Veterinary Clinical Pathology, Vol.17, No. 65, Spring 2023

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1941221.1329**

Effect of magnesium oxide nanoparticles on varicocele-induced testicular damage in male Wistar rats

Tolu Ghamari, M.[1], Eidi, A.[2], Mortazavi, P.[3*], Asghari, A.[4]

1- Ph.D. Graduate, 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.
3- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*Corresponding author's email: eidi@srbiau.ac.ir, akram_eidi@yahoo.com
(Received: 2022/12/2 Accepted: 2023/4/9)

Abstract

Varicocele is a pathological dilation of the venous network of the spermatic cord and considering that magnesium oxide nanoparticles play a key role in various physiological functions, the aim of this study was to evaluate the performance of nanoparticles on sperm characteristics affected by experimental varicocele. A total of 54 male Wistar rats were randomly divided into 9 equal groups including healthy control group (untouched animals), sham-operated group (underwent sham surgery), three healthy experimental groups (animals in these groups received magnesium oxide nanoparticles at doses of 1.25, 2.5 and 5 mg/kg respectively by gavage for 6 weeks), varicocele control group (varicocele was induced by renal vein ligation) and three experimental varicocele groups (in addition to varicocele induction, magnesium oxide nanoparticles were given at doses of 1.25, 2.5 and 5 mg/kg respectively by gavage for 6 weeks). At the end of the 6th week, the abdomen was opened and semen samples were collected from the tail of the epididymis to determine the indices of concentration, survival and motility of sperm and the data were statistically analyzed (p<0.05). The results showed that magnesium oxide nanoparticles were able to significantly increase the concentration, viability, progressive, moderate and non-progressive movements of sperm compared to the varicocele group (p<0.001) and also caused a significant decrease (p<0.001) in the number of non-moving sperms in the varicocele experimental groups. Therefore, magnesium oxide nanoparticles may possibly reduce the destructive effects of varicocele due to their antioxidant activity and be effective in its treatment by improving sperm properties during varicocele.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Magnesium oxide nanoparticles, Rat, Sperm, Testicular damage, Varicocele.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1941221.1329

بررسی اثر نانوذرات اکسیدمنیزیم بر آسیب بیضه‌ای القاءشده توسط واریکوسل در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

معصومه طلوع‌قمری[۱]، اکرم عیدی[۲]، سیدپژمان مرتضوی[۳*]، احمد اصغری[۴]

۱- دانش‌آموخته دکترای تخصصی گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استاد گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- دانشیار گروه آسیب‌شناسی، دانشکده علوم دامپزشکی تخصصی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴- استاد گروه علوم بالینی، دانشکده علوم دامپزشکی تخصصی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: sp.mortazavi@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۱۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱/۲۰)

چکیده

واریکوسل اتساع پاتولوژیک شبکه وریدی طناب اسپرماتیک می‌باشد و با توجه به اینکه نانوذرات اکسیدمنیزیم نقش کلیدی در عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی دارند، هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی عملکرد تزریق نانوذرات اکسیدمنیزیم بر ویژگی‌های اسپرم تحت‌تأثیر واریکوسل تجربی بود. تعداد ۵۴ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۹ گروه مساوی، شامل گروه کنترل سالم (حیوانات دست‌نخورده)، گروه شاهد جراحی (حیوانات تحت جراحی شم)، ۳ گروه تجربی سالم (حیوانات این گروه‌ها نانوذرات اکسیدمنیزیم را به‌ترتیب با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن به مدت ۶ هفته از طریق گاواژ دریافت کردند)، گروه کنترل واریکوسل (موش‌های این گروه با بستن ورید کلیوی تحت القای واریکوسل قرار گرفتند) و ۳ گروه تجربی واریکوسل (حیوانات این گروه‌ها علاوه بر القای واریکوسل، نانوذرات اکسیدمنیزیم را به‌ترتیب با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۶ هفته از طریق گاواژ دریافت کردند)، تقسیم شدند. در پایان هفته ششم، شکم حیوانات باز شده و نمونه‌های منی از قسمت دمی اپیدیدیم برای تعیین شاخص‌های غلظت، زنده‌مانی و تحرک اسپرماتوزوئیدها جمع‌آوری گردید و داده‌های حاصله مورد آنالیز آماری قرارگرفت ($p<0/05$). نتایج نشان داد که نانوذرات اکسیدمنیزیم توانست به‌طور معنی‌داری غلظت، زنده‌مانی، حرکت‌های پیشرونده، متوسط و غیرپیشرونده‌ٔ اسپرم‌ها را در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل به‌طور معنی‌دار افزایش دهد ($p<0/001$) و نیز سبب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های غیرمتحرک در گروه‌های تجربی واریکوسل شود ($p<0/001$). احتمالاً نانوذرات اکسیدمنیزیم، به‌واسطه‌ٔ فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود، می‌توانند باعث کاهش اثرات تخریبی واریکوسل گردند و با بهبود ویژگی‌های اسپرم در طول واریکوسل، در درمان آن مؤثر باشند.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، موش‌صحرا، واریکوسل، آسیب بیضه، نانوذرات اکسیدمنیزیم.

مقدمه

واریکوسل اتساع وریدهای شبکه پامپینی‌فرم (pampiniform plexus) اطراف بیضه است که در اثر جریان پس‌گرد خون ایجاد می‌شود. این عارضه در ۱۵ تا ۲۰ درصد از مردان در طناب اسپرماتیک رخ می‌دهد و تقریباً در ۵۰ درصد آن‌ها باعث ناباروری می‌شود (Bahmanzadeh *et al*., 2008; Amouoghli Tabrizi and Khakpour, 2013). مکانیسم‌های دقیق پاتوفیزیولوژی آسیب بیضه در افراد مبتلا به واریکوسل کاملاً شناخته‌شده نیست، اما افزایش دمای اسکروتوم و بیضه، گرفتگی وریدها و کمبود اکسیژن (hypoxia)، افزایش استرس اکسیداتیو (oxidative stress) و کاهش تستوسترون داخل بیضه‌ای، از عوامل پاتولوژیک مهم جهت آسیب به بیضه‌ها می‌باشند (Agarwal *et al*., 2014). اثرات واریکوسل متفاوت است اما اغلب منجر به اختلال عمومی در تولید اسپرم می‌شود که با کیفیت غیرطبیعی اسپرم نظیر الیگواسپرمی تا آزواسپرمی غیرانسدادی کامل، مشخص می‌شود (Celik-Ozenci *et al*., 2006). ترمیم واریکوسل دمای داخل بیضه را بهبود می‌بخشد، اما باروری فقط در حدود نیمی از بیماران بهبود می یابد. همچنین شاید تغییراتی هم در غلظت مایع منی ظاهر شود که منجر به ناباروری می‌گردد. اگرچه بسیاری از افراد نابارور مبتلا به واریکوسل هستند، اما رابطه آن با ناباروری مردان هنوز بی‌دلیل است (Zhang *et al*., 2006). افزایش دمای بیضه، یکی از مهم‌ترین دلایل آسیب به اسپرماتوژنز در مردان مبتلا به واریکوسل می‌باشد که با مکانیسم‌های متعددی باعث ایجاد این آسیب‌ها می‌شود که یکی از مهم‌ترین آن‌ها افزایش استرس‌اکسیداتیو میتوکندریایی، غشای پلاسمایی و سیتوپلاسم می‌باشد (Hamada *et al*., 2013).

گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) فاکتور اصلی در ایجاد ۳۰ تا ۸۰ درصد از مشکلات ناباروری در مردان می‌باشند (Bisht *et al*., 2017) به‌طوری‌که افزایش تولید ROS منجر به آپوپتوز سلولی و اختلال در اسپرماتوژنز می‌شود (Han *et al*., 2016). به طور طبیعی اسپرم مقدار کمی ROS تولید می‌کند که برای عملکرد طبیعی اسپرم از قبیل ظرفیت‌یابی اسپرم، واکنش آکروزومی و الحاق اسپرم به تخمک مورد نیاز می‌باشد (Hamada *et al*., 2013). تغییرات محیطی و همودینامیک بیضه، تولیدات ROS را افزایش می‌دهد و یا سبب کاهش سطح آنتی‌اکسیدانت‌ها شده و در نتیجه استرس‌اکسیداتیو ایجاد می‌نماید. تا کنون در ۴۰-۲۵ درصد از مردان نابارور واریکوسل مشاهده شده و میزان ROS در پلاسمای مایع منی آن‌ها هم بیشتر از مقدار طبیعی آن در افراد بارور می‌باشد. استرس‌های اکسیداتیو در اثر افزایش دمای بیضه و سایر فاکتورهای گنادوتوکسیک ایجاد می‌شوند و ممکن است سبب کاهش عملکرد اسپرم از طریق اکسیداسیون اسیدهای چرب در غشای اسپرماتوزوآ و یا تأثیر مستقیم بر DNA اسپرم و درنتیجه افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی و کاهش تحرک اسپرم‌ها، شوند (Twigg *et al*., 1998). استرس‌اکسیداتیو یک مکانیسم پاتوژنز محوری برای آسیب به بیضه مردان مبتلا به واریکوسل می‌باشد. درمان واریکوسل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانت‌های پلاسما و خون محیطی و همچنین آنتی‌اکسیدانت‌های مایع منی را بهبود بخشیده یا به سمت طبیعی‌شدن پیش می‌برد. برخی بررسی‌ها نشان داده‌اند که تجویز آنتی‌اکسیدانت‌های

مختلف برای افراد مبتلا به واریکوسل که سطح استرس‌اکسیداتیو مایع منی آن‌ها بالا است، باعث بهبود پارامترهای اسپرمی شده و سطح بیومارکرهای استرس‌اکسیداتیو کاهش می‌یابد (Razavi *et al*., 2006; Gual-Frau *et al*., 2015). رن و همکاران در سال ۲۰۱۸، استرس‌اکسیداتیو را یکی از عوامل اصلی تأثیرگذار بر مسمومیت باروری، بیان کردند (Ren *et al*., 2018). در مطالعات اخیر، نقش آنتی‌اکسیدانی منیزیم مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و با توجه به این‌که منیزیم یک عنصر زیستی دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، کوفاکتور بودن برای برخی آنزیم‌ها، پایدارنمودن ساختار غشاء و اندامک‌های سلولی موجودات زنده بوده و درعین حال دارای اثرات جانبی کمی می‌باشد، اهمیت زیادی پیدا کرده‌است (Girardi and Goldestein, 1997; Abinaya *et al*., 2021). به‌علاوه، مایع منی حاوی غلظت بالایی از کلسیم، منیزیم، روی و مس می‌باشد (Agarwal *et al*., 2014). با این‌حال، اطلاعات کمی در مورد نقش منیزیم در لقاح وجود دارد. اعتقاد بر این است که منیزیم نقش مهمی در دستگاه تناسلی انسان و در مایع منی و همچنین لقاح دارد (Valsa *et al*., 2012) و پلاسمای منی به عنوان یک بافر برای تحرک و محافظت از اسپرم عمل می‌کند. مایع منی سرشار از لیپیدها، یون‌هایی مانند سیترات، کلسیم، منیزیم، پتاسیم، سدیم، روی، کلراید، همچنین پروتئین‌ها و آنزیم‌های اکسیداتیو است که می‌تواند اسپرم را در برابر استرس‌اکسیداتیو حفظ نماید (Agarwal *et al*., 2014).

از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن یک راهکار تدافعی مؤثر در برابر بیماری‌های مختلف قلمداد می‌شود و محافظت از اسپرم‌ها هم در برابر عوامل آسیب‌رسان به وسیلهٔ موادی نظیر منیزیم که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند، ضروری به نظر می‌رسد (Mohajeri *et al*., 2012). همچنین امروزه استفاده از نانوذرات برای پیشگیری و کنترل بیماری‌ها، به‌دلیل وسعت سطح فعال و واکنش‌پذیری بالای آن‌ها، موضوعی ارزشمند و نویدبخش در مطالعات محسوب می‌شود (Kang *et al*., 2008). گزارش شده که برخی از نانوذرات اثرات غیرسمی و مفیدی بر اسپرماتوژنز دارند، با این حال، مسیر استفاده، دوز مصرفی، اندازه و ویژگی‌های نانوذرات، نقش اساسی در تعیین تأثیر آن‌ها بر سلول‌های زایای مردانه دارد (Park *et al*., 2010). نانوذرات توانایی عبور از سد خونی- بیضه‌ای را دارند که این امر لزوم مطالعه در مورد سازگاری زیستی و توزیع نانوذرات را افزایش می‌دهد (Shittu *et al*., 2018). براین اساس انتخاب و استفاده از نانوذرات منیزیم به‌دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی برتر، نسبت سطح به حجم بالا و ویژگی‌های ساختاری و اندازهٔ منحصربه‌فرد آن‌ها می‌باشد (Cai *et al*., 2018). همچنین نانوذرات اکسیدمنیزیم قادر است که ظرفیت کلی آنتی‌اکسیدانی بدن را افزایش داده و متعاقباً میزان گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده در بدن را کاهش دهد (Ishikawa *et al*., 2005). از طرف دیگر در میان اکسیدهای مختلف فلزی معدنی، نانوذرات اکسیدمنیزیم، یک عامل ضدباکتریائی با مزایای غیرسمی بودن و دسترسی نسبتاً آسان می‌باشد. ترکیبات اکسیده بر پایه عنصر منیزیم، نظیر MgO و $Mg(OH)_2$ نیز به‌دلیل کاربردهای گسترده در مواد ضدسرطان و مواد ضدباکتری، کاندیداهای استثنایی هستند (Jintakosol

