخلوط شد و سپس هموژن گردید. برای حذف مواد نامحلول، به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به عنوان نمونه در نظر گرفته شد. از مایع رویی برای تجزیه و تحلیل MDA استفاده شد.

#### ایمنووهیستوشیمی

روش ایمنووهیستوشیمی برای بیان Aquaporin9 طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Bioss سفارش طب آسیا) انجام گرفت. در پایان دوره درمان سه ماهه، بافت بیضه موش‌های هر گروه جدا شد. بخشی از بافت تشریح شد و در فیکساتیو بوئن به مدت ۲۴ ساعت ثابت شد. بافت های ثابت به طور معمول پردازش شدند و سپس در پارافین جاسازی شدند و برای تجزیه و تحلیل ایمنووهیستوشیمی به ضخامت ۵ میلی متر برش داده شدند. برای انجام تکنیک ایمنووهیستوشیمی Aquaporin9، ابتدا نمونه ها با آنتی بادی پلی کلونال (AQP9 (Bioss bs-2060R; 1:200, USA) انکوبه شدند و سپس با یک آنتی بادی ثانویه (Abcam, USA, 1:500) در ظرف با استفاده از کیت تشخیص ایمنووهیستوشیمی انکوبه شدند.

جهت بررسی بیان اسلایدهای ایمنووهیستوشیمی اکواپورین ۹ از نرم افزار Image-J استفاده گردید.

شیمیایی افزایش یافته (ECL) دوباره به مدت ۱-۲ دقیقه انکوبه شدند. بیان پروتئین به  $\beta$ -اکتین نرمال شد. برای تراکم سنجی باندهای پروتئینی از نرم افزار آنالایزر ژل نسخه (۲۰۱۰) (USA, NIH) استفاده شد، به این صورت که سطح درصد زیر منحنی هر باند بر درصد سطح زیر منحنی باند اکتین مربوطه تقسیم شد و سپس مقادیر محاسبه شده بین گروه ها مقایسه شد (۱۲).

یک ساعت مسدود شدند و سپس غشاها در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه آکواپورین ۹ (Anti- Aquaporin 9) (Cat No: ab191056, abcam) و آنتی بادی کنترل (anti-beta actin-loading control Cat No: ab8227, abcam) انکوبه شدند دوباره به مدت یک ساعت پس از سه بار شستشوی غشاها با TBST، آن را با آنتی بادی ثانویه ضد خرگوش (H&L IgG (HRP) Cat (No: ab6721; Abcam) انکوبه کردند و سپس با نورتابی

جدول ۱- غلظت آلاینده‌های ازون، دی‌اکسید نیتروژن، دی‌اکسید گوگرد و  $PM_{2.5}$  در مدت ۳ ماه

آلاینده‌ها	زمان تحت معرض	واحد	میانگین	سازمان بهداشت جهانی
$PM_{2.5}$	۳ ماهه	$\mu g/m^3$	$37/76 \pm 11/94$	۲۵
$O_3$	۳ ماهه	Ppb	$13/43 \pm 2/84$	۱۰۰
$SO_2$	۳ ماهه	Ppb	$6/16 \pm 1/19$	۲۰
$NO_2$	۳ ماهه	Ppb	$54/18 \pm 8/38$	۱۰۰

در گروه کنترل در مقطع یک لوله اسپرم ساز، بیان آکواپورین ۹ در اسپرماتوسیت‌ها دیده شد (شکل ۳). در گروه (گازهای آلاینده) در مقطع بیضه، آکواپورین ۹ خیلی کم در لوله‌های اسپرم ساز دیده شد (شکل ۳). در گروه ( $PM_{2.5}$  و آلودگی گازی) در مقطع لوله‌ی اسپرم ساز، آکواپورین ۹ در اسپرماتوسیت دیده نشد (شکل ۳).  $Aquaporin\ 9$  در بافت‌های بیضه طبیعی موش در سلول‌های اسپرماتوسیت و جرم سلها به میزان وسیع و منتشر به صورت غشایی بیان می‌گردد که در رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی به رنگ قهوه ای خود را نشان می‌دهد. در بیضه‌های موش‌های تحت تاثیر با آلاینده‌ها در هیچ کدام از لوله‌های اسپرم ساز بیضه آکواپورین ۹ بیان نگردید. با توجه به شاخص ارزیابی در گروه کنترل: +۱، در گروه (گازهای آلاینده): ۰ و در گروه ( $PM_{2.5}$  و آلودگی گازی): ۰ گزارش شد.

## تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۱ داده‌های کمی با استفاده از آزمون آماری one-way ANOVA و توسط آنالیز واریانس یک طرفه با آزمون Tukey's انجام شد.

## نتایج

تعیین غلظت  $PM_{2.5}$ ، ازون، دی‌اکسید نیتروژن و دی‌اکسید گوگرد در جدول ۱ گزارش شده است. تعیین غلظت فلزات وهیدروکربن‌های چندحلقه‌ای در جدول ۲ گزارش گردید. سنجش سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) در جدول ۳ گزارش گردیده است. در گروه‌های گاز (Gas) و گاز به اضافه  $PM_{2.5}$  ( $PM_{2.5} + Gas$ )، افزایش قابل توجهی در سطوح MDA نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P > 0.05$ ) (شکل ۲).

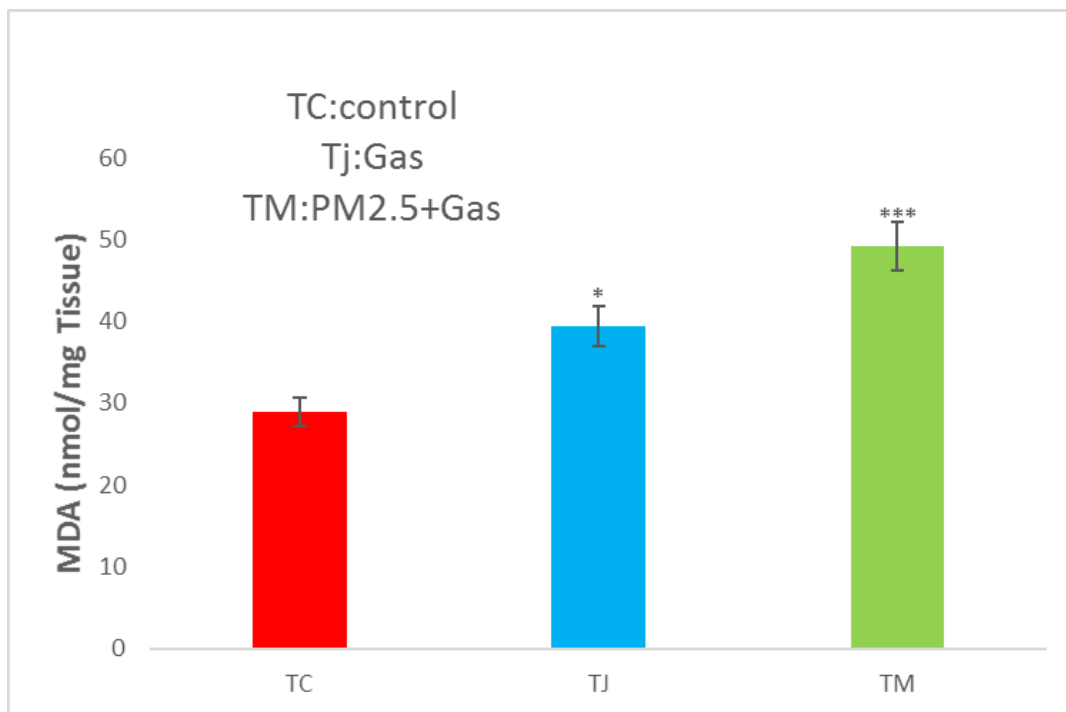
## آنالیز ایمنوهیستوشیمی بیان آکواپورین ۹

