

تأثیر قرار گرفتن در معرض PM_{2/5} بر تغییرات هورمونی، شکندگی DNA اسپرم و متیلاسیون ژن Aquaporin9 در بافت بیضه نژاد ویستار

الناز نوشادی راد^۱، کاظم پریور^۲، سعید متصدی زرنندی^{۳*}، بتول قربانی یکتا^۴

چکیده

آلودگی هوا یکی از مهمترین معضلات زیست‌محیطی است که تأثیر آن بر قدرت باروری مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر به بررسی اثر مواجهه با PM_{2/5} و آلودگی‌های گازی، تغییر هورمون‌های جنسی، شکست DNA اسپرم و همچنین سنجش MS-HRM برای ژن Aquaporin9 در بافت بیضه پرداخته شد. پس از نمونه‌گیری و ارزیابی غلظت PM_{2/5}، از ۲۴ سررت نر استفاده گردید. حیوانات به طور تصادفی در سه گروه دریافت‌کننده PM_{2/5} به همراه آلاینده‌های گازی، دریافت‌کننده آلاینده‌های گازی و کنترل دریافت‌کننده هوای تمیز با شرایط استاندارد تقسیم‌بندی شدند. بعد از شش ماه جهت بررسی تغییرات، هورمون محرک فولیکول FSH، تستوسترون و همچنین شکست DNA در اسپرم حیوانات ارزیابی شدند و همچنین سنجش MS-HRM برای این ژن انجام شد. نتایج نشان داد که گروه مواجهه یک نسبت به گروه کنترل، افزایش FSH و کاهش معنی‌داری در مقدار تستوسترون سرمی را نشان دادند. همچنین گروه‌های تیمار شده با مواجهه دو کاهش معناداری در تستوسترون سرمی نسبت به گروه کنترل نشان دادند. از لحاظ شکست DNA اسپرم در گروه‌های تیمار مواجهه یک و مواجهه دو افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان دادند. در بررسی متیلاسیون تنها گروه مواجهه یک تغییرات آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل در مدت ۶ ماه نشان داد. بنابراین قرار گرفتن در معرض PM_{2/5} و آلاینده‌های گازی منجر به تداخل در ترشح هورمون‌های جنسی و اثر مخرب بر شکندگی DNA اسپرم و در نتیجه اختلال در عملکرد تولید مثل مردان می‌شود که این امر در القای نازایی در جنس نر حائز اهمیت می‌باشد. این یافته‌ها ممکن است در شناسایی اهداف درمانی برای کاهش اختلالات ناباروری انسان ناشی از قرار گرفتن در معرض PM_{2/5} کمک کند.

واژگان کلیدی: PM_{2/5}، بیضه، شکست DNA Aquaporin9

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۸

مقدمه

امروزه کاهش کیفیت و از طرفی افزایش آلودگی هوا چالش‌های بزرگی در سراسر جهان هستند زیرا مهمترین عامل خطر محیطی برای سلامت انسان و محیط زیست محسوب می‌شود (۱). مطالعات نشان داده‌اند آلودگی هوا با افزایش ریسک ابتلا به بیماری‌های حاد و مزمن و مرگ در ارتباط است (۲). همزمان با کاهش کیفیت هوا، ریسک ابتلا به سکت، سرطان ریه، ناباروری و بیماری‌های مزمن تنفسی در افراد افزایش می‌یابد. آلاینده‌های متعددی در هوا وجود دارند که مهمترین آنها ذرات معلق PM (Particulate Matter) هستند (۲). طبقه‌بندی ذرات معلق به شرح زیر می‌باشد: ذرات درشت (PM₁₀ (dP < 10 μm)، ذرات ریز (PM_{2/5} (dP < 2.5 μm) و ذرات بسیار ریز PM_{0.1} (dP < 0.1 μm) (۳). PM_{2/5} به دلیل اینکه دارای اندازه کوچکی می‌باشد و می‌تواند زمان طولانی‌تری را در هوا باقی بماند و همچنین به دلیل قابلیت نفوذ بالا به دستگاه تنفس انسان بیشترین نگرانی را در بین گروه‌های مطرح شده دارد (۴). این ذرات معلق ترکیبی از آلاینده‌ها با منشأ طبیعی و آنتروپژوئیک هستند که در میان این آلاینده‌ها، PM_{2/5} بیشترین میزان را دارد و منشأ تولیدش صنعت، مصرف سوخت و انرژی در خانه‌ها، کارخانجات صنعتی و منابع طبیعی مانند گرد و غبار کویر می‌باشند (۵)، بنابراین PM_{2/5} با انواع مختلفی از

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
s.motesadi1401@gmail.com

۴- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران.

Rat LH/Luteinizing Hormone (Competitive EIA) ELISA Kit, (Cat No: LS-F27508, Isbio, United States), Rat FSH (Sandwich ELISA) ELISA Kit, (Cat No: LS-F38636, Isbio, United States), تهیه گردیدند. از کیت SDFA شرکت ایده ورزان فردا JVFCo (ایران) جهت آنالیز شکندگی DNA اسپرم‌ها استفاده گردید.