and Singjai, 2009; Martinez-Boubeta *et al*., 2010; Rudramurthy *et al*., 2016).

با توجه به اهمیت موارد ذکرشده، در تحقیق حاضر سعی شد با انجام مطالعه‌ای تجربی، اثرات نانو ذرات اکسیدمنیزیم بر پارامترهای اسپرمی در موش‌های صحرائی تحت واریکوسل، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

- حیوانات و گروه‌های مورد مطالعه: در تحقیق حاضر، تعداد ۵۴ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شده و مورد استفاده قرارگرفت. جهت سازگاری با محیط، حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع تحقیق به خانهء حیوانات گروه زیست‌شناسی در مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران منتقل و در درجهء حرارت ۲±۲۳ درجه سلسیوس و نیز سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ساعته، نگه‌داری شدند. لازم به ذکر است که در طی دوره نگه‌داری، موش‌ها هیچ‌گونه محدودیتی ازنظر مصرف آب و غذا نداشتند. همچنین نانوذرات اکسیدمنیزیم کروی با درجه خلوص ۹۹ درصد و اندازه ۶۰-۲۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (Nanosany Company, Iran) خریداری گردید. لازم به ذکر است تمامی مواد مورد استفاده در این مطالعه به جز موارد ذکر شده از شرکت مرک آلمان خریداری شده است.

در ادامه موش‌های فوق به صورت تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شده و مطالعات انجام شده در تمام گروه‌ها طی زمان‌های یکسان به عمل آمد:

گروه ۱ (کنترل سالم): شامل حیوانات دست‌نخورده، همراه با گاواژ آب مقطر.

گروه ۲ (شاهد جراحی): شامل حیوانات تحت جراحی sham، همراه با گاواژ آب مقطر.

گروه‌های ۳، ۴ و ۵ (تجربی سالم): شامل حیوانات سالم با تیمار نانوذرات اکسیدمنیزیم: به ترتیب با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن، به‌صورت گاواژ روزانه (Kesmati *et al*., 2016).

گروه ۶ (کنترل واریکوسل): شامل حیوانات تحت جراحی واریکوسل همراه با گاواژ آب مقطر.

گروه‌های ۷، ۸ و ۹ (تجربی واریکوسل): شامل حیوانات تحت جراحی واریکوسل با تیمار نانوذرات اکسیدمنیزیم به ترتیب با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن، به‌صورت گاواژ روزانه.

- **نحوه انجام عمل جراحی واریکوسل در موش‌های مورد آزمایش:** در تحقیق حاضر برای القای واریکوسل در موش‌ها، از روش کوکسال و همکاران استفاده شد (Koksal *et al*., 2002). بر این اساس، پس از ایجاد بیهوشی با تزریق داخل‌صفاقی داروهای کتامین هیدروکلراید (Ketamine Hydrochloride 10%, Alfasan Chemical, Worden-Holland) با استفاده از دوز ۶۰ mg/kg و زایلازین (Xylazine 2%, Alfasan Chemical, Worden-Holland) با استفاده از دوز ۷ mg/kg، موش‌ها به‌صورت شکمی روی میز جراحی قرار داده شدند. سپس سطح شکمی موش‌ها آماده‌سازی و اسکراپ شده و یک برش خط وسط عمودی در شکم ایجاد شد. در ادامه، پس از مشاهده ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن، با دقت اطراف آن آزاد گردید، سپس سوزن آنژیوکت

شماره ۲۴ به موازات ورید قرار داده شده و به وسیله نخ بخیه سیلک ۰-۴، آنژیوکت روی ورید گره زده شد، به‌طوری‌که محل گره بعد از محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد. بعد از زدن گره، آنژیوکت به آرامی خارج شده و به ورید اجازه داده شد که مجدداً منبسط شود. طبق این روش، قطر ورید کلیوی چپ حدود ۵۰ درصد کاهش خواهد یافت. در نهایت محل برش شکمی بخیه زده شد.

- **نمونه‌گیری**: پس از طی ۶ هفته که موش‌های صحرایی به بلوغ کامل جنسی رسیده بودند، در گروه‌های تجربی واریکوسل، اتساع ورید اسپرماتیک داخلی در حیوانات از طریق مشاهده، مورد بررسی قرار گرفت. سپس از موش‌های صحرایی که اتساع ورید اسپرماتیک در آن‌ها مشاهده می‌گردید، نمونه‌گیری از اپیدیدیم دمی سمت راست و چپ انجام شد.

- **روش تحلیل اسپرم**: در تحقیق حاضر، پارامترهای مورد نظر در مورد اسپرم‌ها، شامل میزان غلظت اسپرم(concentration) یا تعداد (برحسب میلیون در میلی‌لیتر)، قابلیت زنده مانی اسپرم (viability) و درصد تحرک آن‌ها (motility) بود که به صورت دستی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا به اندازه ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از محلول نمک بافر فسفات PBS (phosphate buffered solution) ۰/۰۵ مولار با pH خنثی (۷/۴) را آماده کردیم و سپس با ایجاد برش روی اسکروتوم، ناحیه دمی اپیدیدیم را جدا نموده و به داخل محلول مذکور منتقل کردیم. البته ابتدا محلول بافر PBS داخل یک پلیت قرارگرفت و بر روی سطح گرم قرارداده‌شد تا دمای آن به ۳۷ درجه سلسیوس برسد، چرا که اسپرم‌ها بایستی در دمائی معادل دمای بدن نگه‌داری گردند، در غیراین‌صورت، به‌دلیل مرگ‌ومیر بالا در آن‌ها، خطای نمونه‌گیری بسیار زیاد خواهد شد. سپس برای خروج اسپرم‌ها از ناحیه دم اپیدیدیم، نمونه‌ها مجدداً با استفاده از پنس کاملاً قطعه قطعه شدند. بعد از این مرحله، نمونه‌ها مجدداً به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه روی سطح گرم قرارگرفتند تا اسپرم‌ها تحرک بهتری داشته باشند. بدین طریق تعداد و مورفولوژی بهتری از اسپرم‌ها حاصل می‌شد.