جدول ۲- غلظت فلزات سنگین در مدت ۳ ماه برحسب  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 

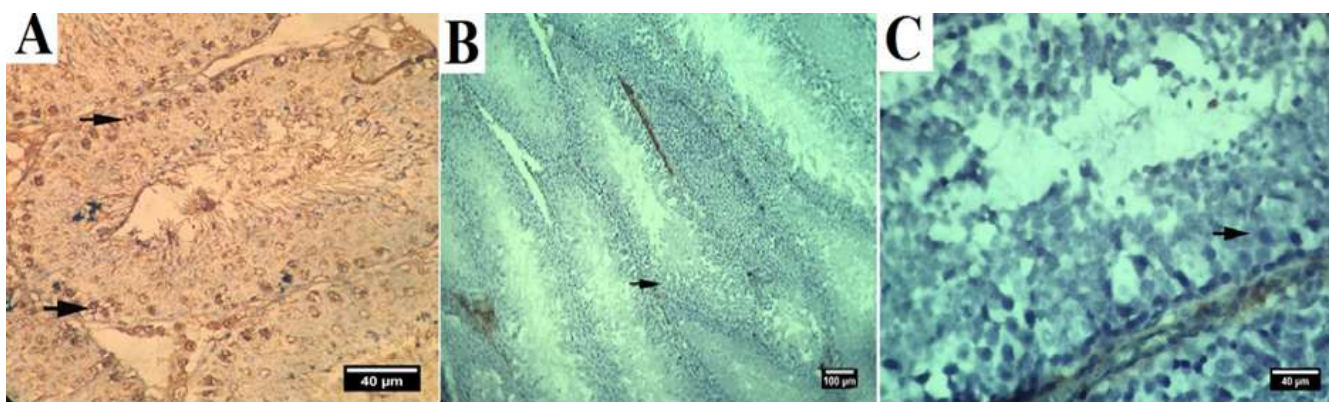
سه ماهه	فلزات سنگین
$68/18 \pm 16/57$	آلومینیم
$56/50 \pm 4/21$	کلسیم
$1/16 \pm 3/64$	کادمیوم
$0/57 \pm 0/22$	کروم
$1/74 \pm 4/53$	مس
$0/2 \pm 0/12$	آهن
$0/17 \pm 0/07$	منگنز
$3/02 \pm 3/26$	سدیم
$0/3 \pm 0/10$	نیکل
$0/28 \pm 19/0$	سرب

جدول ۳- غلظت هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای در مدت ۳ ماه مواجهه برحسب  $\text{ng}/\text{m}^3$ 

سه ماهه	16 - PAHs
$7/17 \pm 16/17$	نفتالن
$1/99 \pm 0/8$	اسنفتیلن
$2/96 \pm 1/92$	اسنفتن
$0/96 \pm 0/57$	فلورن
$18/98 \pm 10/35$	فنانترون
$5/3 \pm 3/27$	آنتراسن
$1/00 \pm 0/57$	فلوراتن
$1/74 \pm 0/78$	پایرن
$0/35 \pm 0/00$	بنزو(ا)آنتراسن
$3/05 \pm 1/27$	کرایسن
*	بنزو(b)فلوراتن
*	بنزو(k)فلوراتن
$2/2 \pm 1/45$	بنزو(a)پایرن
*	دی بنزو(a,b)آنتراسن
*	دی بنزو(i,g,h)پیرین
*	پایرن (cd)۱,۲,۳ ایندنو
$45/7 \pm 37/15$	جمع



شکل ۲- فعالیت سطح مالون دی آلدئید در بیضه موش‌ها پس از ۳ ماه مواجهه، میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) سطح MDA در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۱۲ سر می‌باشد.  $P^{***} < 0/001$  و  $P^{*} < 0/05$  نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم می‌باشد.