اتاقهای مواجهه

- نمونه‌گیری

یکی از منابع شناخته شده آلودگی در تهران، محدوده‌ی دانشگاه شهید بهشتی است. بنابراین نمونه‌گیری از سقف دانشگاه شهید بهشتی (° ۵۱/۳۹۴VE و ° ۳۵/۷۹۹۱ N) انجام شد. آنها همچنین در چرخه نور/تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت)، دما (۲۳ درجه سانتیگراد) و رطوبت (۵۵٪) از طریق پایگاه هواشناسی تهران ارزیابی گردیدند.

- نمونه‌گیری PM_{2/5}

نمونه‌گیری PM_{2/5} به طور مداوم توسط دستگاه Low Volume Sampler مدل (TCR Tecora Echo PM) ساخت کشور ایتالیا و در پشت‌بام دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در اتاق حیوانات انجام شد (۱۰). مراحل جمع‌آوری و نگهداری PM_{2/5} براساس مطالعات قبلی انجام گرفت (۱۰). تجزیه و تحلیل مواد توسط مرجع استاندارد (SRM 1648) براساس مطالعات قبلی گروه ما ارزیابی شد (۴).

- ارزیابی PM_{2/5} و آلاینده‌های گازی

غلظت PM_{2/5} همراه با دی‌اکسید گوگرد (SO₂ Sulfur dioxide)، ازون O₃ (Ozone) و دی‌اکسید نیتروژن NO₂ (Nitrogen dioxide) در هوای اتاق حیوانات، به طور مداوم در هر دوره مورد بررسی قرارگرفت. 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 ارزیابی شد (۹).

بیماری‌ها از جمله اختلالات قلبی عروقی (۶)، تنفسی، عصبی، جهش‌های ژنتیکی، بیماری‌های متابولیسمی مثل چاقی و دیابت (۴)، اختلالات غدد درون ریز، سرطان‌ها، نازایی و حتی مرگ مرتبط می‌باشد (۷)، که امروزه توجه ویژه‌ای به موضوع نازایی در افراد متأثر و در معرض PM_{2/5} شده‌است. آکوپورین‌ها نوعی کانال آب در سلول‌ها هستند که امکان عبور آب را از طریق غشاء پلازما به مقدار زیادی افزایش می‌دهند.

هورمون‌های FSH از طریق تنظیم بیان گلوبولین متصل به هورمون جنسی و LH از طریق کنترل سلول‌های لیدیک، در بیوستنز هورمون تستوسترون نقش دارند (۷). هورمون FSH همراه با هورمون تستوسترون بلوغ سلول‌های اسپرم را تنظیم می‌کند. نشان داده شده‌است که اختلال در تولید تستوسترون منجر به اختلالات مختلف تولیدمثلی در مردان مانند کاهش تعداد اسپرم، مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و حتی ناباروری می‌شود (۷). از آنجایی که نقش حیاتی محور HPG در تنظیم سیستم تولیدمثلی مردان به خوبی شناخته شده‌است (۸) و مطالعات نشان داده‌اند که در برابر آلودگی‌های مختلف محیطی، این سیستم بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد (۹)، در مطالعه حاضر از موش‌های نر ویستار با استفاده از سیستم قرارگرفتن در معرض PM_{2/5}، به مطالعه‌ی نقش این آلاینده در شهر تهران بر تغییرات شاخص‌های هورمونی و DNA در گروه‌های مورد مواجهه به مدت ۶ ماه پرداخته شد و میزان ترشح هورمون‌های FSH و تستوسترون و آسیب‌های DNA سلول‌های اسپرم و همچنین سنجش MS-HRM مورد بررسی قرارگرفتند.

مواد و روش کار

مواد

کلروفرم از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. کیت‌های مورد نیاز در بررسی میزان هورمون‌های جنسی از جمله Rat Testosterone ELISA Kit, (Cat No: 80550, Crystalchem, United States),

- دوره‌های تیماری

دوره تیماری ۶ ماه جهت بررسی فاکتورهای مورد مطالعه در نظر گرفته شد. هر دوره چهار روز در هفته و به مدت پنج ساعت در روز (۹:۰۰ صبح تا ۲:۰۰ بعدازظهر) برنامه‌ریزی گردید و ارزیابی‌های مورد نیاز انجام گرفت.