- **شمارش اسپرم‌ها**: در این مرحله با استفاده از لام هموسیتومتر (لام نئوبار)، محلول نمونه‌ی حاوی اسپرم و قراردادن لامل برروی آن، با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل نیکون (Eclipse E200، ساخت کشور ژاپن)، شمارش تعداد اسپرم انجام شد. بدین منظور، ابتدا با استفاده از میکروپیپت، قطره‌ای از محلول نمونه محتوی اسپرم (۱۰ میکرولیتر) برداشته شده و بین لام نئوبار و لامل قرار داده‌شد. پس از آن، نمونه به زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر انتقال داده شد. شمارش بدین صورت انجام گرفت که ابتدا تعداد اسپرم‌های موجود در چهار گوشه لام در زیر میکروسکوپ شمارش شد و سپس میانگین گرفته شد و در 10^6 ضرب گردید. عدد حاصله، شمار یا تعداد اسپرم‌های مشاهده شده بود (WHO, 2010).

- **بررسی تحرک اسپرم‌ها**: برای ارزیابی تحرک اسپرم، یک سامانه درجه‌بندی ساده به روش دستی، بدون نیاز به ارزیابی تحرک اسپرم با تجهیزات پیچیده، استفاده گردید. بدین منظور، حداقل در ۵ میدان میکروسکوپی، با یک روش مشخص، تعداد ۲۰۰ اسپرم مطالعه و تحرک آن‌ها به شرح زیر، به درجات الف، ب، ج و د،

تقسیم و طبقه‌بندی گردید(Katz and Yanagimach, 1980; Goodson *et al*., 2011):

الف) درصد اسپرم‌های پیشرونده (progressive motile sperm)

ب) درصد اسپرم‌های غیرپیشرونده (non-Progressive motile sperm)

ج) درصد اسپرم‌های با حرکت متوسط (intermediate motile sperm)

د) درصد اسپرم‌های نامتحرک (static or immotile sperm)

- **بررسی قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها**: برای محاسبه درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها، از رنگ‌آمیزی با محلول تریپان‌بلو ۰/۴ درصد و ریختن این محلول رنگی در محلول نمونه حاوی اسپرم که بین لام نئوبار و لامل برای شمارش قرار داده می‌شود، استفاده شد. بدین طریق که ابتدا حجم برابری از محلول نمونه اسپرم و محلول تریپان‌بلو با هم مخلوط و بر روی لام قرار داده‌شد. اسپرم‌هایی که در زیر میکروسکوپ دارای رنگ آبی بودند، کشته شده و آن‌هایی که بدون رنگ بودند، جزء اسپرم‌های سالم محسوب می‌شدند. به منظور تعیین درصد تحرک، ابتدا درصد اسپرم‌های متحرک در ۵ میدان میکروسکوپی تخمین زده شد و سپس میانگین آن‌ها به عنوان درصد تحرک اسپرم‌ها ثبت شد. در این روش، تعداد ۲۰۰ عدد اسپرم توسط یک میکروسکوپ نوری شمرده شده و اسپرم‌های زنده (رنگ‌نگرفته) از سلول‌های غیرزنده (رنگ‌گرفته) مجزا شدند. این نکته قابل‌ذکر است که بررسی میزان حیات اسپرم‌ها به‌نوعی تأیید سنجش میزان حرکت است. به‌این‌صورت که درصد یاخته‌های مرده (با در نظر گرفتن خطای شمارش) نباید از درصد اسپرم‌های غیرمتحرک تجاوز نماید (WHO, 2010).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: پس از جمع‌آوری داده‌ها، ابتدا جهت تعیین نرمال بودن آن‌ها، از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده گردید. به علت هنجار بودن داده‌ها، برای مقایسه‌های دوگانه، از آزمون نمونه‌های مستقل (Independent Samples *t*-test) و برای مقایسه تفاوت‌های معنی‌دار میانگین یک متغیر کمی در بین چند گروه، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده گردید. همچنین نتایج داده‌های آماری (شاخص‌های اسپرموگرام) به صورت انحراف استاندارد (standard deviation) ارائه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ انجام گرفت.

یافته‌ها

- **نتایج بررسی غلظت اسپرم**: نتایج حاصله از شمارش اسپرم‌ها و مقایسه آن‌ها بین گروه‌های مختلف کنترل و تجربی نشان داد که القای واریکوسل سبب کاهش معنی‌دار در میانگین غلظت اسپرم‌های گروه‌های کنترل واریکوسل و تجربی واریکوسل، نسبت به گروه‌های کنترل سالم و تجربی سالم شد (p<۰/۰۰۱)، به‌طوری که میانگین تعداد اسپرم‌ها (غلظت) در گروه‌های تجربی واریکوسل دریافت‌کننده نانوذرات اکسیدمنیزیم با دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن، نسبت به گروه کنترل واریکوسل دارای افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) بودند (جدول ۱).