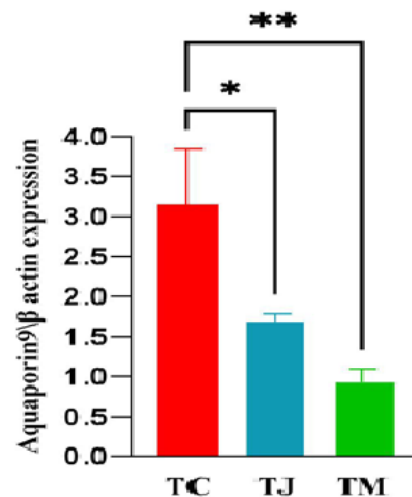
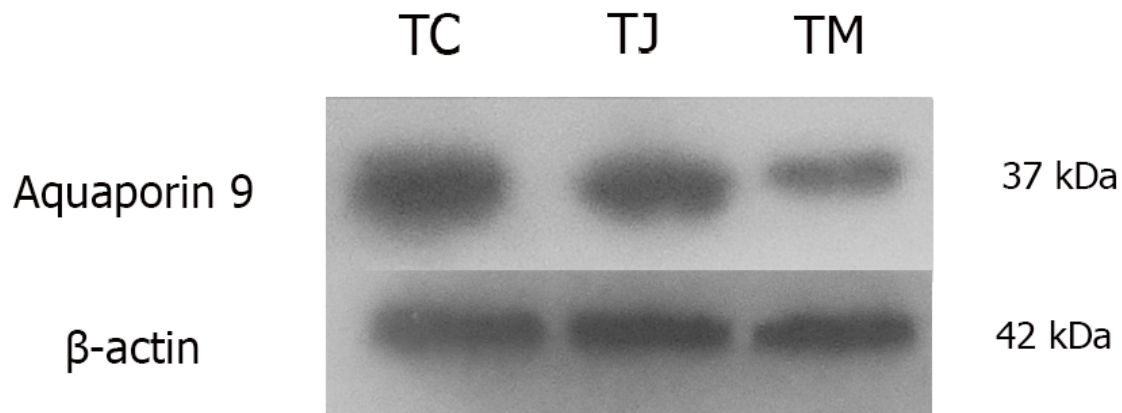


شکل ۳- بیان پروتئین آکواپورین (فلش‌های سیاه رنگ) در بیضه موش صحرایی کنترل (A)، مواجه شده با آلودگی گازی (B) و مواجهه شده با  $PM_{2.5}$  و آلودگی گازی (C).



داری نسبت به (TC) گروه کنترل مشاهده شد (P>0.05) (شکل ۴).

آنالیز وسترن بلات بیان ژن آکواپورین ۹ سطح بیان آکواپورین ۹ در (TJ) گروه‌های گاز (Gas) و (TM) گاز به اضافه PM<sub>2.5</sub> (Gas+ PM<sub>2.5</sub>)، کاهش معنی



شکل ۴-آنالیز وسترن بلات برای تجزیه و تحلیل سطوح بیان آکواپورین ۹ پس از قرار گرفتن در معرض سه ماهه انجام شد. داده‌های به دست آمده به عنوان میانگین  $\pm$  SEM نشان داده شده است.  $P^{***} < 0.001$ ,  $P^{**} < 0.01$ ,  $P^{*} < 0.05$

بیشترین غلظت کاتیون‌ها و فلزات در ذرات PM<sub>2.5</sub>، آلومینیوم و بیشترین غلظت PAHs در دوره ۳ ماه مواجهه مربوط به فنانتزان بود.