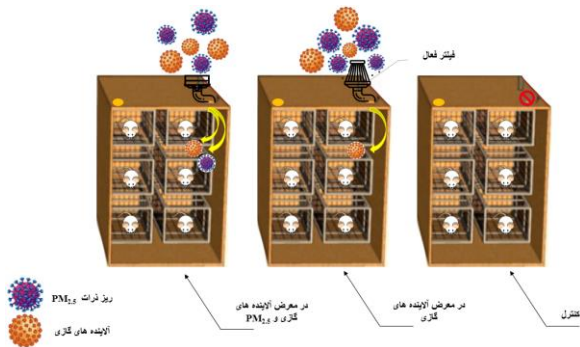
- حیوانات تجربی وجنبه‌های اخلاقی

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. در این مطالعه، ۲۴ سر موش نر نژاد ویستار با میانگین وزن موش‌ها (۱۷۰ تا ۲۰۰ گرم) از انستیتوی پاستور تهران خریداری شدند. تعداد موش‌ها تا آنجا که ممکن بود به حداقل رسید. موش‌های صحرائی ویستار به صورت جداگانه در قفسهای پلی کربنات حیوانات و بدون محدودیت در دسترسی به آب، غذا، لیبوم قرار گرفتند. همچنین چرخه‌های روشن/ تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت) در دمای ثابت (۲۲±۲) درجه سانتیگراد و رطوبت (۵۵٪) نیز برای تمامی موش‌ها تعبیه گردید. پس از ۷ روز سازگاری، موش‌های صحرائی نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند (در هر گروه ۸ سر موش) (نگاره ۱):

گروه اول: مواجهه یک گروه دریافت‌کننده + PM2/5 به

علاوه آلاینده‌های گازی

گروه دوم: مواجهه دو گروه دریافت‌کننده آلاینده‌های گازی گروه سوم: Control گروه کنترل دریافت‌کننده هوای تمیز با شرایط استاندارد



نگاره ۱- نگاره شماتیک اتاقک‌های گروه‌های مورد مطالعه تحت معرض. به ترتیب از سمت راست به چپ شامل: گروه (کنترل) دریافت‌کننده هوای تمیز با شرایط استاندارد، گروه دریافت‌کننده آلاینده‌های گازی، گروه دریافت‌کننده PM2/5 و آلاینده‌های گازی.

تعیین سطح هورمون‌های جنسی

بعد از اتمام دوره مطالعه، موش‌های صحرائی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و با رعایت ملاحظات اخلاقی خونگیری از موش‌ها صورت گرفت. قبل از استفاده تمام معرف‌ها، استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌ها در دمای اتاق قرار داده شد و طبق دستورالعمل کیت آماده گردید. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از رقیق‌کننده و متعاقب آن ۵۰ میکرولیتر از استاندارد و نمونه‌ها به هر چاهک از پلیت اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس هرچاهک با محلول شستشو چهار مرتبه مورد شستشو قرار گرفت و در آخرین شستشو مایع رویی خالی گردید و پلیت جهت خشک شدن، روی سطح قرار گرفت. در مرحله ی بعدی، ۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی بادی کونژوگه به هر چاهک اضافه و ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید و مجدد هرچاهک با محلول شستشو چهار مرتبه مورد شستشو قرار گرفت و خشک شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در شرایط تاریکی نگهداری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به هر چاه وارد شد. میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰

دارند و آسیبی دیدند هاله‌های کوچک و یا اصلا هاله ندارند، قابلیت باروری کم است.

طراحی پرایمر برای تجزیه و تحلیل ذوب با وضوح بالا (HRM)

پرایمر مطابق MS-PCR bias compensate for HRM برای تقویت هر دو قالب متیله و غیر متیله طراحی شد. ارزیابی متیلاسیون توسط نرم افزار Methyl Primer Express @ نسخه v1/0 انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمر برای ارزیابی HRM

Gen es	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>Aquaporin9</i>	TCAGTCGAGA AAAGGCTGG	GGCACGGATAC AATGGTTT
	T	

Primer design for High resolution melting analysis (HRM)

سنجش MS-HRM

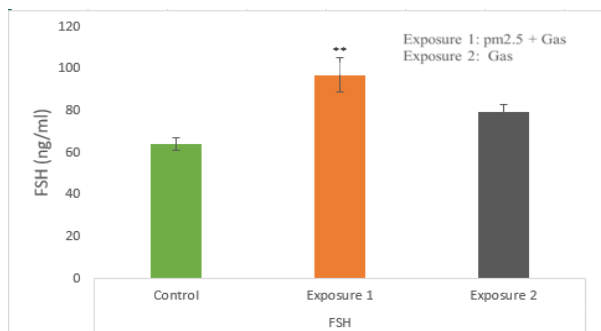
تقویت PCR و تجزیه و تحلیل HRM به طور متوالی بوسیله دستگاه Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Mortlake، استرالیا) انجام شد. PCR در حجم کل ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی: ۱× بافر، ۴ mM Mg²⁺، ۲۰۰ μM از هر یک از چهار dNTP، ۲۵۰ nM از پرایمر، ۵ رنگ Syto9 (Invitrogen, Carlsbad, CA) بود. ۱U پلیمرز HotStarTaq (Qiagen) و ۱ μl الگوی اصلاح شده بی سولفیت (غلظت نظری ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر). تقویت شامل ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به دنبال آن ۵۰ چرخه ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۵ ثانیه

نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر DANA-3200 خوانده شد.