- **نتایج مربوط به قابلیت زنده‌مانی اسپرم‌ها**

در این مورد نیز براساس نتایج ثبت شده در جدول ۱، مشخص گردید که میانگین درصد اسپرم‌های زنده در

موش‌های گروه‌های کنترل واریکوسل و تجربی واریکوسل به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به میزان آن در حیوانات گروه‌های کنترل سالم و تجربی سالم کاهش پیدا کرده‌بود. همچنین میانگین درصد اسپرم‌های زنده در موش‌های گروه‌های تجربی واریکوسل دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن از نانوذرات اکسیدمنیزیم، دارای افزایش معنی‌داری نسبت به میزان آن در حیوانات گروه کنترل واریکوسل بود ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۱- میزان شاخص‌های زنده‌مانی و غلظت اسپرم در موش‌های صحرائی نر بالغ گروه‌های مختلف تحقیق (مقادیر بر اساس SD برای ۶ سر موش)

نام گروه موش‌های مورد آزمایش	قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها (%)	غلظت اسپرم‌ها (mg/dL)
کنترل سالم	۷۲/۱۷ ± ۰/۹۵	۱۹/۹۵ ± ۰/۵۸
شاهد جراحی	۷۰/۶۶ ± ۰/۸۸	۲۰/۱۷ ± ۰/۲۶
تجربی سالم دریافت‌کننده ۱/۲۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۷۱/۳۳ ± ۱/۳۶	±۹۷/۱۹ ۰/۵۳
تجربی سالم دریافت‌کننده ۲/۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۷۰/۰۰ ± ۰/۵۸	۱۹/۵۳ ± ۰/۴۶
تجربی سالم دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۶۹/۱۷ ± ۰/۹۵	۲۰/۱۲ ± ۰/۵۹
کنترل واریکوسل	۳۰/۱۷ ± ۰/۹۴***	۵/۰۹ ± ۰/۵۸***
تجربی واریکوسل دریافت‌کننده ۱/۲۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۳۳/۵۰ ± ۰/۹۹***	۷/۰۰ ± ۰/۵۹***
تجربی واریکوسل دریافت‌کننده ۲/۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۴۸/۵۰ ± ۰/۸۹***+++	۱۲/۱۷ ± ۰/۴۹***+++
تجربی واریکوسل دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۵۲/۱۷ ± ۰/۹۵***+++	۱۶/۰۰ ± ۰/۶۸***+++

* $p<۰/۰۵$ و *** $p<۰/۰۰۱$ نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم می‌باشند.
+++ $p<۰/۰۰۱$ نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل واریکوسل می‌باشد.

- **نتایج مربوط به میزان تحرک اسپرم‌ها:** در مطالعه حاضر، میزان تحرک اسپرم، در ۴ سطح تحرک سریع (پیشرونده)، تحرک متوسط، تحرک کند (غیرپیشرونده) و اسپرم بدون حرکت (نامتحرک) مورد ارزیابی قرارگرفت. بر این اساس، نتایج ثبت شده در جدول ۲ نشان می‌دهد که میزان درصد اسپرم‌های متحرک پیشرونده و غیرپیشرونده (حرکت سریع و کند) در گروه‌های کنترل واریکوسل و تجربی واریکوسل، نسبت به گروه‌های کنترل سالم و تجربی سالم، کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) داشته‌است، در حالی‌که گروه‌های تجربی واریکوسل دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن از نانوذرات اکسیدمنیزیم، نسبت به گروه کنترل واریکوسل افزایش معنی‌دار نشان دادند ($p<۰/۰۰۱$). همچنین میزان درصد اسپرم‌های متحرک متوسط در گروه کنترل واریکوسل و گروه‌های تجربی واریکوسل دریافت‌کننده دوزهای ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن از نانوذرات اکسیدمنیزیم، نسبت به گروه کنترل سالم و گروه‌های تجربی سالم، کاهش معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). در گروه تجربی واریکوسل دریافت‌کننده دوز ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن از نانوذرات اکسیدمنیزیم هم، فاکتور مذکور، کاهش معنی‌داری نسبت به مقدار آن در گروه کنترل سالم نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$). این درحالی است که ۲ گروه تجربی واریکوسل دریافت‌کننده نانوذرات اکسید منیزیم با دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم از وزن بدن، نسبت به گروه کنترل واریکوسل افزایش معنی‌دار نشان

دادند ($p<۰/۰۰۱$). از طرف دیگر اسپرم‌های نامتحرک در گروه‌های آزمایشی کنترل و تجربی واریکوسل، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل سالم و تجربی سالم نشان دادند ($p<۰/۰۰۱$) ولی درگروه‌های تجربی واریکوسل دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن از نانوذرات اکسید منیزیم، نسبت به گروه کنترل واریکوسل، مقدار آن کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲- میزان شاخص‌های تحرک اسپرم در موش‌های صحرائی نر بالغ واریکوسل شده گروه‌های مختلف تحقیق (مقادیر بر اساس SD برای ۶ سر موش)

نام گروه موش‌های مورد آزمایش	حرکت سریع (mg/dL)	حرکت متوسط (mg/dL)	حرکت کند (mg/dL)	بی‌تحرک (mg/dL)
کنترل سالم	۳۲/۵ ± ۰/۷۶	۲۳/۸۳ ± ۰/۸۹	۲۵/۶۷ ± ۰/۴۹	۱۶/۸۳ ± ۱/۱۷
شاهد جراحی	۳۳/۱۷ ± ۰/۶۰	۲۳/۵ ± ۰/۷۶	۲۵/۱۷ ± ۰/۷۰	۲۰/۰ ± ۰/۹۶
تجربی سالم دریافت‌کننده ۱/۲۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۳۳/۸۳ ± ۰/۶۰	۲۳/۱۶ ± ۰/۶۰	۲۷/۰ ± ۰/۸۶	±۸۳/۱۷ ۱/۰۱
تجربی سالم دریافت‌کننده ۲/۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۳۲/۵ ± ۰/۷۶	۲۲/۸۳ ± ۰/۷۰	۲۵/۸۳ ± ۰/۳۱	۱۸/۸۳ ± ۰/۷۰
تجربی سالم دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۳۲/۳۳ ± ۰/۷۱	۲۳/۱۷ ± ۱/۱۴	۲۵/۶۷ ± ۰/۷۱	۱۹/۱۷ ± ۰/۷۹
کنترل واریکوسل	۳/۰۰ ± ۰/۵۲***	۵/۳۳ ± ۰/۶۱***	۸/۶۷ ± ۰/۶۷***	۷۱/۱۷ ± ۱/۱۴***
تجربی واریکوسل دریافت‌کننده ۱/۲۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۴/۶۷ ± ۰/۶۶***	۷/۸۳ ± ۰/۶۰***	۱۰/۸۳ ± ۰/۶۰***	۶۷/۰۰ ± ۱/۲۶***
تجربی واریکوسل دریافت‌کننده ۲/۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۱۰/۳۳ ± ۰/۸۴***+++	۱۱/۸۳ ± ۰/۷۹***+++	۱۲/۵۰ ± ۰/۷۶***++	۵۴/۰ ± ۱/۳۹***+++
تجربی واریکوسل دریافت‌کننده ۵ میلی‌گرم نانوذره اکسیدمنیزیم	۱۵/۱۶ ± ۰/۴۸***+++	۱۹/۳۳ ± ۱/۳۳***+++	۱۵/۵۰ ± ۰/۷۶***+++	۴۵/۵ ± ۲/۲۰***+++

* $p<۰/۰۵$ و *** $p<۰/۰۰۱$ نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم می‌باشند.