در مطالعه Sarti و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی غلظت عناصر فلزی Al, Sb, As, Cd, Fe, Mn, Ni, Pb, V و

#### بحث

حضور ذرات ریز یا PM<sub>2.5</sub> باعث نوعی از آلودگی هوا می‌شود که موجب طیف وسیعی از مشکلات سلامتی از جمله بیماری‌های تنفسی و قلبی عروقی و همچنین پیامدهای نامطلوب تولید مثلی می‌گردد. به‌طور کلی

PM<sub>2.5</sub> می‌تواند مستقیماً ROS را از طریق ترکیب شیمیایی خود تولید کند (۱۸). مکانیسم دیگر این است که PM<sub>2.5</sub> می‌تواند مسیرهای التهابی را در بدن فعال کند و منجر به تولید ROS شود. التهاب پاسخ طبیعی بدن به آسیب یا عفونت است، اما التهاب مزمن می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب به اجزای سلولی شود (۱۹). در نتیجه، قرار گرفتن در معرض PM<sub>2.5</sub> می‌تواند اثرات مضر بر بدن از طریق اختلال در فعالیت آنزیم‌های تنشی مهم مانند SOD، CAT و GPX و افزایش سطح MDA داشته باشد. در مطالعه حاضر، بررسی ایمونوهیستوشیمیایی آکوپورین ۹ نشان داد که بیان این پروتئین در بافت بیضه پس از مواجهه با PM<sub>2.5</sub> بسیار کم شد به طوری که به ندرت در گروه مواجهه با PM<sub>2.5</sub> و گاز مشاهده شد. در بیضه، AQP9 عمدتاً در سلول‌های سرتولی یافت می‌شود که مسئول حمایت و تغذیه سلول‌های اسپرم در حال رشد هستند (۲۰). آکوپورین ۹ نقش مهمی در حفظ تعادل مناسب آب و یون‌ها در بیضه دارد که برای رشد و عملکرد طبیعی اسپرم بسیار مهم است (۴).

در مطالعه حاضر، بررسی وسترن بلات آکوپورین ۹ نشان داد که بیان این پروتئین در بافت بیضه پس از مواجهه با PM<sub>2.5</sub> به همراه آلاینده گازی و در گروه مواجهه با گاز به طور معنی داری کاهش یافت.

در بررسی‌های دیگران که موش‌ها در معرض PM<sub>2.5</sub> قرار گرفتند، نتایج آنها نشان داد که بیان AQP9 در بیضه موش‌های نر کاهش یافته است که شباهت به مطالعه حاضر داشت (۲۱). به نظر می‌رسد قرار گرفتن در معرض PM<sub>2.5</sub> منجر به کاهش ایمونوهیستوشیمی AQP9 در بیضه موش‌های صحرایی نر شده باشد. اگرچه مکانیسم‌هایی که توسط آن قرار گرفتن در معرض PM<sub>2.5</sub> ممکن است بر بیان AQP9 و ایمونوهیستوشیمی در بیضه تأثیر بگذارد هنوز به

Zn در ذرات PM<sub>2.5</sub> در منطقه Bologna در ایتالیا پرداخته شد. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که آهن، آلومینیوم و روی بیشترین فراوانی را در بین عناصر فلزی داشتند. همچنین گزارش شد که آلاینده‌های تولیدی از جاده‌های پرترافیک می‌تواند منبع عمده‌ای برای عناصر آهن، منگنز و مس باشد. برای عناصر با غلظت ناچیز مانند وانادیوم و نیکل احتراق سوخت فسیلی در دمای بالا و برای فلزاتی مانند آرسنیک، کادمیوم و سرب فرایندهای صنعتی با دمای بالا می‌تواند منبع انتشار باشد. در پژوهش حاضر، بیشترین میزان مربوط به حضور بالای آلومینیوم بود (۱۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پس از قرار گرفتن در معرض آلودگی گازی و PM<sub>2.5</sub>، سطح مالون دی‌آلدئید MDA به طور معنی داری در بدن افزایش یافت. استرس اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد که بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و توانایی بدن در سم‌زدایی آن‌ها عدم تعادل وجود داشته باشد (۱۴). MDA نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی است، که نوعی آسیب اکسیداتیو است که هنگام حمله ROS به لیپیدهای غشای سلولی رخ می‌دهد (۱۴) چندین مطالعه نشان داده اند که قرار گرفتن در معرض PM<sub>2.5</sub> می‌تواند سطح MDA را در بافت‌های مختلف از جمله ریه‌ها، کبد و مغز افزایش دهد. این نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض PM<sub>2.5</sub> می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو به غشای سلولی شود و عملکرد آنها را مختل کند (۱۵-۱۷). مشابه نتایج مطالعه حاضر، و همکاران گزارش داد که قرار گرفتن در معرض دوزهای مختلف PM<sub>2.5</sub> در موش‌های صحرایی نر باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش سطح MDA در بیضه شد (۱۸). مکانیسم‌هایی که توسط آن PM<sub>2.5</sub> بر فعالیت آنزیم تأثیر می‌گذارد و سطح MDA را افزایش می‌دهد کاملاً شناخته نشده است. با این حال، چندین مکانیسم ممکن پیشنهاد شده است. یک مکانیسم این است که