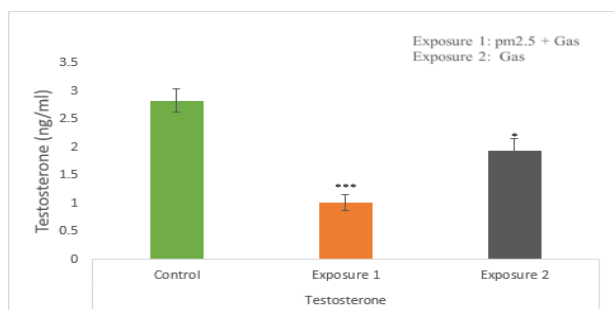
- بررسی شکست DNA اسپرم‌ها

در این مطالعه جهت بررسی میزان شکست DNA از کیت SDFa (Sperm DNA Fragmentation Assay) استفاده گردید. برای تهیه نمونه اسپرم از دم اپی دیدیم استفاده شد. در ابتدا اپی دیدیم از بیضه جدا شد و در ۵ میلیلیتر محلول Ham's F10 به صورت قطعات کوچک برش زده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ قرار داده شد تا اسپرم‌ها از توبول‌های اپی دیدیمی خارج شوند. ارزیابی نمونه‌های سمن از نظر شکست DNA با استفاده از کیت هالواسپرم صورت گرفت. ۵۰ میکرولیتر از نمونه با آگارز با نقطه‌ی ذوب پایین مخلوط و بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شد. پس از قرار دادن لام، اسلایدها به مدت ۵ دقیقه بر روی سطح سرد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس لامل برداشته و اسلایدها در محلول دناتوره‌کننده و پس از آن در محلول لیزکننده غوطه‌ور شدند. پس از شستشو با آب مقطر، با استفاده از محلول‌های اتانول با غلظت صعودی (۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) آگیری و پس از خشک‌شدن در دمای اتاق رنگ‌آمیزی، مجدداً با آب مقطر شستشو داده شد. سپس اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت، اندازه هاله اسپرم مبنای ارزیابی میزان شکست DNA اسپرم بود. هرچه هاله‌ها بزرگتر باشند سلول سالم‌تر است. در نهایت نتایج ما به سه نوع تقسیم می‌شوند: اسپرم با هاله بزرگ، اسپرم با هاله کوچک، اسپرم بدون هاله. اسپرم‌هایی که شکست ندارند و آسیبی ندیدند هاله‌های بزرگ و متوسطی دارند، قابلیت باروری عالی است و اسپرم‌هایی که شکست

آماری معنی داری $P < 0.001$ و $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل نشان دادند (نگاره ۳).



نگاره ۲. میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) سطح هورمون FSH در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در مدت ۶ ماه. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۸ سر می‌باشد. $P^{***} < 0.01$ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دادر مقایسه با گروه کنترل سالم می‌باشد.



نگاره ۳. میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) سطح هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در مدت ۶ ماه. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۸ سر می‌باشد. $P^{***} < 0.001$ و $P^* < 0.05$ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دادر مقایسه با گروه کنترل سالم می‌باشد.

بررسی اسپرم‌ها از لحاظ شکستگی DNA (SDFa)

بررسی اسپرم‌ها از لحاظ شکستگی DNA در بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ به صورت زیر مشاهده گردید (تصاویر ۴ و ۵). اسپرم‌های با هاله‌های بزرگ و متراکم به عنوان اسپرم‌های بدون شکستگی DNA طبقه‌بندی شدند و اسپرم‌های با هاله کوچک و با فشردگی یا تراکم پایین به عنوان اسپرم‌های دارای شکستگی DNA طبقه‌بندی شدند. و اسپرم‌های بدون هاله به عنوان اسپرم‌های دارای شکستگی DNA طبقه‌بندی شدند.

در دمای بازپخت پرایمر (The primer annealing temperature (Ta) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. آنالیزهای ذوب با وضوح بالا (HRM) در تنظیمات افزایش دما و جذب فلورسانس توصیه شده توسط سازنده انجام شد، یعنی افزایش دما از ۷۰ تا ۹۵ درجه سانتیگراد، افزایش ۰/۱ درجه سانتیگراد در ۲ ثانیه (۰/۱ °C/2 s). تمام واکنش‌ها در سه تکرار انجام شد. نمودارهای ذوب با محاسبه «خط بهترین تناسب» یا (line of best fit) در بین دو ناحیه نرمال‌سازی قبل و بعد از کاهش عمده فلورسانس که نشان‌دهنده ذوب محصول PCR با استفاده از نرم‌افزار ارائه‌شده با Rotor-Gene™ 6000 است، نرمال شد. لگوریتم اجازه مقایسه مستقیم نمونه‌هایی که در سطوح فلورسانس شروع متفاوتی دارند را می‌دهد.