+++ $p<۰/۰۰۱$ نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار نسبت به گروه کنترل واریکوسل می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در موش‌های مبتلاشده به واریکوسل تجربی (در گروه کنترل واریکوسل)، غلظت، تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها، به‌طور معنی‌داری نسبت به مقادیر آن‌ها در حیوانات گروه کنترل سالم، پایین‌تر است ($p<۰/۰۰۱$) (جداول ۱ و ۲) که با نتایج مطالعات دیگر هم سازگار می باشد (Villanueva-Diaz *et al*., 1999; Navaeian Kalat *et al*., 2012). همچنین یافته‌های تحقیق حاضر، هم‌راستا با پژوهش صورت‌گرفته توسط احمدی‌عصر بدر و همکاران می‌باشد که نشان دادند، غلظت و درصد حرکت اسپرم با القای واریکوسل کاهش معنی‌داری می‌یابد (Ahmadi Asr Badr *et al*., 2016). نتایج پژوهش حاضر، تأکید بیشتری بر این نظریه دارد که افزایش دمای بیضه و میزان استرس‌اکسیداتیو می‌تواند منجر به نقص در روند اسپرماتوژنز و در نتیجه مختل‌شدن تولید و تمایز سلول در بیضه‌ها شود، به‌طوری که برخی مطالعات نشان می‌دهند که در افراد مبتلا به واریکوسل، با افزایش میزان آپوپتوزیس، جمعیت رده‌های مختلف سلول‌های زایا، مانند اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم کاهش می‌یابد. به‌علاوه، عبور اسپرم‌های تولیدشده از لوله‌های منی‌ساز، تحت تأثیر واریکوسل قرار گرفته و در نهایت، باعث کاهش تعداد اسپرم در این افراد می‌شود (Mann *et al*., 2002; Wu *et al*., 2009). همچنین در افراد مبتلا به واریکوسل، افزایش سطح رادیکال‌های آزاد،

باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در ساختار غشای سر اسپرم و قطعه‌میانی شده و با تغییر در سیالیت غشاء، باعث کاهش میزان تحرک اسپرم می‌شود (Hikim *et al*., 1998). همچنین در اثر واریکوسل، علاوه بر افزایش سطح استرس‌اکسیداتیو، میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها در مایع منی افراد مبتلا به آن نیز کاهش می‌یابد (Pasqualotto *et al*., 2008; Mostafa *et al*., 2009). از طرف دیگر گزارش شده که تولید بیش از حد ROS (reactive oxygen species)، فراگمانتاسیون DNA را تحریک می‌کند و اثرات مخربی بر میتوکندری و غشاء سیتوپلاسمی اسپرم دارد. علاوه بر این، اسپرم‌ها به‌دلیل داشتن غلظت بالایی از اسیدهای چرب اشباع و سیستم آنتی‌اکسیدانی ضعیف، در معرض صدمات اکسیداتیو می‌باشند (Giri *et al*., 1998; Mohammad nejad *et al*., 2013). لازم به ذکر است که آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها جلوگیری می‌کنند و استرس‌اکسیداتیو مقاومت رادیکال‌های آزاد بر دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است که باعث کاهش در روند اسپرماتوژنز و عملکرد اسپرم در مردان مبتلا به واریکوسل می‌شود (Marmar, 2001). در مطالعهٔ حاضر استفاده از نانوذرات اکسیدمنیزیم با دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن موش‌های گروه‌های تجربی واریکوسل، توانسته است کاهش پارامترهای اسپرمی را که بواسطهٔ واریکوسل ایجادشده، بهبود ببخشد (جدول ها ی ۱ و ۲). در این راستا پارک و همکاران هم در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که منیزیم توانسته است استرس اکسیداتیو را در واریکوسل کاهش دهد (Park *et al*., 2006). همچنین کاواک و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که گلوتاتیون بستری برای آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (glutathione peroxidase, GSH-Px) است و در بسیاری از سلول‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. استفاده از نانوذرات اکسیدمنیزیم سطح گلوتاتیون پراکسیداز را به طور معنی‌داری در همه گروه‌های تحت‌تأثیر آسیب‌های هیپوکسی افزایش داده‌است و از آنجا که سنتز GSH-Px وابسته به منیزیم است، خاصیت آنتی‌اکسیدانی منیزیم نیز ممکن است به مسیر GSH-Px مربوط باشد (Kavak, 2018). از طرف دیگر در مطالعه حاضر مشخص گردید که نانوذرات اکسیدمنیزیم با افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) تعداد اسپرم در موش‌های گروه‌های تجربی واریکوسل دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن نسبت به تعداد آن در حیوانات گروه کنترل واریکوسل، اثر مثبت نشان داده‌است (جدول ۱). همچنین نانوذرات مذکور باعث افزایش تعداد کل، میزان تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم موش‌های صحرائی دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم شده‌است (جداول ۱ و ۲) . البته علی‌رغم نتایج حاصله از تحقیق حاضر، پژوهشی که توسط پیرگیدیس و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام گرفته، نشان داده که استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در بهبود واریکوسل و به‌دنبال آن باروری، چندان مؤثر عمل نکرده و درمان واریکوسل بواسطهٔ عمل جراحی، موفق‌تر بوده‌است (Pyrgidis *et al*., 2021). این تناقض، می‌تواند به‌دلیل استفاده از دوز خیلی کم آنتی‌اکسیدان‌ها، دوره کوتاه درمان و یا نوع آنتی‌اکسیدان مورد استفاده باشد. چون مکمل‌ها باید به غلظت خاصی برسند تا روی استرس‌اکسیداتیو اثر بگذارند (Brown and Burk,