مشابهی در بیضه رخ دهد که منجر به تغییرات در بیان AQP9 شود.

برای نتیجه گیری بهتر و دقیق تر نیاز به آزمایشات بیشتری برای شناخت مکانیسم‌های زیربنایی این رویداد است. قرار گرفتن در محیط PM2.5 ممکن است باعث اختلال در عملکرد سیستم تناسلی نشود و در نتیجه ناباروری را به همراه داشته باشد داشته باشد.

#### نتیجه گیری

به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قرار گرفتن موش‌های صحرایی نر در معرض آلاینده‌های گازی و PM2.5 باعث اختلال در بیضه می‌شود که تأثیر مخربی بر اسپرم‌زایی دارد. همچنین سبب کاهش بیان پروتئین آکوپورین در بافت بیضه می‌شود. با توجه به افزایش شاخص استرس اکسیداتیو مالون دی آلدهید می‌توان اظهار داشت که تولید بیش از حد ROS باعث فعال شدن مسیر سیگنال دهی در بیضه‌ها و کاهش اسپرماتوزن خواهد شد و کاهش باروری را به دنبال خواهد داشت. به نظر می‌رسد با توجه به وضعیت آلودگی در کشور در حال توسعه ایی نظیر ایران، بررسی دقیق تر اثر آلودگی هوا بر فرآیند باروری مردان ضروری است.

#### تعارض منافع

همه نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافع وجود ندارد.

#### فهرست منابع

1. Wei Y, Cao X-N, Tang X-L, Shen L-J, Lin T, He D-W, et al. Urban fine particulate matter (PM2.5) exposure destroys blood-testis barrier (BTB) integrity through excessive ROS-mediated autophagy.

طور کامل شناخته نشده است، با این حال، چندین مسیر بالقوه در این خصوص پیشنهاد می‌شود.

یکی از مکانیسم‌های ممکن استرس اکسیداتیو است که زمانی اتفاق می‌افتد که عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و توانایی بدن در سم‌زدایی از آنها وجود داشته باشد. نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض PM2.5 باعث افزایش تولید ROS در بیضه می‌شود که می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول‌های بیان کننده AQP9 شود (۲۲). مکانیسم بالقوه دیگر التهاب است نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض PM2.5 باعث التهاب در بافت‌های مختلف از جمله ریه‌ها و سیستم قلبی عروقی می‌شود (۲۳).