تحلیل آماری

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

نتایج

تعیین غلظت PM2.5، ازون، دی‌اکسید نیتروژن و دی‌اکسید گوگرد

سطح FSH و تستوسترون در بافت بیضه

نتایج حاصل از بررسی میزان هورمون FSH در خون گروه‌های دریافت‌کننده مواجهه یک افزایش آماری معنی‌داری $P < 0.01$ را نسبت به گروه کنترل نشان داد در حالی که گروه‌های تیمار شده با مواجهه دو هیچ تغییر آماری معنی‌داری نسبت به کنترل نشان ندادند (نگاره ۲). در بررسی میزان ترشح هورمون تستوسترون در خون گروه‌های دریافت‌کننده مواجهه یک و مواجهه دو به ترتیب کاهش

جدول ۲- غلظت آلاینده‌های ازون، دی‌اکسید نیتروژن، دی‌اکسید گوگرد و PM_{2.5} در مدت ۶ ماه

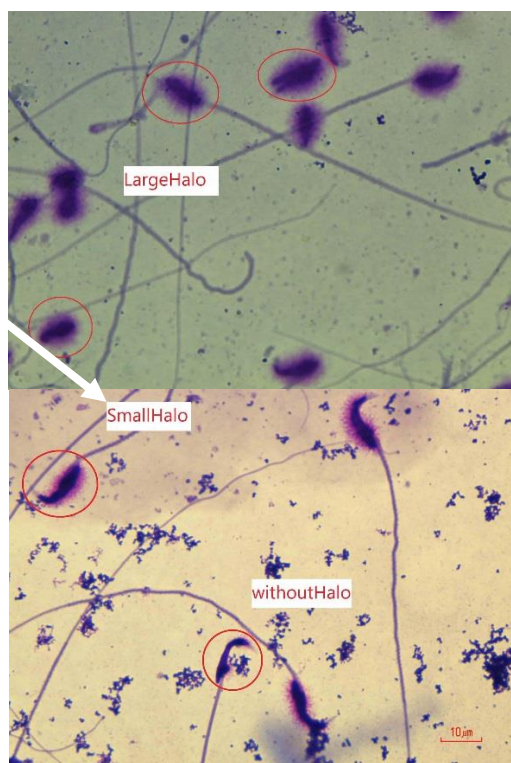
آلاینده‌ها	زمان تحت معرض	واحد	میانگین	سازمان بهداشت جهانی
PM _{2.5}	۶ ماهه	μg/m ³	۱۱/۲۰ ± ۳۱/۶۱	۲۵
O ₃	۶ ماهه	Ppb	۷/۷۲ ± ۲۳/۳۷	۱۰۰
SO ₂	۶ ماهه	Ppb	۱/۲۳ ± ۵/۳۷	۲۰
NO ₂	۶ ماهه	Ppb	۸/۷۳ ± ۵۳/۲۸	۱۰۰

جدول ۳- غلظت فلزات سنگین در مدت ۶ ماه برحسب μg/m³

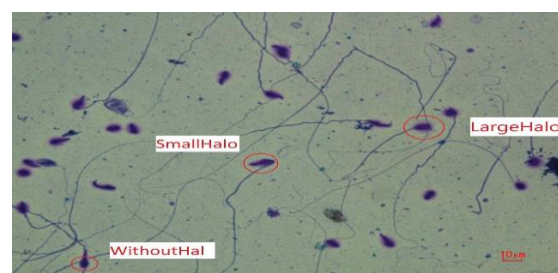
عناصر	میانگین
آلومینیم	۸/۰۹ ± ۴/۱۵
کلسیم	۱۴/۷ ± ۱۲/۶۵
کادمیوم	۰/۱۷ ± ۰/۱
کروم	۰/۳۲ ± ۰/۳۹
مس	۰/۹۸ ± ۱/۲۸
آهن	۰/۵۷ ± ۰/۵۲
منگنز	۰/۱۳ ± ۰/۰۶
سدیم	۰/۸۸ ± ۱/۲
نیکل	۰/۱۸ ± ۰/۱۸
سرب	۰/۱۸ ± ۰/۱۳

جدول ۴- غلظت هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای در مدت ۶ ماه مواجهه برحسب ng/m^3

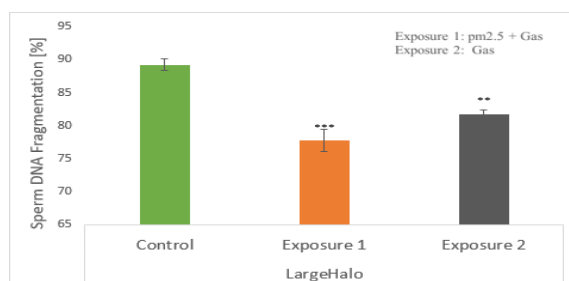
میانگین	PAHs نمونه	میانگین	PAHs نمونه
$4/39 \pm 11/4$	فتالن	$0/35 \pm 0/00$	بنزو(ا)انتراسن
$2/57 \pm 0/43$	اسنفتیلن	$3/05 \pm 1/27$	کرایسن
$1/67 \pm 1/34$	اسنفتن	-	بنزو(ب)فلورانتن
$1/33 \pm 0/34$	فلورن	-	بنزو(ک)فلورانتن
$9/86 \pm 7/26$	فنانترن	$2/20 \pm 1/45$	بنزو(ا)پایرن
$2/89 \pm 2/23$	آنتراسن	-	دی بنزو(ا,h) آنتراسن
$0/86 \pm 0/38$	فلورانتن	-	دی بنزو(g,h,i) پرین
$0/87 \pm 0/55$	پایرن	-	پایرن (cd) (۱,۲,۳) ایندنو



نگاره ۵- بررسی اسپرم‌های با هاله بزرگ، با هاله کوچک و بدون هاله از لحاظ شکست DNA در بزرگنمایی ۱۰۰



نگاره ۴- بررسی اسپرم‌ها از لحاظ شکست DNA در بزرگنمایی ۴۰



نگاره ۶- میانگین و انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) درصد شکنندگی DNA اسپرم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در مدت ۶ ماه آورده شده است. تعداد هاله‌های بزرگ در گروه مواجهه یک نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$) در گروه مواجهه دو نیز تعداد هاله‌های بزرگ کمتر از گروه کنترل بود که این کاهش نیز معنی‌دار بود ($p < 0/01$).