1973). در تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها دوز مصرفی بسیار مهم است. در این خصوص، در تحقیق حاضر هم مشاهده شد که موش‌هائی که دوز پائین یعنی به مقدار ۱/۲۵ میلی‌گرم برکیلوگرم از وزن بدن، نانوذرات اکسیدمنیزیم دریافت کرده‌بودند (در گروه تجربی واریکوسل)، اختلاف آماری معنی‌داری در تعداد کل، میزان تحرک و درصد زنده‌مانی اسپرم، نسبت به موش‌های گروه کنترل واریکوسل، نشان ندادند (جداول ۱ و ۲). لذا به نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها شمشیر دولبه‌ای هستند که دوز و مدت زمان مصرف آن‌ها مهم است (Kaur and Kaur, 2000) و استفاده از دوز نامناسب یا دوره کوتاه در درمان توسط آن‌ها، حتی اثر معکوس دارد (Brown and Burk, 1973). با این‌حال، در بیشتر تحقیقات اخیر نقش آنتی‌اکسیدانی منیزیم مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Matovic *et al.*, 2012). ویسیکی و همکاران در سال ۱۹۹۷ اعلام کردند که درمان واریکوسل توسط منیزیم باعث تغییرات مثبتی هم در مقادیر اسپرم و هم مورفولوژی طبیعی اسپرم، شده‌است (Visiki *et a*l., 1997).مطالعهٔ هلموت و کریستوف نشان داد که منیزیم به‌عنوان ترمزی در برابر استرس‌اکسیداتیو محسوب می‌شود (Yang *et al.*, 2006). همچنین الکساندر و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که منیزیم موجب مهار پراکسیداسیون لیپیدها گردیده و به دنبال کاهش منیزیم در سلول، مرگ سلولی اکسیداتیو نیز افزایش یافته‌است (Aleksandra *et al.*, 2012). مطالعهٔ چاندرا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ تایید کرد که سولفات‌منیزیم با دوز ۰/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن به مدت ۴ هفته، دارای اثرات مفیدی بر شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو و اسپرماتوژنز در موش‌های نر بوده‌است (Chandra *et al.*, 2013).

در پایان، با توجه به این که عنصر منیزیم دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی شناخته‌شده می‌باشد و از طرفی هم دارای توانایی در کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و حذف آن‌ها می‌باشد، به نظر می‌رسد که یک دوره تجویز ۶ هفته‌ای از نانوذرات‌اکسیدمنیزیم با دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن در موش‌های صحرائی نر، باعث تخفیف آسیب بیضه‌ای تحت القای واریکوسل شود و احتمالاً بتواند با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود باعث بهبود پارامترهای اسپرمی مانند تعداد کل، تحرک و درصد زنده‌ماندن اسپرم‌ها گردد. البته به‌نظر می‌رسد که جهت مطالعه کامل‌تر لازم است که تأثیر نانوذرات اکسیدمنیزیم بر میزان فعالیت لیپیدپراکسیدازها به ویژه مالون‌دی‌آلدئید و همچنین سایر پارامترهای آنتی‌اکسیدانی هم، مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر، در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و با همکاری مرکز تحقیقات رازی و دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی صورت گرفته‌است. نویسندگان مقاله، بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه، سپاسگزاری صمیمانه خود را ابراز می‌دارند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده-است.

منابع

- Abinaya, S., Kavitha, H.P., Prakash, M. and Muthukrishnaraj, A. (2021). Green synthesis of magnesium oxide nanoparticles and its applications: A review. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 19(7) 1-9.
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J. and Vazquez-Levin, M. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. Reproductive BioMedicine Online, 29(1): 32-58.
- Ahmadi Asr Badr, Y., Hasanzadeh, K. and Jahantabi, E. (2016). Evaluation of the effect of the number and size of veins ligated at left sided microsurgical inguinal varicocelectomy on the semen analysis outcomes. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences, 38(3): 6-11.
- Aleksandra, B., Zorica, B., Danijela, D., Vesna, M. and Buha, A. (2012). Magnesium effects against cd-induced stress in rats. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 63(1): 247-254.
- Amouoghli Tabrizi, B. and Khakpour, M. (2013). Protective effects of ginger (Zingiber officinale) rhizome extract on heatinduced testicular damage in the mouse. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 27(7): 183-261. [In Persian]
- Bahmanzadeh, M., Abolhassani, F., Amidi, F., Ejtemaiemehr, Sh., Salehi, M. and Abbasi M. (2008). The effects of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on epididymal sperm count, motility, and morphology in varicocelized rat. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(1): 23-28.
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M. and Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. Nature Reviews Urology, 14(8): 470-485.
- Brown, D.G. and Burk, R.F. (1973). Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a torula yeast diet. The Journal of Nutrition, 102(1):102-108.
- Cai, L., Chen, J., Liu, Z., Wang, H., Yang, H. and Ding, W. (2018). Magnesium Oxide Nanoparticles: Effective agricultural antibacterial agent against ralstonia solanacearum. Frontiers in Microbiology, 790(9): 1-19.
- Celik-Ozenci, C., Bayram, Z., Akkoyunlu, G., Türkay Korgun, E.,Erdogru, T., Seval, Y., *et al*. (2006). Localization of NGF and nNOS in varicocele-induced rat testis. Acta Histochemica, 107(6): 435-442.
- Chandra, A.K., Sengupta, P., Goswam, H. and Sarkar, M. (2013). Effects of dietary magnesium on testicular histology, steroidogenesis, spermatogenesis and oxidative stress markers in adult rat. Indian Journal of Experimental Biology, 51(1): 37-47.
- Comhaire, F. and Vermeulen, A. (1974). Varicocele sterility: Cortisol and catecholamines. Fertility and Sterility, 25(1): 88-95.
- Goodson, S.G., Zhang, Z., Tsuruta, J.K., Wang, W. and O'Brien, D.A. (2011). Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. Biology of Reproduction, 84(6):1207-15.
- Girardi, S.K. and Goldestein, M. (1997). Varicocele. Current Therapy in Endocrinology and Metabolism, 6(1): 355-358.
- Giri, A., Khynriam, D. and Prasad, S.B. (1998).Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenicity in mice. Mutation Research, 421(2):139-148.
- Gual-Frau, J., Abad, C., Amengual, M.J., Hannaoui, N., Checa, M.A., Ribas-Maynou, J. and *et al*. (2015). Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients. Human Fertility, 18(3): 225-9.
- Hamada, A., Esteves, S.C. and Agarwal, A. (2013). Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility. Part 2. Nature Reviews Urology, 10(1): 26-37.
- Han, J.W., Jeong, J.K., Gurunathan, S., Choi, Y.J., Das, J., Kwon, D.N., *et al*. (2016). Male and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. Nanotoxicology, 10(1): 361-373.
- Ishikawa, T., Kondo, Y., Goda, K. and Fujisawa, M. (2005). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. Journal of Andrology, 26(2): 281-288.