در بیضه، التهاب می‌تواند منجر به آسیب به سلول‌های بیان کننده AQP9 و کاهش بیان AQP9 و ایمونوهیستوشیمی شود. در نهایت، این امکان وجود دارد که قرار گرفتن در معرض PM2.5 بتواند بیان AQP9 و ایمونوهیستوشیمی در بیضه را از طریق مکانیسم‌های اپی ژنتیک تحت تأثیر قرار دهد (۲۴). تغییرات اپی ژنتیک به تغییراتی در DNA یا هیستون‌ها اشاره دارد که می‌توانند بیان ژن را بدون تغییر توالی DNA اصلی تغییر دهند. نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض PM2.5 باعث ایجاد تغییرات اپی ژنتیکی در بافت‌های مختلف از جمله ریه‌ها و مغز می‌شود (۲۵). ممکن است تغییرات

Toxicology mechanisms and methods. 2018;28(4):302-19.

2. Thangavel P, Park D, Lee Y-C. Recent insights into particulate matter (PM2.5)-mediated toxicity in humans: an overview. International journal of environmental

research and public health. 2022;19(12):7511.

3. Wang L, Luo D, Liu X, Zhu J, Wang F, Li B, Li L. Effects of PM<sub>2.5</sub> exposure on reproductive system and its mechanisms. *Chemosphere*. 2021;264:128436.

4. Kannan A, Mariajoseph-Antony LF, Panneerselvam A, Loganathan C, Kiduva Jothiraman D, Anbarasu K, Prahalathan C. Aquaporin 9 regulates Leydig cell steroidogenesis in diabetes. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2022;68(3):213-26.

5. Motesaddi Zarandi S, Shahsavani A, Khodaghohi F, Fakhri Y. Concentration, sources and human health risk of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons bound PM<sub>2.5</sub> ambient air, Tehran, Iran. *Environmental geochemistry and health*. 2019;41:1473-87.##

6. Zarandi SM, Shahsavani A, Khodaghohi F, Fakhri Y. Co-exposure to ambient PM<sub>2.5</sub> plus gaseous pollutants increases amyloid  $\beta$ <sub>1-42</sub> accumulation in the hippocampus of male and female rats. *Toxin reviews*. 2019.##

7. Sowlat MH, Naddafi K, Yunesian M, Jackson PL, Shahsavani A. Source apportionment of total suspended particulates in an arid area in southwestern Iran using positive matrix factorization. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2012;88:735-40.

8. Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*. 2013;42:132-55.

9. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by

thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979;95(2):351-8.

10. Babaei H, Alibabrdel M, Asadian S, Siavashi V, Jabarpour M, Nassiri SM. Increased circulation mobilization of endothelial progenitor cells in preterm infants with retinopathy of prematurity. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119(8):6575-83.

11. Jabarpour M, Siavashi V, Asadian S, Babaei H, Jafari SM, Nassiri SM. Hyperbilirubinemia-induced pro-angiogenic activity of infantile endothelial progenitor cells. *Microvascular research*. 2018;118:49-56.

12. Siavashi V, Nassiri SM, Rahbarghazi R, Vafaei R, Sariri R. ECM-Dependence of endothelial progenitor cell features. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(8):1934-46.

13. Sarti E, Pasti L, Rossi M, Ascanelli M, Pagnoni A, Trombini M, Remelli M. The composition of PM<sub>1</sub> and PM<sub>2.5</sub> samples, metals and their water soluble fractions in the Bologna area (Italy). *Atmospheric Pollution Research*. 2015;6(4):708-18.

14. Lei XG, Zhu J-H, Cheng W-H, Bao Y, Ho Y-S, Reddi AR, et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiological reviews*. 2016;96(1):307-64.

15. Wang B, Chan Y-L, Li G, Ho KF, Anwer AG, Smith BJ, et al. Maternal particulate matter exposure impairs lung health and is associated with mitochondrial damage. *Antioxidants*. 2021;10(7):1029.

16. Leclercq B, Kluza J, Antherieu S, Sotty J, Alleman L, Perdrix E, et al. Air

pollution-derived PM2.5 impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environmental pollution*. 2018;243:1434-49.

**17.** Huang K, Shi C, Min J, Li L, Zhu T, Yu H, Deng H. Study on the mechanism of curcumin regulating lung injury induced by outdoor fine particulate matter (PM2.5). *Mediators of inflammation*. 2019;2019.