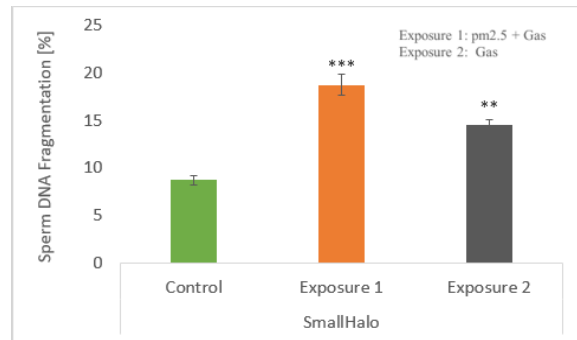
جدول ۵: مقایسه سطح متیلاسیون پروموتور ژن *Aquaporin9* بین گروه‌ها پس از ۶ ماه مواجهه

	p-value <i>Aquaporin9</i>
گروه مواجهه یک و گروه کنترل	0.038
گروه مواجهه دو و گروه کنترل	ND
گروه مواجهه یک و گروه مواجهه دو	0.038

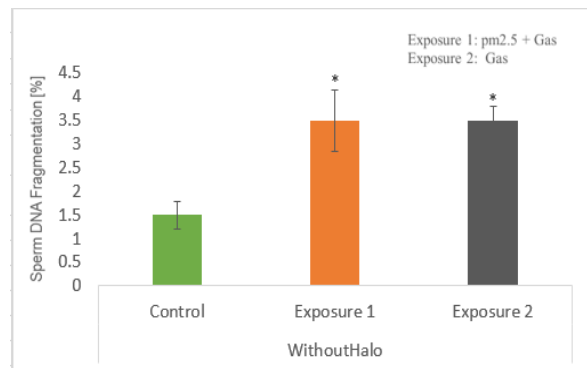
بحث

در حال حاضر آلودگی هوا در شهرهای مختلف جهان یکی از مهمترین معضلات زیست محیطی ناشی از تمدن صنعتی بشر است که تاثیر آن بر سلامت انسان به ویژه قدرت باروری تا حدودی شناسایی و مورد توجه خاص قرار گرفته است. آلودگی هوا از طریق چندین مکانیسم در بسیاری از مشکلات بهداشتی نقش دارد که یکی از تاثیرات مخربش، نقص گامتوزن در زنان و اسپرماتوزن در مردان در معرض استنشاق می‌باشد که در نهایت منجر به کاهش ظرفیت تولیدمثل در جمعیت می‌شود (۱۱). اختلالات هورمونی، استرس اکسیداتیو، آسیب به DNA سلولی و تغییرات اپی ژنتیکی چهار مکانیسم ارائه شده در عوارض جانبی آلودگی می‌باشند (۱۱). از اینرو در این مطالعه به بررسی تاثیرات $PM_{2.5}$ بر اختلالات هورمونی و نیز آسیب و شکنندگی DNA سلولی در اسپرم بیضه‌ی موش‌های نر و بیستار به مدت ۶ ماه تیمار پرداخته شد.

از آنجا که سنتز و ترشح آندروژن‌ها در نتیجه فعالیت این محور هیپوتالاموس هیپوفیزگناد روی می‌دهند، در بروز تمایز و صفات ثانویه جنسی موثر است (۸). جهش در بیان ژنهای موجود در محور هیپوتالاموس هیپوفیزگناد و یا اختلال در کنترل سنتز هورمون‌های جنسی موجب بروز اختلالاتی در سیستم تولیدمثلی و



نگاره ۷- میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) درصد شکنندگی DNA اسپرم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در مدت ۶ ماه آورده شده است. تعداد هاله‌های کوچک در هر دو گروه مواجهه افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت. ($p < 0.01$ برای مواجهه یک) ($p < 0.01$ برای مواجهه دو).



نگاره ۸- میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) درصد شکنندگی DNA اسپرم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در مدت ۶ ماه آورده شده است. تعداد اسپرم‌های بدون هاله در گروه مواجهه یک و مواجهه دو نسبت به گروه کنترل افزایش داشته که این افزایش نیز معنی دار بود ($p < 0.05$ برای هر دو گروه).