- Jintakosol, T. and Singjai, P. (2009). Effect of annealing treatment on luminescence property of MgO nanowires. Current Applied Physics, 9(6): 1288-1292.
- Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D.F. and Elimelech, M. (2008). Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter. Langmuir, 24(13): 6409-6413.
- Kaur, R. and Kaur, K. (2000). Effects of dietary selenium on morphology of testis and cauda epididymis in rats. Indian Journal of Pharmacology, 44(3): 265-272.
- Kavak, E.C., Bulmus, F.G., Bulmus, O., Burcin Kavak, S. and Kocaman, N. (2018). Magnesium: Does it reduce ischemia/reperfusion injury in an adnexal torsion rat model? Drug Design. Development and Therapy, 12(1): 409-415.
- Katz, D.F., Yanagimach, R. (1980). Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. Biology Reproduction, 22(4): 759-764.
- Kesmati, M., Konani, M., Torabi, M. and Khajehpour, L. (2016). Magnesium oxide nanoparticles reduce anxiety induced by morphine withdrawal in adult male mice. Physiology and Pharmacology, 20(3): 197-205.
- Koksal, T., Erdogru, T., Toptas, B., Gulkesen, K.H., Usta, M.,Baykal, A., *et al*. (2002). Effect of experimental varicocele in rats on testicular oxidative stress status. Andrologia, 34(1): 242-247.
- Mann, S.L., Patton, W.C., King, A. and Chan, P.J. (2002). Comparative genomic hybridization analysis of sperm DNA apoptosis after exposure to heat shock. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 19(4): 195-200.
- Marmar, J.L. (2001). The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. Human Reproduction Update, 7(5): 461-472.
- Martinez-Boubeta, C., Balcells, L., Cristofol, R., Sanfeliu, C., Rodriguez, E. and Weissleder, R. (2010). Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine Journal, 6(2): 362-370.
- Matovic, V., Buha, A., Buha, Z., Dukic-Cosic, D., Miljkovic, M., Ivanisevic, J. and *et al*. (2012). Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. Food Chemistry Toxicology, 50(1): 552-557.
- Mohajeri, D., Mousavi, G.H. and Mansouri M.B. (2012). Histopathological study on the effects of turmeric (Curcuma longa linn.) powder on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 6(1): 1493-1503. [In Persian]
- Mohammad nejad, D., Soleimani rad, J. and Mohammadi-roshandeh, A. (2013). Preventive effects of Cetrorelix on the changes induced by Cisplatin on spermatogenic and myoid cells and basal lamina of seminiferous ducts in the testis of Balb/C mouse. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 6(4): 1665-1674. [In Persian]
- Mostafa, T., Anis, T., Imam, H. and El-Nashar, A.R. (2009). Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. Andrologia, 41(2): 125-129.
- NavaeianKalat, E., Tavalaee, M., Abasi, H. and Nasr Esfahani, M.H. (2012). Comparison of sperm parameters and DNA integrity between fertile and varicocele individuals. Journal of Cell, 3(2): 171-177.
- Park, J.Y., Lee, Y.J., Jun, K.W., Baeg, J.O. and Yim, D.J. (2006). Chemical synthesis and characterization of highly oil dispersed MgO nanoparticles. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 12(6): 882-887.
- Park, E.J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H., *et al*., (2010). Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. Environmental Toxicology and Pharmacology, 30(2): 162-168.
- Pasqualotto, F.F., Sundaram, A., Sharma, R.K. and Borges, E. (2008). Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. Fertility and Sterility, 89(3): 602-607.
- Razavi, S., Nasr-Esfahani, M., Mardani, M. and Javanmardi, S. (2006). Relation between protamine deficiency and sperm parameters, pronuclear morphology, cleavage and embryo quality. Cell Journal (Yakhteh), 2(1): 80-87.

- Ren, C., Hu, X. and Zhou, Q. (2018). Graphene oxide quantum dots reduce oxidative stress and inhibit neurotoxicity in vitro and in vivo through catalase-like activity and metabolic regulation. Advanced Science, 5(5): 1-13.
- Rudramurthy, G., Swamy, M., Sinniah, U. and Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. Molecules, 21(7): 836-866.
- Shittu, O.K., Aaron, S.Y., Oladuntoye, M.D. and Lawal, B. (2018). Diminazene aceturate modified nanocomposite for improved efficacy in acute trypanosome infection. Journal of Acute Disease, 7(1): 36-42.
- Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D.S. and Aitken, R.J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Human Reproduction, 13(6): 1429-1436.
- Valsa, J., Padmanabhan Skandhan, K., Sahab Khan, P., Sumangala, B. and Gondalia, M. (2012). Split ejaculation study: semen parameters and calcium and magnesium in seminal plasma. Central European Journal of Urology, 65(4): 216-218.
- Villanueva-Diaz, C.A., Vega-Hernandez, E.A., Diaz-Perez, M.A., Echavarria-Sanchez, M., *et al*. (1999). Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and marginal semen analysis. Andrologia, 31(5): 263-267.
- Visiki, S., Szollosi, L., Kiss, A.S. and Csikkel-Szolnoki, A. (1997). Effects of magnesium on spermiogenesis. Magnesium: Current Status and New Developments, 1(1): 335-339.
- WHO. (2010). World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen, Geneva: World Health Organization. 5th edition.
- Wu, G.J., Chang, F.W., Lee, S.S. and Cheng, Y.Y. (2009). Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. Fertility and Sterility, 91(3): 831-837.
- Yang, Y., Wu, Z., Chen, Y., Qiao, M., Yuan, J., Nie, W., *et al*. (2006). Magnesium deficiency enhances hydrogen peroxide production and oxidative damage in chick embryo hepatocyte in vitro. Bio Metals, 19(1): 71-81.
- Zhang, H., Zhou, Q.M., Li, X.D., Yi, X., Duan, X., Liu, B., *et al*. (2006). Ginsenoside Re increases fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility by induction of nitric oxide synthase. Archives of Pharmacal Research, 29(2): 145-151.