**18.** Liu X, Meng Z. Effects of airborne fine particulate matter on antioxidant capacity and lipid peroxidation in multiple organs of rats. *Inhalation toxicology*. 2005;17(9):467-73.

**19.** Ostro B, Malig B, Broadwin R, Basu R, Gold EB, Bromberger JT, et al. Chronic PM2.5 exposure and inflammation: determining sensitive subgroups in mid-life women. *Environmental research*. 2014;132:168-75.

**20.** Kannan A, Panneerselvam A, Mariajoseph-Antony LF, Loganathan C, Prahalathan C. Role of aquaporins in spermatogenesis and testicular steroidogenesis. *The Journal of Membrane Biology*. 2020;253:109-14.

**21.** Hemmingsen JG, Hougaard KS, Talsness C, Wellejus A, Loft S, Wallin H, Møller P. Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice. *Toxicology*. 2009;264(1-2):61-8.

**22.** Liu J, Ren L, Wei J, Zhang J, Zhu Y, Li X, et al. Fine particle matter disrupts the blood-testis barrier by activating TGF- $\beta$ 3/p38 MAPK pathway and decreasing testosterone secretion in rat. *Environmental toxicology*. 2018;33(7):711-9.

**23.** Wang H, Shen X, Tian G, Shi X, Huang W, Wu Y, et al. AMPK $\alpha$ 2 deficiency exacerbates long-term PM2.5 exposure-induced lung injury and cardiac dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018;121:202-14.

**24.** Zhang H, Yang B. Aquaporins in Reproductive System. *Aquaporins*. 2023:179-94.

**25.** Shou Y, Huang Y, Zhu X, Liu C, Hu Y, Wang H. A review of the possible associations between ambient PM2.5 exposures and the development of Alzheimer's disease. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;174:344-52.



## immunohistochemical evaluation in testicular tissue of male rats following PM2.5 particle inhalation

Elnaz Noshadirad<sup>1</sup>, **Kazem, Parivar**<sup>2</sup>, Saeed Motesaddi Zarandi<sup>3</sup>, Pejman Mortazavi <sup>4</sup>, Betol Gorbani yekta<sup>5</sup>.

1- PhD. Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.  
Corresponding Author: [Kazem.parivar41@gmail.com](mailto:Kazem.parivar41@gmail.com)

3-Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of public Health and safety, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5- Assistant Professor , Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University of Medical Sciences, Shariati St, Tehran, Iran.

Received:2023.10. 29

Accepted: 2024.01.07

### Abstract

**Background & Aim:** Exposure to suspended particles (PM2.5) and gaseous air pollution poses a serious threat to spermatogenesis in men. However, the specific molecular mechanism behind this remains largely unknown. The present study investigated the effect of exposure to PM2.5 and gas pollutants on MDA, as well as the changes in the expression levels of aquaporin proteins through immunohistochemistry and Western blot analysis in the testicular tissue of male rats.

**Materials & Methods:** A total of 36 male Wistar rats were randomly divided into three groups: the control group exposed to standard air conditions, the gas group, which was exposed solely to gas pollutants, and the gas plus PM2.5 group(Gas+PM2.5). All groups were subjected to pollutant exposure for three months, four days a week, and five hours a day.

**Results:** Immunohistochemistry and Western blot results indicate that simultaneous exposure to gas pollutants and PM2.5 leads to an increase in the concentration of malondialdehyde (MDA) and a decrease in aquaporin 9 protein compared to the control group.

**Conclusion:** Therefore, exposure to PM2.5 and gaseous pollutants probably provokes oxidative stress in the testis, which leads to the reduction of aquaporin 9 protein through the activation of signaling pathways. Thus, PM2.5 pollution appears to play a crucial role in infertility by disrupting spermatogenesis.

**Key words:** Particle matter, Oxidative stress, Testis, Aquaporin9