سنجش MS-HRM

در بررسی متیلاسیون ژن‌ها پس از ۶ ماه مواجهه تنها گروه مواجهه یک تغییرات آماری معنی داری در مقایسه با گروه کنترل برای ژن *Aquaporin9* نشان داد. با مقایسه نتایج متیلاسیون دو گروه با یکدیگر، تنها گروه مواجهه یک تغییرات آماری معنی دار نشان داد (جدول ۵)

محافظت‌کننده از بافت‌های تولیدمثل قابل تشخیص می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که در حال حاضر، التهاب، آپوپتوز و تجزیه ساختارهای سد در ایجاد تداخلات تولیدمثلی نقش دارند و ممکن است در سطح مولکولی و ژنتیکی به DNA سلول‌های بیضه آسیب وارد کنند (۱۹).

آکوپورین ۹ (AQP9) یک پروتئین کانال آب است که در بافت‌های مختلف از جمله بیضه بیان می‌شود (۲۰). mRNA آکوپورین ۹ در اسپرماتوسیت‌ها و در مراحل اولیه رشد در موش‌های صحرایی شناسایی شده است. لذا بررسی میزان بیان آکوپورین ۹ در اسپرماتوسیت‌ها و سلول‌های زایای بافت بیضه موش‌های صحرایی در مطالعه به منظور ارزیابی و تعیین دقیق مکانسیم تخریبی مواجهه با ذرات آلاینده PM_{2/5} به عنوان مکانسیم احتمالی این روند بسیار دارای اهمیت است و می‌تواند بر تولید مثل تأثیر بگذارد نظیر نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه ایی که روی موش انجام شد نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض آلودگی هوا با کاهش بیان AQP9 در بیضه موش‌های نر مرتبط است (۱۸). مطالعات قبلی مشخص شد که PM_{2/5} ممکن است تغییرات متیلاسیون DNA جهانی را در ناحیه پروموتور و کاهش بیان تعداد ژن‌های مرتبط با سیگنال‌دهی سلولی را القا کند (۲۰). یافته‌های ما در ارزیابی سطح mRNA Aquaporin9 نیز تجزیه و تحلیل اپی ژنتیک را تایید کرد. از دست دادن عملکردی که در Aquaporin9 به عنوان ژن‌های سیستم تولید مثل مشاهده شد، ممکن است مشکل جنسی ناشی از آلودگی هوا و PM_{2/5} را توضیح دهد.

متعاقب مطالعات انجام شده، یافته‌های اصلی از مطالعه‌ی حاضر نیز همسو با نتایج گزارش شده‌ی دیگر محققان بود. نتایج ما نشان داد که قرار گرفتن در معرض PM_{2/5} به طور قابل توجهی موجب افزایش تولید هورمون‌های FSH و کاهش شدید هورمون تستوسترون در خون می‌شود.

ناباروری می‌شود. سیستم تولیدمثل مردان به طور ویژه ای در معرض آسیب آلاینده‌های محیطی قرار دارد که معمولاً با تغییراتی در کیفیت، غلظت، تعداد اسپرم و میزان هورمون‌های دخیل در اسپرماتوژنز همراه می‌باشد (۱۲). کاهش کیفیت اسپرم ناشی از PM_{2/5} را می‌توان تا حدی با واکنش التهابی در بیضه‌ها و التهاب سیستمیک توضیح داد (۱۳). PM_{2/5} می‌تواند چندین الگوی بیان ژن از جمله سیتوکروم‌ها، اکسید ردوکتاز، گلوکوتیون ترانسفراز در اندام‌های مختلف را تحت تأثیر قرار دهد (۱۴). مطالعات انجام شده نتایج مهمی در خصوص ارتباط بین PM_{2/5} و سیستم تولیدمثلی جنس نر ارائه دادند از جمله اینکه قرارگرفتن در معرض PM_{2/5} به طور چشمگیری تولید و ترشح هورمون تستوسترون از بیضه‌ها و گردش خون را کاهش می‌دهد که این تنظیمات با کاهش بیان آنزیم‌های بیوستز کننده تستوسترون از جمله P450scc، 17βHSD و STAR در بیضه‌ها پشتیبانی می‌شود (۱۵). از این داده‌ها نه تنها نتیجه‌گیری شده است که قرارگرفتن در معرض PM_{2/5} باعث اختلال در اسپرماتوژنز می‌شود بلکه به شدت نشان می‌دهد که این اختلال اسپرماتوژنز می‌تواند در درجه اول توسط کاهش بیوستز تستوسترون اتفاق بیفتد (۱۶). مطابق با تغییرات هورمونه‌ای هیپوفیزی و تأثیراتش بر روند اسپرماتوژنز در موش‌های تحت تیمار با PM_{2/5}، بیان GnRH از هیپوتالاموس نیز کاهش می‌یابد که این کاهش با افزایش بیان سیتوکین‌های پیش التهابی، TNFα و ILβ1 هیپوتالاموسی همراه است (۱۷). با توجه به اینکه نشان داده شده است التهاب موضعی عملکردهای هیپوتالاموس را سرکوب می‌کند، قرارگرفتن در معرض PM_{2/5} ممکن است بیان mRNA GnRH را سرکوب کند و بنابراین محور HPG احتمالاً از طریق التهاب در هیپوتالاموس سرکوب شود (۱۸). PM_{2/5} از طریق تجمع در سد بیضه، سد جفت، سد اپیتلیال و سایر موانع

4. Zarandi SM, Shahsavani A, Khodaghohi F, Fakhri Y. Co-exposure to ambient PM_{2.5} plus gaseous pollutants increases amyloid β 1–42 accumulation in the hippocampus of male and female rats. *Toxin reviews*. 2019.
5. Loomis D, Huang W, Chen G. The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chinese journal of cancer*. 2014;33(4):189.
6. Meo S, Memon A, Sheikh S, Rouq F, Usmani A, Hassan A, et al. Effect of environmental air pollution on type 2 diabetes mellitus. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2015;19.(1)
7. Ohlander SJ, Lindgren MC, Lipshultz LI. Testosterone and male infertility. *Urologic Clinics*. 2016;43(2):195-202.
8. Ying Z, Xu X, Bai Y, Zhong J, Chen M, Liang Y, et al. Long-term exposure to concentrated ambient PM_{2.5} increases mouse blood pressure through abnormal activation of the sympathetic nervous system: a role for hypothalamic inflammation. *Environmental health perspectives*. 2014;122(1):79-86.
9. Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*. 2013;42:132-55.
10. 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.
11. Carré J, Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri R. Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review. *Environmental Health*. 2017;16:1-16.
12. Sifakis S, Androustopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems.

همچنین PM_{2/5} باعث افزایش قابل توجهی در شکنندگی DNA اسپرم بیضه‌ها می‌شود که این امر در القای نازایی در جنس نر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این داده‌ها در مجموع نشان می‌دهد که قرار گرفتن شش ماهه موش‌های نر در محیط PM_{2/5} ممکن است باعث اختلال در اسپرماتوزنز و در نتیجه اختلال در عملکرد تولیدمثل مردان شود. ایران کشوری در خاورمیانه است که با مشکلات متعدد آلودگی هوای حاوی PM_{2/5} درگیر می‌باشد. بسیاری از مطالعات حاکی از آن است که PM_{2/5} می‌تواند علت انواع بیماری‌های قلبی، تنفسی، جنسی، ژنتیکی و حتی مرگ باشد. در نتیجه، مطالعه حاضر نشان داد که PM_{2/5} خطرناک‌ترین ماده آلودگی هوا است که بر روی مسیرهای مختلف سیگنالینگ تأثیر می‌گذارد که به نوبه خود ممکن است منجر به مشکلات تولیدمثل و تداخل در ترشح هورمون‌های جنسی ضروری و تداخل در عملکرد محور GnRH و به دنبالش القای تأثیرات مخرب و شکنندگی DNA در سلول‌های بیضه شود. مطالعه سیستماتیک مکانیسم آسیب شناختی و فیزیولوژیکی PM_{2/5} بر روی سیستم تولیدمثل نه تنها برای درمان بیماران مربوطه مفید است بلکه برای بهبود کیفیت زندگی و سلامت روانی مردم نیز حائز اهمیت می‌باشد.

فهرست منابع

1. Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJ, Adeyi O, Arnold R, Baldé AB, et al. The Lancet Commission on pollution and health. *The lancet*. 2018;391(10119):462-512.
2. Neira M, Prüss-Ustün A, Mudu P. Reduce air pollution to beat NCDs: from recognition to action. *The Lancet*. 2018;392(10154):1178-9.
3. Wegesser TC, Pinkerton KE, Last JA. California wildfires of 2008: coarse and fine particulate matter toxicity. *Environmental health perspectives*. 2009;117(6):893-7.

- Environmental toxicology and pharmacology. 2017;51:56-70.
13. Zhou L, Su X, Li B, Chu C, Sun H, Zhang N, et al. PM2. 5 exposure impairs sperm quality through testicular damage dependent on NALP3 inflammasome and miR-183/96/182 cluster targeting FOXO1 in mouse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;169:551-63.
 14. Madaniyazi L, Li S, Li S, Guo Y. Candidate gene expression in response to low-level air pollution. *Environment international*. 2020;140:105610.
 15. Chao JH, Page ST. The current state of male hormonal contraception. *Pharmacology & therapeutics*. 2016;163:109-17.
 16. Gabuzda D, Yankner BA. Inflammation links ageing to the brain. *Nature*. 2013;497(7448):197-8.
 17. Voliotis M, Garner KL, Alobaid H, Tsaneva-Atanasova K, McArdle CA. Gonadotropin-releasing hormone signaling: An information theoretic approach. *Molecular and cellular endocrinology*. 2018;463:106-15.
 18. Arena S, Arena F, Maisano D, Di Benedetto V, Romeo C, Nicòtina P. Aquaporin-9 immunohistochemistry in varicocele testes as a consequence of hypoxia in the sperm production site. *Andrologia*. 2011;43(1):34-7.
 19. Wang L, Luo D, Liu X, Zhu J, Wang F, Li B, et al. Effects of PM2. 5 exposure on reproductive system and its mechanisms. *Chemosphere*. 2021;264:128436.
 20. Chauvigné F, Parhi J, Ducat C, Ollé J, Finn RN, Cerdà J. The cellular localization and redistribution of multiple aquaporin paralogs in the spermatid duct epithelium of a maturing marine teleost. *Journal of Anatomy*. 2018;233(2):177-92.

